

# Фізіологічний журнал

ТОМ 58 № 2 2012

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

## Зміст

<i>Акопова О.В., Коркач Ю.П., Коцюрuba А.В., Колчинська Л.І., Сагач В.Ф.</i> Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту . . . . .	3
<i>Жуковська А.С., Шии А.М., Мойбенко О.О.</i> Вплив $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот на дихання та набухання мітохондрій серця при експериментальному цукровому діабеті . . . . .	16
<i>Shepel O.A., Dosenko V.E., Voznesenska T.Yu., Yanchiy R.I.</i> Expression of TNF- $\alpha$ mRNA, but not of TNF- $\alpha$ receptors mRNA, is detected in single murine oocyte and decreases during oocyte meiotic maturation: single-cell RT-PCR data . . . . .	27
<i>Кущенко Н.Л., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.</i> Активатор ППАР- $\gamma$ піоглітазон знижує експресію транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B та апоптоз в мононуклеарних клітинах CD64 <sup>+</sup> крові in vitro . . . . .	33
<i>Zholobak N.M., Kavok N.S., Bogorad-Kobelska O.S., Borovoy I.A., Malyukina M.Yu., Spivak M.Ya.</i> Effect of tilorone and its analogues on the change of mitochondrial potential of rat hepatocytes . . . . .	39
<i>Ткаченко Я.В., Воробйова Г.М., Жовнір В.А., Смець І.М.</i> Вплив аутологічної пуповинної та донорської крові на цитокіновий профіль новонароджених з транспозицією магістральних судин . . . . .	44
<i>Літовка І.Г., Березовський В.Я., Заморська Т.М.</i> Нормобарична гіпероксія впливає на остеогенез щурів . . . . .	51
<i>Лещенко І.В., Шевчук В.Г., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В.</i> Вплив тривалого введення глутамату натрію на структуру підшлункової залози щурів . . . . .	59
<i>Коряк Ю.А.</i> Сократительные свойства и мышечно-сухожильная жесткость трехглавой мышцы голени и их изменения в результате продолжительного постельного режима . . . . .	66
<i>Редька І.В.</i> Вікові особливості церебральної гемодинаміки слабозорих дітей дошкільного та молодшого шкільного віку . . . . .	80

**ОГЛЯДИ**

*Стрелков Є.В., Французова С.Б., Хромов О.С.* Гіпоксична легенева гіпертензія:  
сучасні погляди на патогенез та шляхи її фармакологічної корекції . . . . . 89

**ІСТОРІЯ НАУК**

Марлинский В.В. Илья Фаддеевич Цион – пионер вестибулярной физиологии . . . . . 101

О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, Л.І. Колчинська, В.Ф. Сагач

## Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту

*Проаналізовано особливості метаболізму активних форм азоту та кисню (АФА й АФК відповідно) в мітохондріях міокарда щурів за умов введення різних доз нітрогліцерину (НГ). Показано, що введення НГ дозозалежно збільшує кальцієву ємність мітохондрій, внаслідок інгібування мітохондріальної пори (МП) in vivo, яке корелює з активацією мітохондріальної кальційзалежної ізоформи NO-синтази. Зі збільшенням дози НГ активність NO-синтази підвищується відповідно до збільшення кальцієвої ємності мітохондрій. Спостерігається також дозозалежна активація нітратредуктази, проте кількість утворюваного нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) зменшується, що відповідає зміні співвідношення  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в бік  $\text{NO}_3^-$ , кінцевого продукту перетворень NO. Співвідношення між нітрозилюванням мітохондріальних білків з утворенням нітрозотіолів і виходом  $\text{NO}_3^-$  також змінюється на користь останнього, що свідчить про посилення окисних процесів у мітохондріях міокарда після введення НГ. Показано дозозалежне збільшення продуктів перекисного окиснення ліпідів, маркера оксидативних ушкоджень мітохондріальних мембран. Встановлено, що підґрунтям оксидативного стресу є зростання продукції АФК (гідроксил-радикала та мітохондріального пулу  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), а також збільшення вмісту вільного заліза, джерелом якого може бути окисна деградація мітохондріальних залізовмісних білків. Взаємодія заліза з гідропероксидом за реакцією Фентона з утворенням гідроксил-радикала та вільнорадикальний розпад пероксинітриту, джерелом якого є  $\text{NO}_3^-$ , є вірогідною причиною багаторазового посилення продукції АФК, підвищення перекисного окиснення ліпідів та окиснення пулів NO. Блокування МП оксидом азоту, в тому числі й синтезованим в мітохондріях in vivo, активує обидві ланки циклу NO – NO-синтазної внаслідок кальційзалежної активації мітохондріальної NO-синтази та нітратредуктазної – внаслідок збільшення пулів  $\text{NO}_3^-$ . Зростання продукції АФК, яке багаторазово посилюється через вивільнення заліза, призводить до оксидативного стресу мітохондрій та зсуву метаболізму АФА в бік утворення  $\text{NO}_3^-$  – кінцевого продукту перетворень оксиду азоту, попри активацію нітратредуктазної ланки циклу NO. Показано, що відкриття МП за умов in vitro також зменшує продукцію АФК, тоді як її блокування циклоспорином А відновлює утворення АФК до контрольних значень. Одержані результати свідчать, що МП, відкриття якої попереджає гіперпродукцію АФК за умов in vitro та in vivo, є важливою ланкою регуляції метаболізму АФК і АФА в мітохондріях.*

*Ключові слова: активні форми азоту та кисню, нітрогліцерин, кальцій, мітохондріальна пора, мітохондрії міокарда.*

### ВСТУП

Доведено, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром фізіологічної дії. Зміни експресії

різних ізоформ NO-синтази (NOS), нестача або гіперпродукція NO, які відмічаються за патологічних станів, призводять до значного дисбалансу вмісту активних форм азоту та кисню (АФА і АФК) в організмі і, відповідно, – до порушення NO-залежних

© О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, Л.І. Колчинська, В.Ф. Сагач

механізмів регуляції кровообігу та роботи серця [24].

Найбільш детально дослідженим є механізм вазодилататорної дії NO, що здійснюється як цГМФ-залежним шляхом [24], так і безпосередньо за допомогою модуляції окисно-відновного стану клітинних тіолів [5], у тому числі й тих, що входять до складу активних центрів або регуляторних сайтів іонних каналів і ферментів, що відіграють важливу роль у регуляції тону судин. Відомо, що цГМФ-залежний механізм вазодилататорного ефекту NO ґрунтується на зниженні вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою відповідної дії на кальційтранспортні системи клітини: кальцієві канали плазматичної мембрани,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу саркоплазматичного ретикулула [7], і навіть, як нещодавно показано нами,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу аорти [2], активація якої, як відомо, призводить до гіперполяризації клітин, блокує вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалзалежні кальцієві канали та підтримує роботу  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у прямому напрямі – видалення  $\text{Ca}^{2+}$  в обмін на вхід іонів  $\text{Na}^+$  [13]. Відносно менш дослідженою залишається мітохондріальна кальційтранспортна система як мішень дії NO, яка виконує важливі фізіологічні функції, одна з яких – регуляція кальцієвого гомеостазу клітини та мітохондрій зокрема. Так, відомо, що вміст цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  значною мірою залежить від кальцієвої ємності мітохондрій та їх здатності до накопичення  $\text{Ca}^{2+}$ . Мітохондріальна система трансмембранного обміну  $\text{Ca}^{2+}$  включає  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, мітохондріальні  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ - та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінники, ріанодинові рецептори, а також мітохондріальну пору (МП), відкриття якої за умов надлишкового входу  $\text{Ca}^{2+}$  підвищує цитозольний вміст  $\text{Ca}^{2+}$ , посилює мітохондріальну деполаризацію, роз'єднує дихальний ланцюг, зменшує продукцію аденозинтрифосфату (АТФ), призводить до набухання матриксу й вивільнення цитохрому *c*, наслідком чого є індукція клітинного апоптозу й численних патологічних станів організму [7, 16, 30].

За умов фізіологічної норми кальційтранспортна система мітохондрій виконує низку регуляторних функцій щодо енергетичного стану мітохондрій, серед яких активація мітохондріальних дегідрогеназ, споживання кисню [18], системи окисного фосфорилування та синтезу АТФ [16]. Кальційзалежною є також мітохондріальна ізоформа NOS (мітоNOS) і, таким чином, мітохондріальний гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  є модулятором активності мітоNOS та мітохондріального синтезу NO [8, 14]. Відомо, що NO – продукт окисного перетворення L-аргініну конститутивними та неконститутивною ізоформами NOS, надалі зазнає окисно-відновних перетворень ферментативним і неферментативним шляхом, з наступним відновленням NO [8]. Основними ланками циклу перетворень NO є нітрозилування білків з утворенням S-нітрозотіолів, окиснення NO до  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ , розклад нітрозотіолів, що каталізується важкими металами (Fe, Cu тощо), а також відновлення  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  нітрат- та нітритредуктазами відповідно [5, 8]. Вважають, що нітрозотіоли є однією з форм депонування NO та важливим його джерелом за фізіологічних умов [5]. Отже, клітинний вміст NO та його фізіологічна дія є результируючою щонайменше трьох основних складових: власне NO-синтазної активності, нітрат- та нітритредуктазної активності а також наявності достатнього пулу депонованого NO. Останнім часом поширюється концепція, згідно з якою важливим чинником фізіологічної дії оксиду азоту є компартменталізація його клітинних пулів, внаслідок чого вона визначається локалізацією як сайтів безпосереднього утворення, так і сайтів-мішеней NO. У такому ракурсі значну увагу привертають мітохондрії як ланка системи перетворень NO та його похідних, АФА [8]. Відомо, що NO мітохондріального походження може відігравати неоднозначну роль у регуляції мітохондріальних функцій: пригнічувати відкриття МП [1], проте стимулювати продукцію АФК внаслідок інгібу-

вання цитохромоксидази та блокування транспорту електронів [12], що збільшує вихід АФК як побічних і проміжних продуктів редокс-реакцій дихального ланцюга [25].

Хоча мітохондрії є важливим елементом системи перетворень NO (окрім власної NO-синтазної активності в мітохондріях наявна також нітратредуктазна ланка циклу NO), її дослідження тільки розпочинається [7]. Є підстави припускати, що фізіологічна дія донорів NO на рівні мітохондрій, яка є складовою цитопротекторних ефектів оксиду азоту, може бути опосередкована не тільки власне мітохондріальним метаболізмом похідних азоту та кисню, але й взаємодією пулів АФА й АФК. Це питання недостатньо висвітлено у сучасній літературі. Майже повз увагу дослідників пройшла також залежність мітохондріальної продукції АФА й АФК, яка визначається кальційзалежними ферментами, мітоNOS і дегідрогеназами, а також комплексами дихального ланцюга від мітохондріального гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$ .

Отже, вивчення впливу NO на кальцій-транспортну систему мітохондрій як регуляторний чинник мітохондріального метаболізму АФА у системі перетворень NO є необхідним для глибшого розуміння підґрунтя кардіопротекторних механізмів дії фармакологічних донорів NO.

Метою цієї роботи було дослідити вплив екзогенного NO на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за допомогою введення різних доз фармакологічного донора NO нітрогліцерину, а також з'ясувати особливості метаболізму АФА й АФК у мітохондріях міокарда щурів, пов'язані з NO-залежною регуляцією кальцієвого гомеостазу мітохондрій.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Дослідним щурам вводили нітрогліцерин (НГ) внутрішньооче-

ревинно у дозах 0,25, 0,5, 1,0 і 1,5 мг/кг, а контрольним – фізіологічний розчин. Серця, видалені через 5 або 30 хв після введення НГ ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2 °C), подрібнювали і гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НCl-буфера, 1 ммоль/л EDTA; pH 7,4.

Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g (4 °C), після чого супернатант центрифугували 15 хв при 11000 g (4 °C). Осад суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання EDTA і зберігали при 4 °C. Вміст білка визначали за методом Лоурі.

Транспорт кальцію реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 654 нм за наявності 70 мкмоль/л арсеназо-III. Для реєстрації транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондрії вносили у стандартне середовище інкубації (ммоль/л): KCl – 120,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{Na}_2\text{-ATP}$  – 1,  $\text{MgCl}_2$  – 1,  $\text{CaCl}_2$  – 0,1, тріс-НCl буфер – 20; pH 7,4. Кальцієву ємність визначали як максимальну кількість кальцію, акумульовану у мітохондріях і виражали у наномолях  $\text{Ca}^{2+}$  на 1 мг білка. Функціональну активність МП за дії НГ оцінювали у тому самому середовищі інкубації за циклоспоринчутливим виходом  $\text{Ca}^{2+}$  після накопичення добавки 30 нмоль·мг<sup>-1</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  та блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера рутенієвим червоним у концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л, як описано нами раніше [1] і виражали у відсотках інгібування відносно контролю, без циклоспорину А. Мітохондрії вносили у кількості 0,3 мг/мл.

Мембранний потенціал реєстрували у стандартному середовищі інкубації за зміною відносного значення світлопоглинання суспензії мітохондрій (1 мг/мл) при довжині хвиль 510 та 525 нм за методом Акермана за наявності 10 мкмоль/л сафраніну [9].

Утворення АФК реєстрували за зміною флуоресценції дихлорофлуоресцеїну при довжині хвиль збудження та емісії 504 та

525 нм відповідно, після попереднього навантаження суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л зонда протягом 30 хв при 37 °С [28]. Середовище інкубації (ммоль/л): KCl – 120,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1, сукцинат Na – 5,  $\text{CaCl}_2$  – 0,015, тріс-HCl буфер – 20; pH 7,4; вміст білка 1 мг/мл.

Концентрацію стабільних метаболітів NO,  $\text{NO}_2^-$  та S-нітрозотіолів визначали спектрофотометричним методом Гріна [20], вміст  $\text{NO}_3^-$  – бруциновим методом [6].

Активність мітоNOS оцінювали за зміною вмісту L-цитруліну, продукту ферментативного перетворення L-аргініну NOS у розрахунок на 1 мг білка [15].

Активність НАДН-залежної нітратредуктази [4] визначали за зміною вмісту нітрат-аніона в інкубаційній суміші такого складу: 4 ммоль/л  $\text{NaNO}_3$ , 0,8 ммоль/л НАДН, в 0,1 моль/л фосфатному буфері (pH 7,0), 1–2 мг білка. Після 60 хв інкубації (37 °С) реакцію зупиняли додаванням 0,3 мл 2 н  $\text{HClO}_4$ . У контрольних пробах  $\text{HClO}_4$  вносили перед інкубацією. Після центрифугування 10 хв при 700 г у супернатанті визначали вміст нітрат-аніона [6]. Активність виражали за кількістю відновленого нітрату за 1 год на 1 мг білка.

Вміст пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) розраховували спектрофотометрично у KJ/лактопероксидазній системі у 0,05 моль/л фосфатному буфері (pH 7,33) при довжині хвилі 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 26000 моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> [23].

Утворення гідроксильного радикала (·OH) оцінювали [17] в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л 2-деокси-D-рибози, 1 ммоль/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  у 20 ммоль/л Na-фосфатному буфері (pH 7,4); генерацію ·OH-радикала – за утворенням малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм і виражали в умовних одиницях поглинання за 1 год на 1 мг білка.

Вміст вільного заліза ( $\text{Fe}^{2+}$ ) визначали за стандартною методикою, використовуючи тест-набори фірми «Філісит Діагностика» (Україна).

У роботі використано такі реагенти: тріс (основа), (“Serva”, Німеччина),  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , НАДН (“Reanal”, Угорщина), сульфаниламід, N-нафтилендіамінгідрохлорид, бруцин, 2-деокси-D-рибоза, лактопероксидаза, сафранін, дихлорофлуоресцеїндегідроацетат (“Sigma”, США), арсеназо-III, рутенієвий червоний, циклоспорин А, (“Fluka”, Німеччина) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а. Розчини готували на бідистильованій воді. Достовірність оцінювали за критерієм t Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали статистично достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведено результати вивчення впливу НГ на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ , вміст нітрат-аніона, кінцевого продукту метаболізму NO, а також функціональну активність циклоспоринчутливої пори, МП у мітохондріях серця щурів. Показано дозозалежну модульовальну дію екзогенного NO на кальційтранспортну систему мітохондрій і мітохондріальну систему оксиду азоту. Так, безпосередньо після введення НГ ( $\leq 1$  мг/кг, 5 хв) накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях підвищується від  $38,2 \pm 6,2$  до  $(110,0 \pm 8,0)$  нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг білка ( $P < 0,05$ ). Відбувається стрімке дозозалежне збільшення вмісту нітрат-аніона до  $(1,4 \pm 0,1)$  мкмоль/мг білка, що свідчить про одночасну з надходженням  $\text{Ca}^{2+}$  активацію метаболізму АФА, початковою стадією якої є гідроліз і відновлення нітрогрупи НГ до NO з його наступним окисненням до  $\text{NO}_3^-$  [19, 24] (див. рис. 1,а,б, 1). Після введення НГ значно пригнічується функціональна активність МП (див. рис. 1,в, 2), яка корелює з її блокуванням оксидом азоту *in vitro*. Раніше нами було показано [3], що накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, кальцієваємність і час затримки кальцію у матриксі за інших рівних умов визначається балансом між акумуляцією іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер та вивільненням через циклоспоринчутливу МП. Тому пригнічення цикло-

споринчутливого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій при введенні донора NO *in vivo* у дозі 1 мг/кг є однією з основних причин спостережуваної стимуляції його накопичення у мітохондріях міокарда. Збільшення кальцієвої ємності мітохондрій міокарда є короткотерміновим і починає зменшуватися протягом 30 хв після введення НГ (див. рис. 1,а, 2). Вміст нітрат-аніона через 30 хв після введення НГ також знижується майже до контрольних значень (див. рис. 1,б, 2), що свідчить про короткотермінову дію екзогенного NO як на кальційтранспортну систему мітохондрій, так і на мітохондріальний метаболізм АФА. Отже, введення НГ, з одного боку, призводить до швидкого посилення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях і видалення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із цитозолу у мітохондріальний матрикс, а з іншого – до швидкої активації мітохонд-

ріального метаболізму АФА, що виражається у дозозалежному прирості вмісту нітрат-аніона, кінцевого продукту метаболізму NO та продукту ферментативного перетворення НГ (див. рис. 1,а,б, 1).

Кореляція між дозозалежною дією NO на відкриття МП і посиленням метаболізму АФА у мітохондріях спонукає більш детально простежити особливості регуляції мітохондріального циклу NO під дією екзогенного донора оксиду азоту *in vivo*, безпосередньо пов'язані з NO-залежним блокуванням МП. Одночасність та односпрямованість дозозалежної дії донора NO як на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ , так і на продукцію АФА дає змогу пов'язати спостережувані зміни вмісту  $\text{NO}_3^-$  зі збільшенням матриксного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок блокування МП і кальційзалежною активацією мітоNOS. Отже, відкриття МП є важливим чинни-

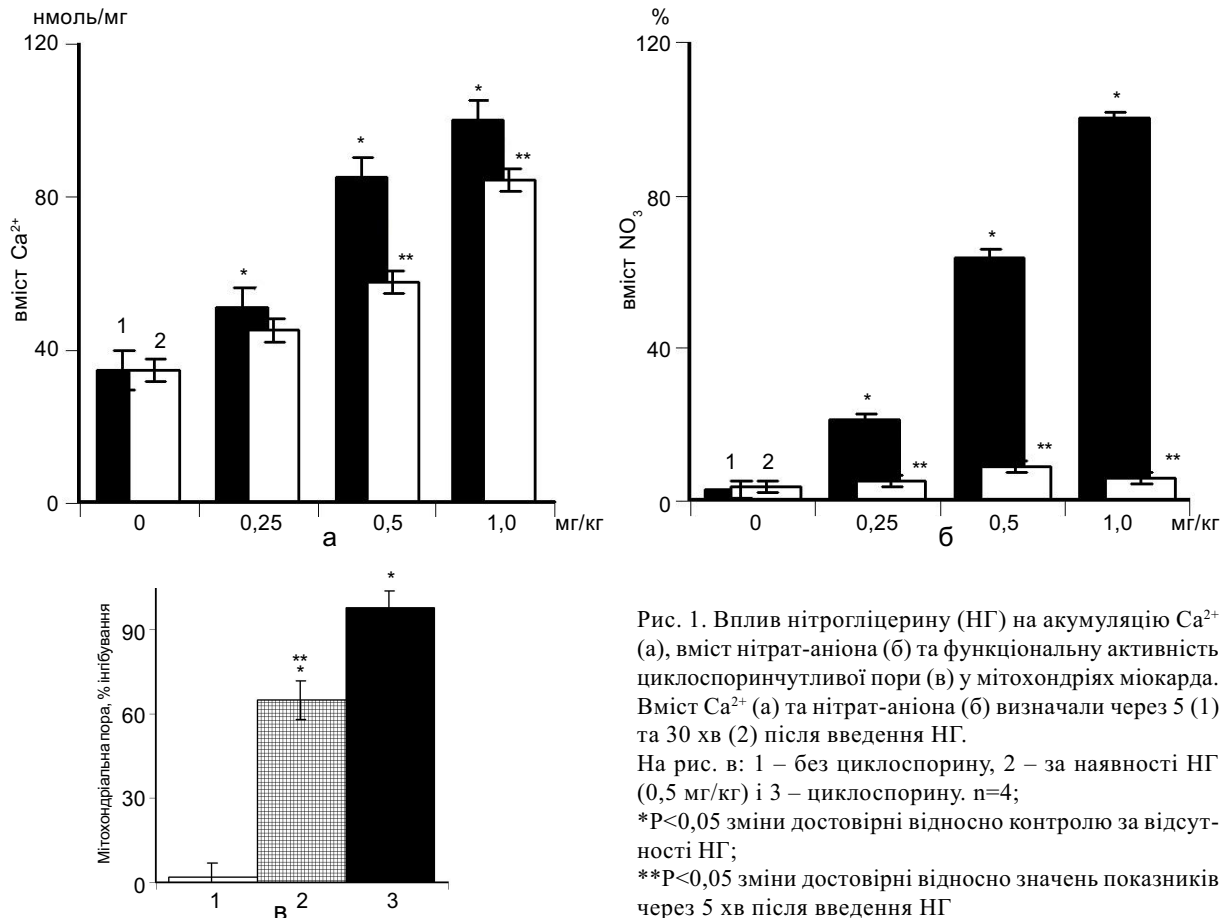


Рис. 1. Вплив нітрогліцерину (НГ) на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  (а), вміст нітрат-аніона (б) та функціональну активність циклоспоринчутливої пори (в) у мітохондріях міокарда. Вміст  $\text{Ca}^{2+}$  (а) та нітрат-аніона (б) визначали через 5 (1) та 30 хв (2) після введення НГ.

На рис. в: 1 – без циклоспорину, 2 – за наявності НГ (0,5 мг/кг) і 3 – циклоспорину. n=4;

\* $P < 0,05$  зміни достовірні відносно контролю за відсутності НГ;

\*\* $P < 0,05$  зміни достовірні відносно значень показників через 5 хв після введення НГ

ком регуляції як мітохондріального гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$ , так і мітохондріальної продукції АФА. Для більш детального висвітлення молекулярних механізмів, що є підґрунтям кардіопротекторної дії NO, доцільно проаналізувати особливості метаболізму АФА, пов'язані з блокуванням МП оксидом азоту та посиленням потенціалзалежного входу  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондріального матриксу. Для цього нами було досліджено вплив екзогенного NO як на вміст АФА, так і на основні ланки мітохондріального циклу NO: синтез NO мітоNOS і відновлення  $\text{NO}_3^-$  мітохондріальною нітратредуктазою. Висновки про вплив екзогенного NO на мітохондріальний метаболізм АФА робили на основі визна-

чення стабільних метаболітів: нітрит- та нітрат-аніонів ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) та загального вмісту S-нітрозотіолів, переважну частку яких становлять нітрозильовані високомолекулярні білки мітохондрій, що є основною формою депонування та джерелом NO у його метаболічних перетвореннях [5].

За одержаними результатами, збільшення кальцієвої ємності мітохондрій після введення НГ корелює з активацією мітохондріальної кальційзалежної ізоформи NOS, активність якої визначали за зміною вмісту L-цитруліну, який підвищувався до  $(6,3 \pm 0,7)$  нмоль/мг білка в ізольованих мітохондріях міокарда (рис. 2, а, 1). Спостерігається також дозозалежна активація

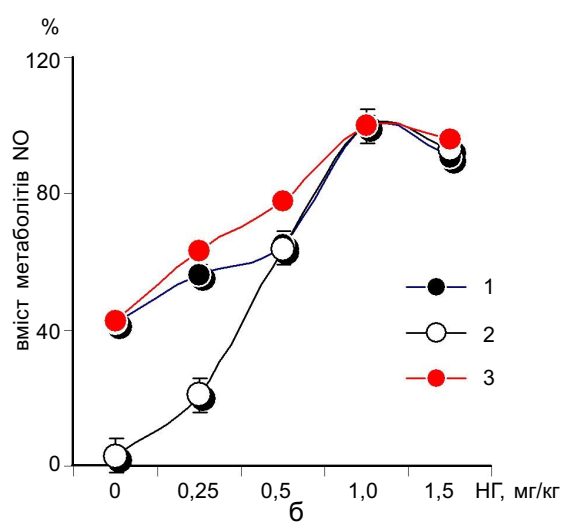
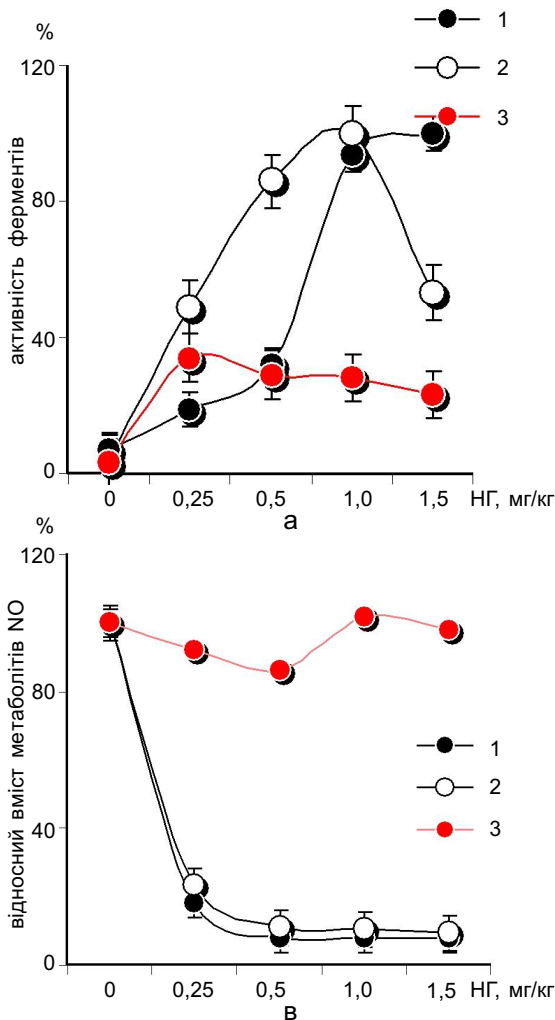


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину (НГ) на активність мітоNO-синтази та нітратредуктази (а), вміст метаболітів NO (б) та співвідношення вмісту похідних NO (в) у мітохондріях міокарда. На а: 1 – мітоNO-синтаза, 2, 3 – нітротредуктаза через 5 і 30 хв відповідно після введення НГ; на б: 1 –  $\text{NO}_2^-$ ; 2 –  $\text{NO}_3^-$ ; 3 – S-нітрозотіоли; на в: 1 –  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ; 2 – S-нітрозотіоли/ $\text{NO}_3^-$ ; 3 –  $\text{NO}_2^-$ /S-нітрозотіоли.  $n=4$ ;  $P<0,05$  зміни достовірні відносно контролю за відсутності НГ



нітратредуктази від  $2,7 \pm 0,3$  до  $(79,4 \pm 11,4)$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> (рис. 2,а, 2). Слід відмітити низьку базальну активність як мітоNOS, так і нітратредуктази, яка свідчить, що ці ферменти за фізіологічних умов знаходяться в стані субмаксимальної активності, котра може варіювати у широких межах, що є однією з передумов швидкої відповіді мітохондріальної системи NO на дію фізіологічних чинників, зокрема NO та Ca<sup>2+</sup> за дії НГ. Згідно з одержаними результатами при дії НГ *in vivo* основною передумовою активації нітратредуктази з напівмаксимальним ефектом у дозі 0,5 мг/кг є безпосереднє стрімке збільшення вмісту нітратаніона, субстрату нітрат-редуктазної реакції через 5 хв після введення препарату (див. рис. 2,б, рис. 3,а), яке відбувається насамперед через гідроліз НГ, а також через активацію мітоNOS, та синтез NO *de novo* (див. рис. 2,а, 1; рис. 3, 2) внаслідок блокування МП і посиленого надходження Ca<sup>2+</sup> до мітохондріального матриксу (див. рис. 1,а, 1). Відповідно спостерігається дозозалежне збільшення вмісту інших метаболітів NO: нітрит-аніона та S-нітрозотіолів, максимальний вміст яких становив  $(19,8 \pm 2,4)$  нмоль/мг і  $(1,53 \pm 0,03)$  нмоль/мг

білка (див. рис. 2,б, 1,3; рис. 3, 1,3).

Отже, активація біосинтезу NO *de novo* через активацію мітоNOS та за допомогою ферментативного перетворення НГ за участю альдегіддегідрогенази [19] посилює всі ланки метаболізму АФА (див. рис. 2, рис. 3,а). Проте, незважаючи на стрімкий приріст вмісту NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (від  $0,045 \pm 0,06$  до  $1,4$  мкмоль/мг  $\pm 0,1$  мкмоль/мг) та активацію нітратредуктази (див. рис. 2,а, б; рис. 3,а, 2,4), приріст вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> відносно незначний (від  $8,3 \pm 0,7$  до  $19,8$  мкмоль/мг  $\pm 0,4$  нмоль/мг) і співвідношення NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> змінюється на користь NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; кінцевого продукту окиснення NO (див. рис. 2,в, 1). Посилення всіх ланок метаболізму АФА під дією донора NO проявляється також і в збільшенні депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів, пул яких за абсолютними значеннями зростає більше ніж удвічі (від  $0,66 \pm 6,5$  до  $1,53$  нмоль/мг  $\pm 0,03$  нмоль/мг). Проте співвідношення нітрозилування мітохондріальних білків з утворенням нітрозотіолів та утворення NO<sub>3</sub><sup>-</sup> також змінюється на користь NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; що свідчить як про посилення окисативних процесів у мітохондріях, попри активацію нітратредуктази та ферментативного відновлення NO (див. рис. 2,в, 2;

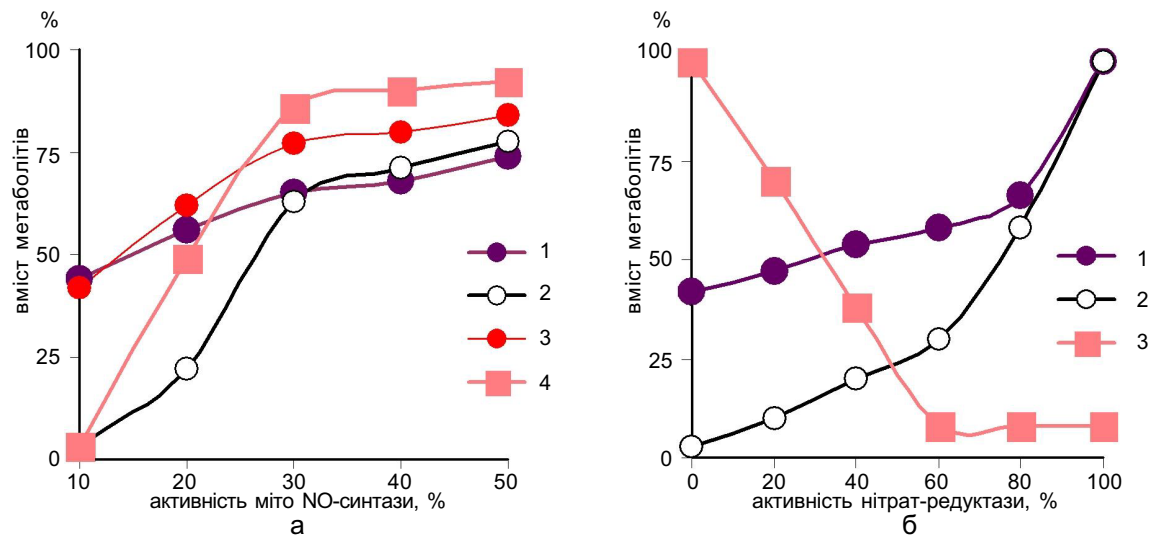


Рис. 3. Вміст метаболітів NO за умов активації мітоNO-синтази (а) та нітратредуктази (б) нітрогліцерином. На а: 1 – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2 – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 – S-нітрозотіоли 4 – нітратредуктаза; на б: 1 – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 2 – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. n=4; P<0,05 зміни достовірні відносно контролю, за відсутності нітрогліцерину; а, б: активність ферментів у відсотках відносно максимального значення

рис. 3,а, 4), так і про значний лаг-період у відновленні пулу  $\text{NO}_3^-$ , вивільнення якого спостерігається через 5 хв після введення НГ (див. рис. 1,б, 1,2).

Як зазначалося вище, посилення вільнорадикальних реакцій з утворенням АФК може відігравати значну, хоча ще малодосліджену роль у метаболізмі АФА. Тому для більш ґрунтового аналізу механізмів, що визначають основні шляхи метаболізму АФА за дії екзогенного NO, нами досліджено також вплив різних доз НГ на утворення основних продуктів неповного відновлення кисню: гідропероксиду ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) та гідроксил-радикала ( $\cdot\text{OH}$ ). Результати показують, що введення НГ значно активує утворення АФК (рис. 4, 1,2), що, як і метаболізм АФА, корелює з інгібуванням МП, посиленням надходженням  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондрій та активацією кальційзалежних дегідрогеназ [18] (див. рис. 1,а). Окрім посиленого утворення гідропероксиду та  $\cdot\text{OH}$ -радикала, спостерігається стрімкий приріст вмісту вільного заліза (див. рис. 4, 3), каталізатора перетворень АФК за відомими реакціями Фентона та Хабер-Вайса [19]:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ . За літературними даними, джерелом вільного заліза може бути окисна деградація мітохондріальних залізовмісних білків [11, 12], яка відбувається внаслідок посилення продукції АФК. Активація вільнорадикальних реакцій за участю останніх, посилена наявністю  $\text{Fe}^{2+}$  як каталізатора, корелює як зі стрімким збільшенням вмісту продуктів перекисації ліпідів – дієнових кон'югатів (див. рис. 4, 4), так і посиленням окисного метаболізму АФА з утворенням кінцевого продукту,  $\text{NO}_3^-$ , попри активацію нітратредуктази, відновної ланки циклу NO (див. рис. 2–3).

Аналіз одержаних результатів показує, що зі збільшенням дози НГ відбувається майже однаковий у відсотковому співвідношенні, помірний приріст вмісту  $\text{NO}_2^-$  та нітрозотіолів (див. рис. 2, б, 2,3). Натомість,

незважаючи на активацію нітратредуктази (див. рис.2, а, 2; рис.3, а, 4), спостерігається стрімке збільшення вмісту  $\text{NO}_3^-$  (див. рис. 2,б, 2; 3,а,б, 2). Це свідчить про посилення окисних процесів і корелює зі збільшенням продукції АФК (зокрема  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), вільного заліза і продуктів перекисного окиснення ліпідів (див. рис. 4, 1,3,4). Вивільнення заліза, як розлядалось вище, призводить до подальшої активації метаболізму АФК і посиленого утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикала (див. рис. 4, 2) внаслідок взаємодії заліза з гідропероксидом (реакція Фентона). Слід зазначити, що гіперпродукція високореакційних токсичних АФК, разом із одночасним значним збільшенням пулу  $\text{NO}_3^-$ , є вірогідним джерелом утворення пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ), оскільки нітратаніон є джерелом NO через його відновлення. Одночасна генерація значної кількості супероксиду в мітохондріях призводить до утворення пероксинітриту [29], який швидко метаболізується вільнорадикальним ( $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{OH}$ ), та/або нерадикальним шляхом ( $\text{ONOOH} \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$ ), що у свою чергу спрямовано

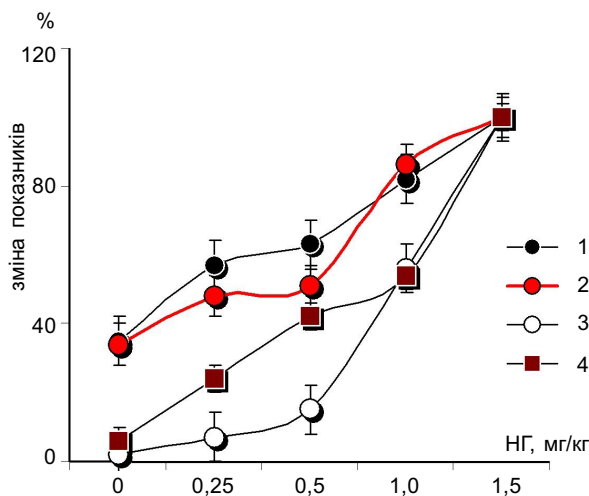


Рис. 4. Вплив нітрогліцерину (НГ) на вміст гідропероксиду (1), генерацію  $\cdot\text{OH}$ -радикала (2), вміст вільного заліза (3) та дієнових кон'югатів (4) через 5 хв після введення НГ у відсотках від максимальних значень.  $n=4$ ;  $P<0,05$  зміни достовірні відносно контролю

на підтримання високого рівня генерації  $\cdot\text{OH}$ -радикала та вмісту  $\text{NO}_3^-$ .

Результати визначення вмісту стабільних метаболітів АФА дають змогу проаналізувати зміни частки окремих продуктів у загальному пулі похідних NO та встановити основні джерела утворення  $\text{NO}_3^-$ . Так, виходячи із співвідношення вмісту  $\text{NO}_2^-$  та нітрозотіолів до вмісту  $\text{NO}_3^-$ , можна зробити висновок, що збільшення вмісту останнього відбувається головним чином внаслідок вичерпання пулу нітрозотіолів, S-нітрозотіоли  $\rightarrow \text{NO}_3^-$  та  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$  (див. рис. 2, в, 1–2). Водночас абсолютний приріст вмісту  $\text{NO}_2^-$ , який також спостерігається в мітохондріях міокарда після введення НГ (див. рис. 2, б, 1), відбувається не за рахунок нітрозотіолів, оскільки співвідношення  $\text{NO}_2^-/\text{S-нітрозотіоли}$  не зазнає достовірних змін (див. рис. 2, в, 3), а, можливо, є наслідком одночасної короткотермінової активації як нітратредуктази,  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ , так і мітоNOS,  $\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-$  (див. рис. 2, а, 1, 2; рис. 3, а, б, 1).

Отже, під дією екзогенного NO in vivo

внаслідок інгібування МП і посиленого надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондріального матриксу швидко активуються всі ланки циклу NO в мітохондріях: NOS (мітоNOS), нітратредуктазна та депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів. Як вже зазначалося вище, за літературними даними мітоNOS є кальційзалежною і безпосередньо активується внаслідок збільшення матричного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$ , що стрімко підвищує продукцію АФА одразу після введення НГ. Стрімкий приріст вмісту нітратаніона, субстрату нітрат-редуктазної реакції, слідом за активацією мітоNOS, у свою чергу призводить до стрімкого зростання нітратредуктазної активності в мітохондріях, що є відновною ланкою циклу NO. Слід зазначити, що найбільш помітна активація окисних процесів спостерігається в межах високих доз НГ (0,5–1,5 мг/кг), за яких уже надалі не збільшується кальційова ємність мітохондрій, проте значно підвищується вміст іонізованого заліза, яке є каталізатором утворення таких високотоксичних АФК, як  $\cdot\text{OH}$ -радикал (див. рис. 4, 2, 3). Отже, під

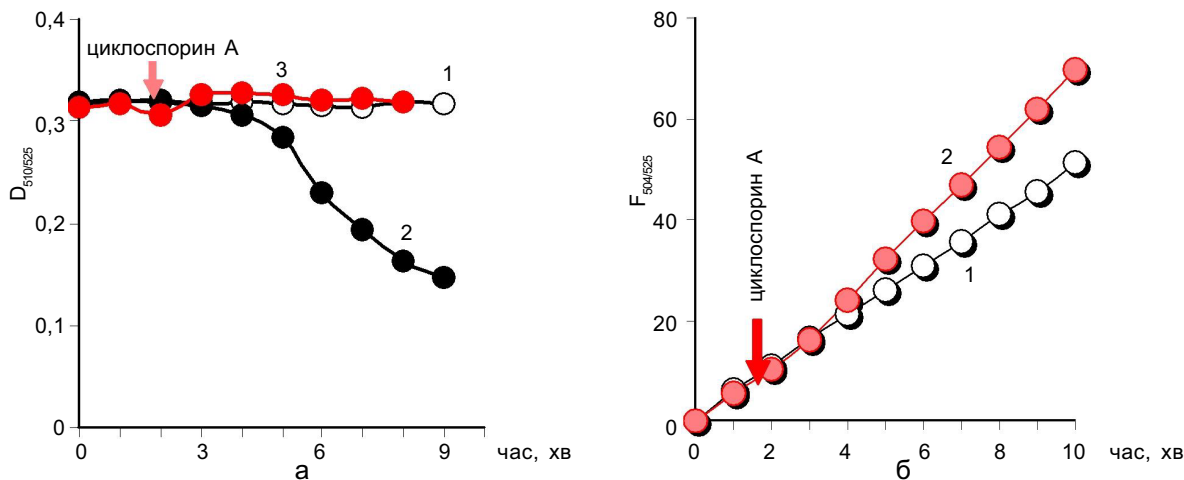


Рис. 5. Вплив оборотного відкриття циклоспоринчутливої пори на мембранний потенціал (а) та утворення активних форм кисню (АФК; б) у мітохондріях. Зміну мембранного потенціалу (а) визначали за наявності циклоспорину А (1) та без нього (2), а також за його внесення після відкриття пори, як показано стрілкою (3). Утворення АФК (б) реєстрували за зміною флуоресценції дихлорофлуоресцину за відсутності циклоспорину А (1) та за його додавання після відкриття пори, як показано стрілкою (2). За всією абсцисе: час, хв. За всією ординат – відносна величина світлопоглинання,  $D_{510/525}$ , ум.од.; відносні величини флуоресценції,  $F_{504/525}$ , ум.од., за вирахуванням базальної флуоресценції мітохондрій, яку визначали за наявності  $10^{-6}$  моль/л ротенону та  $10^{-6}$  моль/л CCCP

дією донора NO внаслідок блокування МП і підвищення кальцієвої ємності створюються передумови як для збільшення вмісту АФА через активацію мітоNOS, так і для прогресивного зростання виходу токсичних АФК при високих дозах НГ, уже без участі  $Ca^{2+}$ , а через каталізоване залізом окисно-відновне перетворення АФК з наступною регенерацією двовалентного заліза.

Отже, блокування МП оксидом азоту, утвореним конститутивно внаслідок активації мітоNOS *in vivo* підвищує матриксний вміст  $Ca^{2+}$  й посилює метаболізм АФК і АФА у мітохондріях міокарда за умов введення донора NO НГ. Особливість метаболічних перетворень NO в мітохондріях полягає у взаємодії пулів АФК і АФА, яка багаторазово посилює вільнорадикальні реакції за участю пероксинітриду,  $\cdot OH$ -радикала та вільного заліза. Таким чином, важлива фізіологічна функція МП полягає у запобіганні гіперпродукції АФА та АФК, яка може бути шкідливою для організму і сприяти розвитку патологічних станів. Цей висновок підтверджується результатами дослідження взаємозв'язку оборотного відкривання МП та утворення АФК у мітохондріях *in vitro*.

Так, за нашими результатами, відкривання МП супроводжується зменшенням продукції АФК в енергізованих мітохондріях порівняно з контролем, за наявності циклоспорину А, внаслідок часткової деполяризації мітохондрій (рис. 5,а, 2; 5,б, 1). Відомо, що високий мембранний потенціал є однією з причин гіперпродукції АФК, тоді як деполяризація зменшує їх утворення в мітохондріях [10, 26]. Відповідно, відкривання МП, яке супроводжується мембранною деполяризацією (див. рис. 5,а, 2), пригнічує утворення АФК (див. рис. 5,б, 1), тоді як її блокування циклоспорином А, слідом за відкриванням реполяризує мітохондрії та підвищує швидкість утворення АФК до контрольних значень (див. рис. 5,а,

3; б, 2), що корелює із ефектом посилення продукції вільнорадикальних похідних кисню внаслідок блокування МП оксидом азоту *in vivo* (див. рис. 1,в, 2; рис. 4, 1,2).

Одержані результати свідчать, що за умов посилення вільнорадикальних реакцій у мітохондріях внаслідок блокування МП включаються механізми взаємопосилення продукції АФА (утворення та розпад пероксинітриду) і АФК (утворення супероксиду, гідропероксиду та  $\cdot OH$ -радикала), яке призводить до загальної гіперпродукції вільнорадикальних похідних кисню та азоту. Так, гіперпродукція супероксиду внаслідок зростання пулу  $H_2O_2$ , як показано вище, посилює утворення  $NO_3^-$  через розпад пероксинітриду. Водночас з літературних джерел відомо, що гіперпродукція АФА також у свою чергу може призводити до гіперпродукції АФК через NO-залежне інгібування I та IV комплексів дихального ланцюга, зокрема, пероксинітридом та S-нітрозотіолами з наступним блокуванням транспорту електронів і посиленням виходу АФК [14]. Оскільки продукція останніх значною мірою контролюється мембранним потенціалом мітохондрій [10, 26], зрозуміло, що відкривання МП, яке призводить до часткової мембранної деполяризації внаслідок роз'єднання дихального ланцюга через посилення циклоспоринчутливого трансмембранного  $Ca^{2+}$ - $H^+$ -обміну [3], супроводжується пригніченням вільнорадикальних реакцій з утворенням АФК.

Отже, МП за нормальних фізіологічних умов є важливим чинником регуляції вільнорадикальних процесів у мітохондріях, яка здійснюється за допомогою модуляції енергетичного стану органел і матриксного вмісту  $Ca^{2+}$ . Її пригнічення екзогенним NO призводить до багаторазового посилення, в тому числі й взаємопосилення, продукції АФК і АФА, що й визначає особливості їхнього метаболізму в мітохондріях за дії фармакологічного донора NO НГ.

## ВИСНОВКИ

1. Під дією екзогенного NO *in vivo* внаслідок інгібування МП у мітохондріях міокарда та посиленого надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондріального матриксу активуються всі ланки циклу NO: NOS (мітоNOS), нітратредуктазної та депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів.

2. Особливості мітохондріального метаболізму АФК й АФА за дії донора NO полягають у багаторазовому посиленні, в тому числі й взаємопосиленні їх продукції через вивільнення заліза й каталізованої  $\text{Fe}^{2+}$  продукції токсичних АФК (зокрема, OH-радикала), а також утворення ·ОН-радикала внаслідок декомпозиції пероксинітриду.

3. МП *in vivo* є важливим регуляторним чинником мітохондріального метаболізму АФА й АФК. Її пригнічення оксидом азоту призводить до посилення вільнорадикальних реакцій у мітохондріях, що й визначає особливості перетворень АФК й АФА за умов введення фармакологічного донора NO НГ.

О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрба,  
Л.И. Колчинская, В.Ф. Сагач

### МЕТАБОЛИЗМ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА И КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ МИОКАРДА КРЫС В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА

Проанализированы особенности метаболизма активных форм азота и кислорода (АФА и АФК соответственно) в митохондриях миокарда крыс в условиях введения *in vivo* разных доз донора NO нитроглицерина (НГ). Показано, что его введение приводит к дозозависимому повышению кальциевой емкости митохондрий вследствие ингибирования циклоспоринчувствительной митохондриальной поры (МП), которое коррелирует с активацией митохондриальной кальцийзависимой изоформы NO-синтазы (NOS). Наблюдается также дозозависимая активация нитратредуктазы, однако количество образующегося нитрит-аниона ( $\text{NO}_2^-$ ) снижается, что отвечает изменению соотношения  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в пользу  $\text{NO}_3^-$ , конечного продукта метаболизма NO. Соотношение между нитрозилированием митохондриальных белков с образованием нитрозотиолов и выходом  $\text{NO}_3^-$  также изменяется в пользу последнего,

что свидетельствует об усилении окислительных процессов в митохондриях. Показано, что с повышением дозы НГ возрастает количество продуктов перекисного окисления липидов, маркера окислительного повреждения мембран. Установлено, что в основе оксидативного стресса лежит дозозависимое возрастание продукции АФК (гидроксилрадикала и митохондриального пула  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), а также повышение содержания свободного железа вследствие окислительной деградации митохондриальных железосодержащих белков. Взаимодействие железа с гидропероксидом по реакции Фентона с образованием гидроксилрадикала, а также свободнорадикальное разложение пероксинитрита, источником которого служит  $\text{NO}_3^-$ , является вероятной причиной многократного усиления продукции АФК, повышения перекисного окисления липидов и окисления пулов NO. Блокирование МП оксидом азота, в том числе и синтезированным в митохондриях *in vivo*, приводит к активации обоих звеньев цикла NO – NO-синтазного вследствие кальцийзависимой активации митохондриальной NOS, и нитратредуктазного, вследствие возрастания пулов  $\text{NO}_3^-$ . Повышение продукции АФК, многократно усиливается высвобождением железа, приводит к оксидативному стрессу митохондрий и сдвигу метаболизма АФА в сторону образования  $\text{NO}_3^-$ , несмотря на активацию нитратредуктазного звена цикла NO. Показано, что открытие МП *in vitro* уменьшает продукцию АФК, тогда как ее блокирование циклоспорином А восстанавливает их образование до контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют, что МП является важным звеном регуляции метаболизма АФК и АФА в митохондриях.

Ключевые слова: активные формы азота и кислорода, нитроглицерин, кальций, митохондриальная пора, митохондрии миокарда.

O.V. Akopova, Yu.P. Korkach, A.V. Kotsuruba,  
L.I. Kolchinskaya, V.F. Sagach

### REACTIVE NITROGEN AND OXYGEN SPECIES METABOLISM IN RAT HEART MITOCHONDRIA UPON ADMINISTRATION OF NO DONOR IN VIVO

Some aspects of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) metabolism in rat heart mitochondria under administration of different doses of nitroglycerine (NG) *in vivo* are discussed. It is shown that NG administration results in a dose-dependent increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria, due to the dose-dependent inhibition of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) *in vivo* and the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mitochondrial NOS. It was shown that NOS activity increases in accord with the increase of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria. The dose-dependent activation of nitrate-reductase is observed. However, nitrite production decreases dose-dependently, according to the change of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ratio on behalf of  $\text{NO}_3^-$ , the end product of NO transformations.

The relation between nitrosylation of mitochondrial proteins with the nitrosothiols formation and nitrate production also changes towards  $\text{NO}_3^-$ , which shows the activation of oxidation reactions in heart mitochondria after NG administration. Accordingly, dose-dependent increase in lipid peroxidation (LP) products is shown, the hallmark of the membrane damage in mitochondria. It is established that the cause of oxidative stress, besides the dose-dependent increase in ROS production (hydroperoxide, superoxide and hydroxyl-radical), lies in the increase of free iron content, derived from the oxidation of mitochondrial iron-containing proteins. The iron interaction with hydroperoxide following Fenton reaction as well as free-radical decomposition of peroxyxynitrite, derived from  $\text{NO}_3^-$  are the possible cause of manifold increase in ROS as well as LP production, and RNS oxidation to  $\text{NO}_3^-$ . Thus, NO-dependent MPTP blockage, due to NO synthesis in mitochondria in vivo, results in the activation of both constituents of NO-cycle: NOS-dependent, due to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of mitochondrial NOS, and nitrate-reductase-dependent, due to the increase in  $\text{NO}_3^-$  formation. However, increase in ROS production, augmented by the iron release, leads to the oxidative stress and the shift of RNS metabolism towards  $\text{NO}_3^-$  formation, in spite of the activation of nitrate-reductase-dependent pathway of NO-cycle. It is shown that reversible MPTP opening in vitro diminishes ROS production, whereas MPTP blockage by cyclosporine A restores the ROS formation to control level. Thus, MPTP-dependent inhibition of ROS overproduction both in vitro and in vivo, shows the importance of MPTP in the regulation of ROS and RNS metabolism in mitochondria.

Key words: reactive nitrogen and oxygen species, nitroglycerine, calcium, mitochondrial permeability transition pore, heart mitochondria.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Высвобождение кальция из митохондрий печени крыс в условиях коллапса мембранного потенциала // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, №3. – С. 68–75.
2. Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вплив оксиду азоту на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу в тканині аорти щурів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №1. – С. 27–35.
3. Акопова О.В. Роль митохондриальної пори в трансмембранному обміні кальція в митохондриях // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, №3. – С. 40–47.
4. Аликулов З.Л., Львов Н.П., Кретович В.Л. Нитрат-и нитритредуктазная активность молока // Биохимия. – 1980. – 45, №9. – С. 1714–1718.
5. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия. – 1998. – 63, №7. – С. 924–938.
6. Коркач Ю.П., Дудченко Н.О., Коцюруба А.В. Роль негемового заліза у протекторній дії екдистерону на розвиток стрептозототиніндукованої гіпоглікемії у щурів // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, №1. – С. 46–51.
7. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.А. Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка, 2005. – 198 с.
8. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
9. Akerman K.E.O., Wikstrom M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential // FEBS Lett. – 1976. – 68, №2. – P. 191–197.
10. Akopova O.V., Kolchinskaya L.I., Nosar V.I., Smirnov A.N., Malysheva M.K., Mankovska I.N., Sagach V.F. The effect of mitochondrial permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, № 6 – P. 46–55.
11. Brand M.D., Affourtit Ch., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // Free Rad. Biol. Med. – 2004. – 37, №6. – P. 755–767.
12. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell Biol. – 1990. – 68, №5. – P. 989–998.
13. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and cell responsiveness // Amer. J. Physiol. – 1993. – 264. – P. C1367–C1387.
14. Borutaite V., Brown G.C. S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production // Biochim. and Biophys. Acta. – 2006. – 1757. – P. 562–566.
15. 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.
16. 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. – C817–C833.
17. Conte D., Narindrasorosa K.S., Sarcar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generated free radicals and caused DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, №9. – P. 5125–5130.
18. McCormack J.G., Denton R.M. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport and the role of intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of energy metabolism // Dev. Neurosci. – 1993. – 15. – P. 165–173.
19. Daiber A., Wenzel P., Oelze M. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) – maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerine treatment // Chem. Biol. Interact. – 2009. – 178, №1–3. – P. 40–47.
20. Green L.C., David A.W., Glogowski J. Analysis of ni-

- trate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P. 131–138.
21. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts // FASEB J. – 1987. – **1**, № 5. – P. 358–364.
22. Hoppe U.C. Mitochondrial calcium channels // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – P. 1975–1981.
23. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – **141**, № 1. <sup>2</sup>P. 69–74.
24. Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide // Circulat. Res. – 2002. – **90**, №1. – P. 21–28.
25. Kakkar P., Singh B.K. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control // Mol. Cell Biochem. – 2007. – **305**. – P. 235–253.
26. 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.
27. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.-L., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death // FASEB J. – 1995. – **9**. – P. 1277–1287.
28. Lacerda L., Smith R.M., Opie L., Lecour S. TNF $\alpha$ -induced cytoprotection requires the production of free radicals within mitochondria in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes // Life Sci. – 2006. – **79**. – P. 2194–2201.
29. Radi R., Beckman J.C., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // Arch. Biochem. and Biophys. – 1991. – **288**. – P. 481–487.
30. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // J. Physiol. – 2000. – **529**, №1. – P. 37–47.

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

*Матеріал надійшов до редакції 07.12.2011*

А.С. Жуковська, А.М. Шиш, О.О. Мойбенко

## Вплив $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот на дихання та набухання мітохондрій серця при експериментальному цукровому діабеті

*У роботі вивчали вплив  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) на дихання, набухання мітохондрій серця щурів і жирнокислотний склад у гомогенатах тканини серця при цукровому діабеті (ЦД), який моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням 55 мг/кг стрептозотоцину. Виявлено, що застосування цих кислот підвищувало значення показника активного дихання мітохондрій  $V_3$  на 63,7 %, контрольованого дихання  $V_4$  на 30,7 % і швидкості фосфорилування на 18,9 % у тварин з стрептозоточиніндукованим ЦД. При цьому доведено їх здатність зменшувати набухання мітохондрій серця. Крім того, встановлено зміни жирнокислотного складу клітинних мембран серця за умов діабету під впливом  $\omega$ -3 ПНЖК. Отримані результати дають змогу зробити висновок, що останні позитивно впливають на функціональні показники мітохондрій, внаслідок стабілізації клітинних мембран серця щурів з ЦД.*

*Ключові слова: серце, мітохондрії,  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти, цукровий діабет.*

### ВСТУП

Велика розповсюдженість захворювань на цукровий діабет (ЦД) в українській популяції (більш як 1 млн 200 тис. хворих) і значна смертність від його ускладнень зумовлює необхідність подальшого дослідження патогенетичних механізмів розвитку уражень різних органів.

Найбільшу увагу при ЦД привертають порушення діяльності серцево-судинної системи [5, 10]. Вважається, що існує декілька механізмів, які зумовлюють зв'язок між діабетом і патологією діяльності останньої, а саме: порушення функції ендотелію, що можливо пов'язано з негативним впливом гіперглікемії на експресію та активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [30], активація вільнорадикальних процесів – збільшення утворення супероксиду, порушення функції АТФ-залежних калієвих каналів [4, 7]. Усе це підвищує чутливість тканин до ішемічного пошкод-

ження та суттєво змінює діастолічну складову та насосну функцію серця, що зрештою призводить до діабетичної кардіоміопатії.

Останнім часом деякі дослідники звертають увагу також на зміни жирнокислотного складу мембран кардіоміоцитів при стрептозоточиніндукованому ЦД [24, 28]. На цій моделі діабету було продемонстровано значне зниження вмісту  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) у фосфоліпідах серця і порушення співвідношення  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ПНЖК у бік збільшення перших. Додавання до раціону препаратів  $\omega$ -3 ПНЖК може відновлювати порушене співвідношення  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ПНЖК і сприяти зниженню ризику серцево-судинних ускладнень при ЦД. Нині відомі поодинокі дослідження, зокрема праця Ovide-Bordeaux і співавт. [25], де показано зміну не тільки жирнокислотного складу клітинних мембран кардіоміоцитів, а також мембран мітохондрій серця під дією стрептозотоцину. При цьому спостерігалось підвищення



вмісту  $\omega$ -6 і зниження  $\omega$ -3 ПНЖК. Проте у іншому дослідженні не виявлено статистично значимої різниці жирнокислотного складу у нормальних і «діабетичних» мітохондріях, виділених з серця [16]. Ці суперечливі дані дають підґрунтя для подальших досліджень зміни жирнокислотного складу мембран мітохондрій при ЦД. Небагато відомо про порушення функцій мітохондрій за умов цієї патології. Зокрема описані зміни показників дихання та набухання цих органел при стрептозотозиніндукованому ЦД [31]. Показано, що високий рівень окиснення жирних кислот у серці при цьому захворюванні значно підвищує його потребу в кисні [25]. Однак серед літературних джерел нам не вдалося виявити ґрунтовних досліджень, які описують роль  $\omega$ -3 ПНЖК у порушенні дихання та набухання ізольованих з серця мітохондрій при експериментальному ЦД.

Мета нашої роботи – вивчити вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на функцію мітохондрій за даних умов, а саме на показники дихання, набухання ізольованих мітохондрій серця щурів та жирнокислотний склад клітинних мембран серця при стрептозотозиніндукованому ЦД.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 140–200 г, віком 3 міс. ЦД моделювали одноразовим введенням стрептозотозину (“Sigma”, США). Препарат розводили 0,1-молярним цитратним буфером (рН 4,5) і вводили тваринам внутрішньоочеревинно із розрахунку 55 мг/кг. Розвиток гіперглікемії контролювали за підвищенням вмісту глюкози в крові, який вимірювали за допомогою стандартного набору (глюкометр і тест-смужки Accu-Chek Active, «Roche», Німеччина). Дослідження проводили на тваринах, вміст глюкози яких перевищував 14 ммоль/л. У роботі використовували 3 групи тварин: I – контрольні щури, (n=21), II – щури з ЦД (n=11), III – щури, яким після підтвердження зростан-

ня вмісту глюкози в крові почали давали препарат епадол протягом 4 тиж у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла (n=18). Епадол містить 45 %  $\omega$ -3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентасенової і докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру). Після декапітації швидко вилучали серця, вміщували їх у льодяний 0,9%-й розчин KCl до зупинки серця.

Мітохондрії виділяли з серця за методом диференційного центрифугування в середовищі виділення наступного складу (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 20, EGTA – 1 (рН 7,2-7,4) та 0,5%-го бичачого сироваткового альбуміну. Дихання і окисне фосфорилування в мітохондріях вивчали полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка та прилада оксиграф (“Hansatech”, Велика Британія). Середовище інкубації ізотонічного складу містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 3, сукцинат Na – 5 (рН 7,2–7,4) [3]. Як субстрат окиснення використовували сукцинат 10 ммоль/л. Активне дихання ізольованих мітохондрій індукували додаванням 200 мкмоль/л АДФ. На отриманих полярограмах (рис. 1) обчислювали: швидкість дихання у стані відносного спокою ( $V_2$ ), швидкість фосфорильованого та контрольованого дихання за Чансом у метаболічних станах 3 ( $V_3$ ) і 4 ( $V_4$ ), коефіцієнт дихального контролю ( $V_3/V_4$ ), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) та швидкість фосфорилування ( $V_\phi$ ). Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Дослідження набухання мітохондрій проводили спектрофотометричним методом. Суспензію мітохондрій поміщали у 1 мл інкубаційного середовища ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 3, сукцинат Na – 5 (рН 7,2–7,4) та за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження оптичної густини ізольованих мітохондрій до (за 5 хв) і після (через 10 хв) дії розчину  $\text{CaCl}_2$  при  $\lambda=520$  нм. Набухання мітохондрій індукували додаванням  $\text{CaCl}_2$  (кінцева концентрація  $10^{-4}$  моль/л). Концентрація білка становила

0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора, оптичну густину реєстрували при  $\lambda=520$  нм протягом 15 хв. Для підтвердження того, що набухання відбулося внаслідок відкриття мітохондріальної пори, пробу перед додаванням індуктора додатково інкубували 5 хв з класичним інгібітором – циклоспорином А  $10^{-5}$  моль/л («Fluka», Швеція).

Вміст жирних кислот у гомогенатах тканини серця визначали методом газової хроматографії. Гомогенат тканини серця переносили в мірну пробірку і заливали екстрагуючою сумішшю, далі проводили гідроліз і метильовання вищих жирних кислот фосфоліпідів тканин, двічі екстрагували метильовані жирні кислоти гексанефірною сумішшю і аналізували спектр жирних кислот на хроматографі серії „Цвет-500”. Кількісну оцінку спектра жирних кислот фосфоліпідів виконували за методом нормування вимірюванням площі піків метильованих похідних жирних кислот і визначення їх складу у відсотковому співвідношенні до загального вмісту жирних кислот, який приймали за 100 %.

Експериментальні результати обробляли з використанням критерію t Стьюдента та програми Origin.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При розвитку експериментального ЦД вміст глюкози у крові щурів достовірно збільшувався. Так, через 4 тиж у крові щурів II групи він становив  $33$  ммоль/л  $\pm$

$0,01$  ммоль/л ( $P<0,05$ ), у контролі (I група) –  $7,8$  ммоль/л  $\pm 0,2$  ммоль/л. Застосування  $\omega$ -3 ПНЖК (III група) призводило до «пом'якшення» гіперглікемії ( $19,2$  ммоль/л  $\pm 2,7$  ммоль/л,  $P<0,05$ ). Слід відмітити, що у тварин з розвиненим ЦД знижувалася маса тіла ( $177,5$  г  $\pm 8$  г щодо контролю  $232,85$  г  $\pm 6,15$  г,  $P<0,05$ ), а отримання  $\omega$ -3 ПНЖК запобігало цьому ( $219,7$  г  $\pm 12,65$  г,  $P<0,05$ ). У мітохондріях серця щурів дещо знижувався вміст білка. Водночас при вживанні препарату  $\omega$ -3 ПНЖК він відновлюється майже до контрольного рівня (табл. 1).

Розвиток ЦД (II група) призводив до суттєвого збільшення вмісту арахідонової кислоти, що досить негативно, (на 71 %,  $P<0,05$ ) та деякого зменшення  $\alpha$ -ліноленової кислоти порівняно з контролем. Вміст насичених і ненасичених жирних кислот змінювався різнонаправлено: лінолевої, пальмітинової і олеїнової дещо зменшувалася, а стеаринової незначно збільшувалася (табл. 2).

Застосування епадолу у тварин III групи змінює жирнокислотний склад гомогенату тканини серця. Поряд зі збільшенням вмісту  $\alpha$ -ліноленової кислоти більш ніж удвічі (на 157,2 %) значно зменшився вміст арахідонової кислоти (на 28,8 %;  $P<0,05$ ; див. табл. 2). Вміст інших насичених жирних кислот під впливом дієти, збагаченої  $\omega$ -3 ПНЖК, змінювався різноспрямовано та менш виражено. Встановлено статистично значиме підвищення вмісту суми насичених жирних кислот, мононенасиченої – олеїнової, поліненасиченої лінолевої кислоти в

Таблиця 1. Загальні показники досліджуваних груп щурів

Показники	Контроль (I група, n=21)	Цукровий діабет (II група, n=11)	Цукровий діабет і $\omega$ -3 ПНЖК (III група, n=18)
Маса тіла, г	232,85 $\pm$ 6,15	177,5 $\pm$ 8*	219,7 $\pm$ 12,65**
Глюкоза в крові, ммоль/л	7,8 $\pm$ 0,2	33 $\pm$ 0,01*	19,2 $\pm$ 2,7**
Вміст білка в мітохондріях, мг/мл	1,5 $\pm$ 0,17	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 \*вірогідно у порівнянні з контролем, \*\* вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом;  $P<0,05$ .

**Таблиця 2. Вміст (%) жирних кислот у гомогенаті тканини міокарда щурів при цукровому діабеті та за впливу  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК)**

Жирні кислоти	Контроль (I група)	Цукровий діабет (II група)	Цукровий діабет і $\omega$ -3 ПНЖК (III група)
Пальмітинова 16:0	18,45±0,4	14,45±0,5*	19±1,1**
Стеаринова 18:0	12,4±0,4	14,3±0,7	13,9±0,5
Олеїнова 18:1	9,9±0,35	7,3±0,35*	8,7±0,7
Лінолева 18:2	24,27±1,0	17,2±1,4*	19,5±1,8
$\alpha$ -ліноленова 18:3	0,4±0,1	0,35±0,05	0,9±0,3
Арахідонова 20:4	23,42±0,93	40,15±1,7*	28,6±3,5**
$\Sigma$ Жирних кислот			
насичених	36,7±1,4	34,95±0,6	42,2±2,4**
ненасичених	63,3±1,4	65,05±0,6	57,8±2,4**
поліненасичених	48,09±1,2	57,45±0,8*	49,1±2,9**

гомогенатах тканини серця. Слід відмітити суттєве збільшення вмісту  $\omega$ -3 ПНЖК, зокрема  $\alpha$ -ліноленової кислоти в III групі тварин. Більшістю дослідників зазначається, що жирні кислоти, які вбудовуються в мембрану внаслідок отримання тваринами  $\omega$ -3 ПНЖК можуть змінювати такі внутрішньоклітинні та мембранні функції, як потік іонів, транспорт електронів, активність мембранних ферментів, функції рецепторів і внутрішньоклітинних вторинних месенджерів. Так, Holguin і співавт. показали, що збагачення раціону  $\alpha$ -ліноленовою кислотою покращує автономну функцію серця і має антиаритмічний вплив [17]. Раніше Шиш та співавт. засвідчено,

що зниження вмісту арахідонової кислоти сприяє зменшенню кількості прозапальних цитокінів, тромбозу, набряку, вазоконстрикції коронарних судин, ішемічних та аритмогенних реакцій [2]. Також є відомості, що використання  $\omega$ -3 ПНЖК може сприяти більш ефективному використанню кисню і утилізації енергії через активацію метаболічного резерву серця [25].

Проведені нами дослідження показали, що при ЦД спостерігається зниження рівня АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда за умов окиснення сукцинату (табл. 3) у порівнянні з групою контролю (рис. 1, а). Вірогідно знижувалися значення показників  $V_3$  (на 41,12 %) і  $V_4$  (на 40,4 %)

**Таблиця 3. Показники АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда при цукровому діабеті за наявності в середовищі інкубації сукцинату в різних функціональних станах**

Показники	Контроль (I група, n=21)	Цукровий діабет (II група, n=11)	Цукровий діабет і $\omega$ -3 ПНЖК (III група, n=18)
Швидкість дихання, нмоль $O_2$ $xv^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка у стані			
відносного спокою ( $V_2$ )	50,1±4	47,3±3,9	53,7±4,4
фосфорильованого ( $V_3$ )	130,1±12,8	76,6±6,6*	125,4±12,4**
контрольованого ( $V_4$ )	36,6±5,3	21,8±4*	28,5±2,4
Дихальний контроль ( $V_3/V_4$ )	3,70±0,41	3,45±0,35	4,2±0,3
Коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О)	1,59±0,05	1,24±0,077*	1,56±0,082**
Швидкість фосфорилування, мкмоль АДФ $\cdot xv^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка ( $V_\phi$ )	113,3±10,3	70,2±14,2*	83,45±11

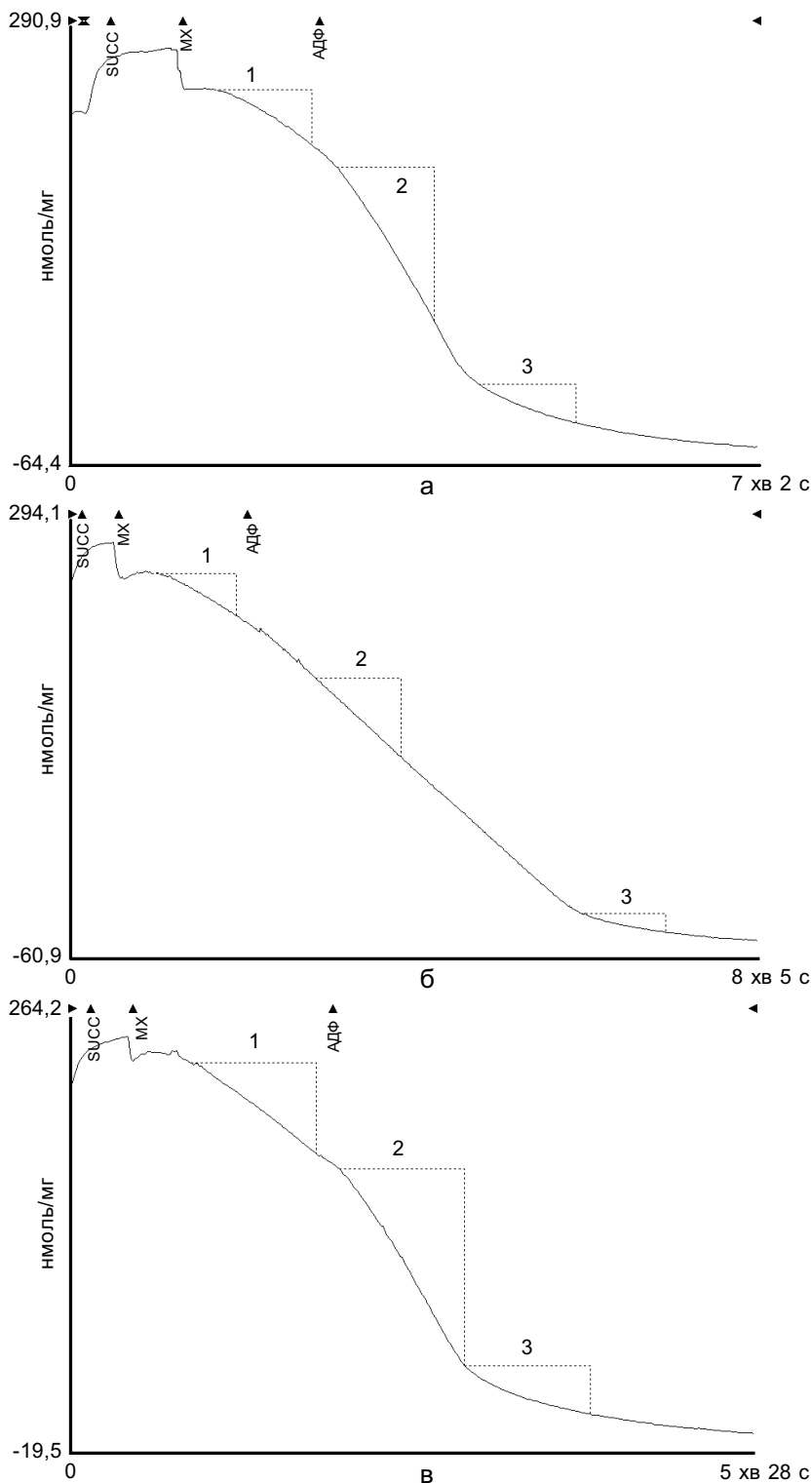


Рис. 1. Зміни показників АДФ-стимульованого дихання в мітохондріях контрольної групи (а), щурів з цукровим діабетом (б), тварин, що при цукровому діабеті отримували  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти (в) за наявності в середовищі інкубації сукцинату: 1 – швидкість дихання у стані  $V_2$ , 2 – швидкість дихання у стані  $V_3$ , 3 – швидкість дихання у стані  $V_4$

відповідно, та  $V_{\phi}$  (на 38,04%) і зменшення коефіцієнта АДФ/О (на 22 %) порівняно зі значеннями, отриманими для I групи тварин. Розвиток ЦД призводив до деякого зниження, на рівні тенденції, значень  $V_2$  та  $V_3/V_4$  у тварин II групи порівняно з контролем. Після отримання щурами  $\omega$ -3 ПНЖК відмічено статистично значиме підвищення показників  $V_3$  (на 63,7 %) і  $V_{\phi}$  (на 18,9 %) та  $V_4$  (на 30,7 %). А показники  $V_2$  та  $V_3/V_4$  майже не зазнавали змін порівняно зі значеннями при ЦД (див. рис. 1б,в).

Таким чином, у наших експериментах підтверджено порушення біоенергетичних функцій мітохондрій серця при стрептозоточиніндукованому ЦД. Вважають, що вони полягають в перевазі використання жирних кислот порівняно з глюкозою при синтезі енергії в серці, зниженні споживання кисню мітохондріями і збільшенні потреби в ньому [15]. Нами показано зниження  $V_3$  і  $V_4$  за Чансом та  $V_{\phi}$ , що може свідчити про уповільнення процесу утворення АТФ у мітохондріях серця [25], а також зменшення ефективності споживання кисню мітохондріями згідно зі значенням співвідношення АДФ/О. Наші результати узгоджуються з даними інших дослідників, в яких виявлено порушення засвоєння кисню, як наслідок оксидативного стресу при ЦД [13, 14]. Один з механізмів, який може пояснити ці порушення – розвиток, так званої, псевдогіпоксії [15]. Автори вважають, що остання виникає через порушення функціонування дихального ланцюга, а саме його другого комплексу – сукцинатдегідрогенази, у серцях при ЦД погіршується функція утилізації кисню, кардіоміоцити починають страждати від дефіциту енергії і серце активує механізми ендогенної кардіопротекції. При цьому спостерігається функціональне ремоделювання мітохондрій, зміна фізичних і хімічних властивостей мітохондріальних мембран і значне зниження подачі кисню до кардіоміоцитів. Водночас Mazumder і співавт. доводять, що ЦД

викликає роз'єднання окиснення і фосфорилювання мітохондрій, що відображає співвідношення  $V_3/V_4$  [20]. А за нашими результатами при стрептозоточиніндукованому ЦД (II група) цей показник майже не відрізнявся від контролю (I група).

Додавання до раціону  $\omega$ -3 ПНЖК посилює стійкість сердець за умов ЦД до порушень біоенергетичних функцій мітохондрій серця щурів, які виникли при стрептозоточиніндукованому ЦД.  $\omega$ -3 ПНЖК (III група) викликають вірогідне збільшення  $V_3$  та  $V_{\phi}$ , практично не впливаючи на  $V_3/V_4$  і наближаючи до контрольних значення коефіцієнта АДФ/О мітохондрій серця щурів з ЦД. З літературних даних відомо, що експозиція кардіоміоцитів з довголанцюговими жирними кислотами викликає пригнічення окиснення жирних кислот і активує GLUT 4 (білок-транспортер глюкози), що сприяє посиленню транспорту глюкози [20]. Суттєву роль також може відігравати активація ферменту карнітинпальмітоїлтрансферази 1, яка опосередковує транспорт довголанцюгових жирних кислот через мембрану мітохондрій. Адже описано зниження її активності при ЦД, що сприяє переключенню окиснення глюкози на жирні кислоти у міокарді і як наслідок призводить до зниження ефективності роботи серця [20]. Оскільки відомо, що при утворенні АТФ з глюкози серце потребує менше кисню, ніж при продукції її із жирних кислот. З'ясовано, що при стрептозоточиніндукованому ЦД пригнічується і активність ферменту  $\Delta$ 6-десатурази, що перешкоджає включенню докозагексаєнової кислоти до мембранних фосфоліпідів. Проте в разі введення її до раціону харчування, вона компенсує пригнічену активність ферменту через посилену інкорпорацію кислоти в мембрани серця, в тому числі – мітохондрій. Результати наших досліджень корелюють з даними про підвищення чутливості до інсуліну, що підтверджується вірогідним зниженням вмісту глюкози крові

в 1,7 раза і узгоджуються з літературними відомостями [25]. Також відомо, що при ЦД 1-го типу в мітохондріях спостерігається низька активність ферменту сукцинат-дегідрогенази [16]. Це підтверджено в нашому досліді вірогідним зниженням значення  $V_3$  із використанням як субстрату окиснення сукцинату – головного учасника II комплексу електронного транспортного ланцюга. Застосування  $\omega$ -3 ПНЖК призвело до вірогідного збільшення значення  $V_3$ . Припускаємо, що це можливо через активацію сукцинатдегідрогенази. Відомо, що сукцинат є ФАД-залежним субстратом, а при стрептозотоциніндукованому ЦД спостерігається виснаження запасів НАД. Тому для з'ясування ролі НАД-залежного дихання мітохондрій міокарда при ЦД у подальших дослідженнях буде оцінено показники дихання мітохондрій серця щурів за умов даної патології та при додаванні  $\omega$ -3 ПНЖК з використанням НАД-залежних субстратів.

На підтвердження отриманих результатів ми також дослідили вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на набухання ізольованих мітохондрій серця щурів. На рис. 2 зображено харак-

терні графіки реєстрації набухання мітохондрій з сердець дослідних тварин за контрольних умов, без дії індукторів. Нами показано, що у групі з ЦД підвищується величина набухання мітохондрій як контрольного показника, так і кальційіндукованого на 93,75 ( $P < 0,05$ ) та 11,18 % відповідно в порівнянні з контролем (рис. 3). Слід зазначити, що попередня інкубація мітохондрій з циклоспорином А за умов дії кальцію попереджувала їх набухання. Оскільки набухання мітохондрій є одним з показників відкриття мітохондріальної пори, можемо припустити, що набухання мітохондрій, яке ми спостерігали при ЦД може бути пов'язане з ним.

Обґрунтовуючи наші результати зазначимо, що в міокарді діабетичного серця зростають прояви стресу ендоплазматичного ретикулула, який призводить до набухання мітохондрій через відкриття мітохондріальної пори. Так, Мікі і співавт. було встановлено підвищення експресії маркерів стресу ендоплазматичного ретикулула – білків GRP78, GRP94 у міокарді щурів з ЦД [22]. У деяких інших сучасних

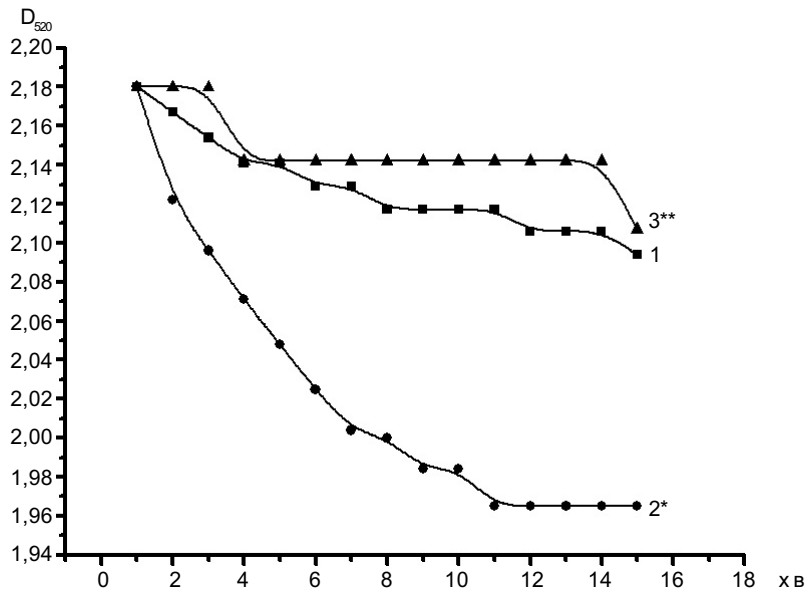


Рис. 2. Часова залежність світлопоглинання мітохондрій, виділених з сердець тварин з діабетом та за умов впливу  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК): 1 – I група (контроль), 2 – II група цукровий діабет (ЦД), 3 – III група ( $\omega$ -3 ПНЖК на фоні ЦД); \* вірогідно у порівнянні з контролем, \*\* у порівнянні з ЦД;  $P < 0,05$

дослідженнях також показано порушення кальційопосередкованої проникності мітохондріальної пори в мітохондріях, ізольованих з серця тварин з діабетом [8]. Зниження швидкості споживання кисню мітохондріями, пов'язане з порушенням роботи переносників електронів може бути також наслідком набухання мітохондрій і розриву їх зовнішніх мембран, внаслідок чого з цих органел виходить цитохром с, який є одним з переносників електронів по дихальному ланцюгу.

Зміна жирнокислотного складу клітинних мембран серця (ІІІ група) викликала зниження показника контрольного набухання мітохондрій на 51,61 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з групою ЦД (ІІ група; рис. 2, 3). Реакція мітохондрій на наявність  $\text{Ca}^{2+}$  у щурів ІІІ групи була на 45,91 % ( $P < 0,05$ ) нижчою щодо ІІ групи. Встановлено, що застосування циклоспорину А, класичного інгібітора мітохондріальної пори, знижувало оптичну густину ізольованих мітохондрій на 38,37 % у тварин ІІІ групи у порівнянні зі значеннями у тварин з діабетом. Таким чином, можна припустити, що  $\omega$ -3 ПНЖК запо-

бігають відкриванню мітохондріальної пори.

За деякими даними [9] відомо, що безпосередня інкубація ізольованих мітохондрій з вільними ПНЖК (арахідоною, докозапентаєною, ейкозапентаєною) стимулює набухання та деполяризацію їх мембран, мітохондріальна пори виявились підвищено чутливою до циклоспорину. Автори вважають, що вплив ПНЖК може бути частково зумовлений активацією каспазного шляху через вивільнення цитохрому с у поєднанні з деполяризацією мітохондріальної мембрани.

У наших експериментах  $\omega$ -3 ПНЖК виявляли протекторну дію відносно кальцій-індукованого набухання мітохондрій, попередивши його. Відомо, що за умов оксидативного стресу різко зростає проникність мітохондріальної мембрани внаслідок зміни властивостей її фосфоліпідів. Через це збільшується колоїдно-осмотичний тиск з наступним набуханням і можливим розривом зовнішньої мембрани мітохондрій, що призведе до руйнування органел. Уже показано, що  $\omega$ -3 ПНЖК мають антиоксидантний і мембраностабілізуювальний ефек-

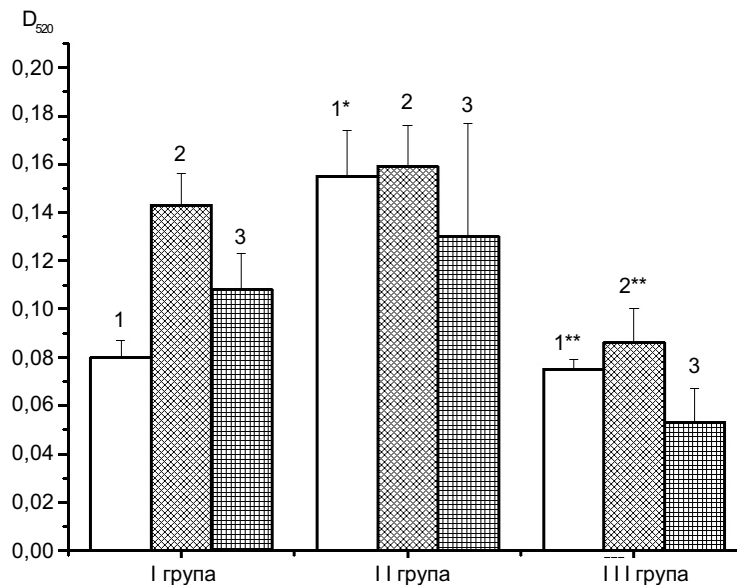


Рис. 3. Вплив  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот на зміну світлопоглинання мітохондрій з тканини серця щурів з діабетом за умов дії кальцію: 1 – контроль (мітохондрії в безкальцієвому середовищі), 2 – дія  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л), 3 – преінкубація мітохондрій з циклоспорином А ( $10^{-5}$  моль/л); \* вірогідно у порівнянні з контролем, \*\* вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом;  $P < 0,05$

ти. Це може пояснювати протекторну дію при індукції набухання. Раніше отримані дані підтверджують, що ці кислоти підвищують стійкість клітинних мембран до пошкоджувальної дії стресорних факторів [6]. Основою цього, на нашу думку, є збереження цілісності клітинних мембран та значною мірою зменшення руйнування мітохондрій у серці під впливом  $\omega$ -3 ПНЖК. Зважаючи на літературні дані і наші результати можна припустити, що  $\omega$ -3 ПНЖК зменшують набухання мітохондрій за допомогою пригнічення вільнорадикальних процесів і проявів стресу ендоплазматичного ретикула в міокарді.

Таким чином, застосування  $\omega$ -3 ПНЖК викликало вірогідне підвищення показників фосфорильованого дихання та спряження його з фосфорилуванням, що свідчить про зростання ефективності споживання кисню мітохондріями, ізольованими з серця щурів зі стрептозоточиніндукованим ЦД.

Отримані результати дають змогу припустити, що одним із позитивних механізмів  $\omega$ -3 ПНЖК є здатність інгібувати набухання мітохондрій у серці, отже вони можуть бути використані для корекції та профілактики дисфункцій мітохондрій за умов різноманітної серцево-судинної патології на фоні ЦД.

Збагачення раціону  $\omega$ -3 ПНЖК призводить до зміни жирнокислотного складу клітинних мембран серця за умов експериментального ЦД, що свідчить про виражені протекторні властивості досліджуваних кислот і перспективність подальших досліджень із застосування їх при цьому захворюванні.

**А. С. Жуковская, А. М. Шиш, А. А. Мойбенко**

#### **ВЛИЯНИЯ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ДЫХАНИЕ И НАБУХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

В работе изучали влияние  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) на дыхание, набухание митохондрий сердца крыс и жирнокислотный состав в гомогенатах ткани сердца при сахарном диабете (СД), который моделировали

однократным внутривентральным введением 55 мг/кг стрептозотоцина. Выявлено, что применение этих кислот повышало значение показателя активного дыхания митохондрий  $V_3$  на 63,7 %, контролируемого дыхания  $V_4$  на 30,7 % и скорости фосфорилирования на 18,9 % у животных со стрептозоточининдуцированным СД. При этом доказана их способность снижать набухание митохондрий сердца. Кроме того, установлено изменения жирнокислотного состава клеточных мембран сердец в условиях диабета под влиянием  $\omega$ -3 ПНЖК. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что  $\omega$ -3 ПНЖК положительно влияют на функциональные показатели митохондрий, вследствие стабилизации клеточных мембран сердца крыс с СД.

Ключевые слова: сердце, митохондрии,  $\omega$ -3 полиненасыщенные жирные кислоты, сахарный диабет.

**A.S. Zhukovska, A.M. Shysh, A.A. Moybenko**

#### **STUDY OF THE IMPACT OF OMEGA-3 PUFA ON FATTY ACID COMPOSITION OF HEART, BREATH AND SWELLING OF MITOCHONDRIA OF THE HEART IN DIABETES**

We studied the influence of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on respiration, swelling of rat heart mitochondria and changes in rat heart fatty acid composition in tissue homogenate in rats with streptozotocin induced diabetes mellitus (diabetes), which was induced by single intraperitoneal administration of 55 mg/kg streptozotocin. We found that application of these acids increased parameters of active mitochondrial respiration  $V_3$  at 63.7%, controlled breathing  $V_4$  at 30.7% and the rate of phosphorylation by 18.9% in animals with experimental diabetes. We proved their ability to reduce swelling of mitochondria in heart at streptozotocin induced diabetes. In addition, we established changes of fatty acid composition of cell membranes in hearts under diabetic conditions with  $\omega$ -3 PUFAs influence. The obtained results allow to conclude that the  $\omega$ -3 PUFA have a positive effect on functional parameters of mitochondria due to stabilization cell membranes of rat heart with diabetes.

Key words: heart, mitochondria,  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, diabetes.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кукоба Т. В., Шиш А. М., Мойбенко О. О., Коцюруба А. В., Харченко О. В. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на перекисне окиснення ліпідів // Фізіол. журн. – 2005. – 51, №1. – С. 26–32.
2. Мойбенко А. А., Досенко В. Е., Пархоменко А. Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – 520 с.



3. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори шурів // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 5. – С. 3–13.
4. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Пивовар С.М., Досенко В.Є., Ягупольський Л.М. АТФ-чутливі калієві канали та зміни їх функціональної активності при цукровому діабеті, викликаному введенням стрептозотцину // Там само. – 2003. – **49**, № 6. – С. 22–30.
5. Тронько М.Д. Аналіз, пріоритети, шляхи виконання державної цільової програми «Цукровий діабет» на 2009–2013 роки // *Здоров'я України.* – 2010. – № 18. – С. 42–43.
6. Шиш А.М., Кукоба Т.В., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Модифікація жирнокислотного складу мембран як фактор захисту міокарда при стресорному пошкодженні серця // *Фізіол. журн.* – 2005. – **6**, №2. – С. 17–23.
7. Al-Rawi N.H. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics // *Diab. Vasc. Dis. Res.* – 2011. – № 8. – P. 22–28.
8. Anderson E.J., Rodriguez E., Anderson C.A., Thayne K., Chitwood W.R., Kypson A.P. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – **6**, № 1. – P. 118–124.
9. Arita K., Kobuchi H., Utsumi T., Takehara Y., Akiyama J., Hortone A.A., Utsumi K. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – **62**. – P. 821–828.
10. Boudina S., Abel E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2010. – № 11. – P. 31–39.
11. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J., Kobori H., Moreno C., Navar L.G. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**, № 5. – P. 797–804.
12. 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.
13. Di Lisa F., Kaludercic N., Carpi A., Menabr R., Giorgio M. Mitochondria and vascular pathology // *Pharmacol. Reports.* – 2009. – № 1. – P.123–130.
14. Duchon M.R. Roles of mitochondria in health and disease // *Diabetes.* – 2004. – **53**. – P. 96–102.
15. Ferko M., Habodaszova D., Waczulikova I., Mujkosova J., Kucharska J., Sikurova L., Ziegelhoffer B., Styk J., Ziegelhoffer A. Endogenous protective mechanisms in remodelling of rat heart mitochondria membranes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetes // *Physiol. Res.* – 2008. – **57**. – P. 67–73.
16. Grinblat L., Pacheco Bolanos L.F., Stoppani A.O.M. Decreased rate of ketone-body oxidation and decreased activity of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase and succinyl-CoA: 3-oxo-acidCoA-transferase in heart mitochondria of diabetic rats // *Biochem. J.* – 1986. – № 240. – P. 49–56.
17. Holguin F., Tellez-Rojo M. M., Lazo M., Manino D., Schwartz J., Hernandez M., Romieu I. Cardiac autonomic changes associated with fish oil vs soy oil supplementation in the elderly // *Chest.* – 2005. – **127**. – P. 1102–1107.
18. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **270**, № 5. – P. 840–845.
19. Lashin O., Romani A. Mitochondria respiration and susceptibility to ischemia-reperfusion injury in diabetic hearts // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – **420**. – P. 298–304.
20. Mazumder P.K., O'Neill B.T., Roberts M.W., Buchanan J., Yun U.J., Cooksey R.C., Boudina S., Abel E.D. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts // *Diabetes.* – 2004. – **53**. – P. 2366–2374.
21. McCord J., Fridovich I. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // *Biochem. J.* – 1982. – **203**, № 3. – P. 551–558.
22. Miki T., Miura T., Hotta H., Tanno M., Yano T., Sato T., Terashima Y., Takada A., Ishikawa S., Shimamoto K. Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase-3 $\alpha$ -mediated suppression of mitochondrial permeability transition // *Diabetes.* – 2009. – **58**. – P. 2863–2872.
23. Nishimura M., Akira N., Toshiaki K., Ohtsuka K., Takahashi H., Yoshimura M. Eicosapentaenoic acid stimulates nitric oxide production and decrease cardiac noradrenaline in diabetic rats // *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.* – 2000. – **27**. – P. 618–624.
24. Ovide-Bordeaux S., Bescond-Jacquet A., Grynberg A. Cardiac mitochondrial alterations induced by insulin deficiency and hyperinsulinaemia in rats: targeting membrane homeostasis with trimetazidine // *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.* – 2005. – **32**. – P. 1061–1070.
25. Ovide-Bordeaux S., Grynberg A. Docosahexaenoic acid affects insulin deficiency- and insulin resistance-induced alterations in cardiac mitochondria // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – **286**. – P. 519–527.
26. Pepe S., McLennan P.L. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and posts ischemic recovery of contractile function // *Circulation.* – 2002. – **105**. – P. 2303–2308.
27. Risør U., Willett W.C., Hub F.B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes // *Prog. Lipid. Res.* – 2009. – **48**. – P. 44–51.
28. Rizza S., Tesaro M., Cardillo C. Galli A., Iantorno M., Gigli F., Sbraccia P., Federici M., Quon M.J., Lauro D. Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type

- 2 diabetes // Atherosclerosis. – 2009. – **206**. – P. 569–574.
29. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent nitric oxide syntases // FEBS Lett. – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
30. Srinivasan S, Hatley M.E., Bolick D.T., Palmer L.A., Edelstein D., Brownlee M., Hedrick C.C. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells // Diabetologia. – 2004. – **47**. – P. 1727–1734.
31. Tomita M., Mukae S., Geshi E., Umetsu K., Nakatani M., Katagiri T. Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart // Jap. Circ. J. – 1996. – **60**. – P. 673–682.

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

*Матеріал надійшов  
до редакції 05.09.2011*

O.A. Shepel, V.E. Dosenko, T.Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy

## Expression of TNF- $\alpha$ mRNA, but not of TNF- $\alpha$ receptors mRNA, is detected in single murine oocyte and decreases during oocyte meiotic maturation: single-cell RT-PCR data

*Background:* The present study was conducted to investigate the expression of TNF- $\alpha$  and its receptors (types I and II) in both oocytes with germinal vesicle and the first polar body in mice.

*Methods:* Oocytes with intact germinal vesicle were isolated from mouse ovaries and subjected to *in vitro* maturation to obtain oocytes forming the first polar body. A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine the expression of TNF- $\alpha$  and its receptors at mRNA level. *Results:* mRNA TNF- $\alpha$  was expressed in single oocytes and its level was decreasing during transition from germinal vesicle to the first polar body stage. At the same time the expression of TNF-receptors was not observed in single oocyte.

*Conclusions:* These data are the important link in understanding of the molecular mechanisms regulating oocyte maturation as well as follicle development.

*Key words:* tumor necrosis factor  $\alpha$ , tumor necrosis factor receptors, oocytes, oocyte meiotic maturation

### BACKGROUND

Understanding of the molecular mechanisms underlying oogenesis is quite important for both reproductive biology and regenerative medicine. Deciphering the complex series of regulatory events that occur during early oocyte development depends partly on the ability to accurately define gene expression pattern for certain stages of gamete development. Prior to ovulation, the metabolism of the oocyte is characterized by active gene expression. Subsequent to fertilization, a complex series of gene regulatory events occur that result in fundamental alterations in nuclear transcription [1, 24]. However, the interplay between the factors mediating development is not yet understood, precluding the elaboration of precise regulatory pathways. Gaining insight into how early developmental processes are controlled and mediated will require specific information regarding molecular events during

this period. Some authors have detected expression of certain genes in oocytes [3, 5, 10, 15, 20, 25, 26]. However the technique of gene expression definition in single cells practically was not used. It is connected with a number of methodical problems particularly extraction of RNA in single cells. The scarcity of the biological material derived from single cell (oocyte is about 100 micrometers in diameter) and related to low quantity of available cells (only a few to tens of oocytes from each ovulation in mice) has hampered the molecular analysis of oocytes. Classical techniques of RNA analysis such as  $C_{ot}$  (the product of nucleic acid concentration and time) value assays [2], Northern blotting [22] and dot- or slot-blots [23] lacked the sensitivity to detect mRNA in single cells. Due to its unprecedented sensitivity, the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) allows the detection of low quantity mRNA in

© O.A. Shepel, V.E. Dosenko, T.Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy

individual cells [16]. Several studies have been performed on single oocytes [4, 7, 8, 9, 13]. But these works did not relate to cytokines which play an essential role in oogenesis and folliculogenesis.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is the cytokine produced not only by various cells of the immune system, but also by various cells in the reproductive system. It was demonstrated that oocytes are an important source of TNF- $\alpha$  and that the onset of oocytic TNF- $\alpha$  expression occurs around birth. TNF-receptors are localized on oocytes, granulosa cells and interstitial cells allowing for the possibility of autocrine or paracrine actions of TNF- $\alpha$  [11]. Several studies have shown that TNF- $\alpha$  plays an important role in follicular and luteal development, ovulation, and modulation of theca and granulosa steroidogenesis [19, 21]. Although the presence, modulation, and possible role of TNF- $\alpha$  has been extensively explored in ovarian function, the expression of TNF- $\alpha$  and its receptors has not been investigated in the murine single oocytes on two stages of oocyte development (germinal vesicle-intact oocytes and oocytes forming the first polar body). Thus, we first examined the expression of TNF- $\alpha$  and its receptors (types I and II) in both oocytes with germinal vesicle and the first polar body in mice. Obtained data indicated that mRNA TNF- $\alpha$  was only expressed in single oocyte and its level decreased during transition from germinal vesicle to the first polar body stage. That is the important link in understanding of the molecular mechanisms regulating oocyte maturation as well as follicle development.

## METHODS

### *Animals and cells*

Experiments were carried out on mature CBA female mice (18-20 g) in accordance with the International Principles of the European Convention concerning the protection of vertebrates. Mice were kept on a 12-12 hour light-

dark cycle with free access to food and tap water.

Follicles were separated from ovaries and then cumulus-oocyte cellular complexes were extracted mechanically. Oocytes were mechanically denuded from cumulus cells by repeated pipetting [5] with flame-drawn glass pipette tips, whose inner diameters were slightly larger than oocytes' diameters [18]. Oocytes were washed three times with maturation medium. Atretic oocytes, as determined by their granulated appearance, were separated from healthy oocytes [12]. In order to obtain oocytes with the first polar body oocytes were cultured for 20 hours at 37°C in DMEM ("Sigma", USA), supplemented with 5% fetal bovine serum, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml); ("Sigma", USA). Thus in experiments were used oocytes with intact germinal vesicle just after collection from their follicles and oocytes forming the first polar body after 20 hours of culture.

### *RNA Extraction and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Total RNA was obtained from fully grown, germinal vesicle-intact single oocytes and oocytes forming the first polar body using the mRNA extraction kit (Invitrogen, USA). Isolation of total RNA from oocyte before reverse transcription (RT) was absolutely necessary because RNA in oocyte formed complexes with specific message ribonucleoprotein.

First-strand cDNA synthesis was carried out by incubating of total mRNA from single oocyte with 0.2  $\mu$ g/ml Random Hexamer primer (Fermentas, Lithuania) at 70°C for 1 min. A reverse transcription reaction was then prepared with the above mRNA/primer mix in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM of each dNTPs (Fermentas, Lithuania), 40 U of RNase inhibitor RiboLock (Fermentas, Lithuania), 20 U M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania). The samples were incubated at 37°C for 2 h.

First-strand cDNA of single oocytes obtained after RT was used for carrying out of two rounds of polymerase chain reaction (PCR) with application of specific primers for TNF- $\alpha$ , its receptors and house keeping gene GAPDH (tabl). Reaction mixture for amplification was containing 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U Taq DNA polymerase, 200  $\mu$ M of each dNTP, 5 pM each of primers (or 20 pM at carrying out of the second round of amplification) and deionized water to receive total reaction volume of 25  $\mu$ l. At carrying out of the second round of PCR were used the same components of reaction mixture with addition in each test-tube of 7  $\mu$ l product from the first round of PCR. The first round of amplification consisted of 25 cycles and it was carried out with the following conditions: denaturation at

94 °C for 20 sec, annealing at 54 °C for 60 sec and then elongation at 72°C for 60 sec. Thermophprofile for the second round was: 94°C for 40 sec, 55 °C for 60 sec and 72°C for 60 sec repeated for 45 cycles for all pair of primers. PCR was performed in thermocycler GeneAmp System 2700 (“Applied Biosystems”, USA). Each experiment was repeated nine times. The resulting PCR products were then assessed by electrophoresis in 2.5% agarose gel containing ethidium bromide. Visualisation and luminance estimate were performed with application of transilluminator and software ViTran (“Biokom”, Russia).

The data were evaluated statistically using Student’s t-test for pairwise comparisons. Values were considered significantly different if \*P < 0.05.

**List of PCR primers used for experiments and PCR product size**

Gene	Sequence of primers (forward, reverse)	Product size/bp
TNF- $\alpha$	forward 5'- ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC -3' reverse 5'- GTC TGG GCC ATA GAA CTG AT -3'	230
TNFR-I	forward 5'-CTG CTG TCA CTG GTG CTC CTG-3' reverse 5'-CAC ACA CCG TGT CCT TGT CAG-3'	349
TNFR-II	forward 5'-GCA AGC ACA GAT GCA GTC TG-3' reverse 5'-GGT CAG AGC TGCTAC AGA CG-3'	597
GAPDH	forward 5'-GGGTGTGAACCA CGAGAAATATGA-3' reverse 5'-AGCACCAGTGGATG CAGGGATGAT-3'	240

## RESULTS

To detect expression of TNF- $\alpha$  gene at mRNA level we developed an amplification scheme to generate mRNA from single oocytes separated from preovulatory follicles. In each of nine experiments, RT-PCR amplification of RNA obtained from oocytes with germinal vesicle yielded a band 230 bp in size. Amplification of RNA obtained from oocytes forming the first polar body also produced identical results (Figure). Figure shows the results of TNF- $\alpha$  mRNA expression in oocytes.

The results of analysis of PCR products showed that intensity of the band corresponding to TNF- $\alpha$  mRNA expression in oocytes at the stage of germinal vesicle was significantly higher than in oocytes at the stage of the first polar body. In two of nine samples of

oocytes with the first polar body TNF- $\alpha$  mRNA expression was undetected.

Expression of mRNA for TNF receptors in single oocytes was not detected in our experiments.

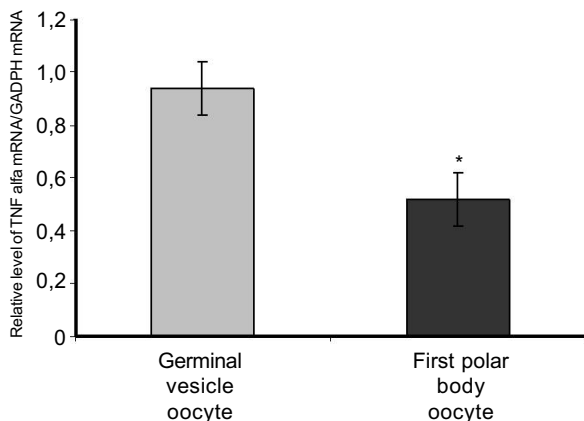
## DISCUSSION

The aim of this investigation was to develop the method of gene expression detection in single murine oocytes and to identify the expression of TNF- $\alpha$  and its receptor systems within oocyte at two development stages (at the stage of germinal vesicle and the first polar body), that would provide important clues for understanding regulation of this cytokine and perhaps its potential function in ovary.

Our results indicate that TNF- $\alpha$  is expressed at the mRNA level in single murine

oocytes at both stages of their development. TNF- $\alpha$  mRNA expression in oocytes at the stage of germinal vesicle was significantly higher than in oocytes at the stage of the first polar body.

TNF- $\alpha$  expression decrease in the first polar body oocytes can be explained by sufficient quantity of the synthesised protein due to higher expression of its gene at the stage of germinal vesicle. However it is only hypothesis as we measured cytokine mRNA and not its protein, but transcription and translation of cytokines are independently regulated, therefore mRNA detection might not mirror cytokine production. We suggest also that the difference in TNF- $\alpha$  gene expression between two stages of oocyte development means that TNF- $\alpha$  has paracrine action on meiotic resumption that requires further research. At the same time our early results have indicated that TNF- $\alpha$  in high concentrations (relevant for inflammatory processes) exerts an inhibitory influence on meiotic maturation both in denuded oocytes and in cumulus oocyte complex [17].



Expression of TNF- $\alpha$  mRNA in single murine oocytes at different stages of meiotic maturation. A. Electrophoresis of PCR products of GAPDH gene: lanes 1-5 – oocytes with germinal vesicle; lanes 6-10 – oocytes with the first polar body. B. Electrophoresis of PCR products of TNF- $\alpha$  gene: lanes 1-5 – oocytes with germinal vesicle; lanes 6-10 – oocytes with the first polar body. C. Relative level of TNF- $\alpha$  mRNA / GAPDH mRNA expression in single murine oocytes

We have not detected the expression of TNF-receptors in single oocytes at the mRNA level. At the same time other scientists detected TNFR-II expression in human oocytes by RT-PCR, but not in single cells [14] and expression of both TNF-receptors in murine oocytes by immunohistochemistry [6]. In our case the absence of TNF-receptor gene expression probably can be explained: 1) by using of different research methods; 2) by species features; 3) by various stages of oocyte development (in our studies we have used oocytes obtained from large preovulatory follicles); 4) by extremely small quantity of mRNA, which is generated as a result of gene activation. The lack of TNF-receptor gene expression results in reduced influence on oocyte during oogenesis. It has been observed that TNF-induced death of oocytes requires TNFR-II. This was demonstrated by the fact that TNF- $\alpha$  did not kill oocytes in TNFR-II<sup>-/-</sup> ovaries [6]. It is possible that TNF- $\alpha$  is produced by oocyte for activation of TNF-receptors on other cells (cumulus, granulosa), but not for influence on oocyte directly or TNF- $\alpha$  action on oocytes is realized by activation of other TNF-receptors.

## CONCLUSION

Thus our results indicate that TNF- $\alpha$  is expressed at the mRNA level in single murine oocytes at both stages of their development. TNF- $\alpha$  mRNA expression in oocytes at the stage of germinal vesicle was significantly higher than in oocytes at the stage of the first polar body. We suggest that the difference in TNF- $\alpha$  mRNA expression between two stages of oocyte development means that TNF- $\alpha$  could have effect on meiotic resumption (for example, through paracrine interactions between granulose cells and oocyte), but this assumption needs additional studies.

*The work was supported with a grant "Fundamental bases of genomics and proteomics" of National Academy of Sciences of Ukraine.*

**О.А. Шепель, В.Е. Досенко,  
Т.Ю. Вознесенська, Р.І. Янчій**

**АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ мРНК ФАКТОРА  
НЕКРОЗУ ПУХЛИН  $\alpha$  ТА ЙОГО  
РЕЦЕПТОРІВ У ПОДИНОКИХ ООЦИТАХ  
МИШЕЙ ПІД ЧАС МЕЙОТИЧНОГО  
ДОЗРІВАННЯ: РЕЗУЛЬТАТИ ПОЛІМЕРАЗНОЇ  
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

Досліджено експресію мРНК фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) та його рецепторів I і II типу у поодиноких ооцитах на стадіях зародкового пухирця та метафази II (формування першого полярного тільця) у мишей лінії СВА методом полімеразної ланцюгової реакції. Виявлено експресію мРНК ФНП- $\alpha$ , але не його рецепторів, на обох стадіях відновлення мейозу, при цьому в ооцитах із зародковим пухирцем її рівень був вірогідно вищим, ніж у клітинах з першим полярним тільцем, що вказує на можливу роль ФНП- $\alpha$  у мейотичному дозріванні. Отримані результати є важливими для розуміння молекулярних механізмів, які регулюють оогенез і фолікулогенез.

Ключові слова: фактор некрозу пухлин  $\alpha$ , рецептори фактора некрозу пухлин  $\alpha$ , ооцити, мейотичне дозрівання ооцитів.

**Е.А. Шепель, В.Е. Досенко,  
Т.Ю. Вознесенская, Р.И. Янчий**

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ФАКТОРА  
НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ  $\alpha$  И ЕГО  
РЕЦЕПТОРОВ В ЕДИНИЧНЫХ ООЦИТАХ  
МЫШЕЙ ВО ВРЕМЯ МЕЙОТИЧЕСКОГО  
СОЗРЕВАНИЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Исследовано экспрессию мРНК фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и его рецепторов I и II типа в единичных ооцитах на стадиях зародышевого пузырька и метафаза II (формирование первого полярного тельца) у мышей линии СВА методом полимеразной цепной реакции. Обнаружена экспрессия мРНК ФНО- $\alpha$ , но не его рецепторов, на обеих стадиях возобновления мейоза, при этом в ооцитах с зародышевым пузырьком ее уровень был достоверно выше, чем в клетках с первым полярным тельцем, что указывает на возможную роль ФНО- $\alpha$  в мейотическом созревании. Полученные результаты являются важным звеном в понимании молекулярных механизмов, регулирующих оогенез и фолликулогенез.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей  $\alpha$ , рецепторы фактора некроза опухолей  $\alpha$ , ооциты, мейотическое созревание ооцитов.

*Ин-т физиологии им. А.А.Богомольца  
Национальной академии наук Украины*

**REFERENCES**

1. Aoki F., Worrall D.M., Schultz R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo // *Dev. Biol.* – 1997. – **181**. – P. 296–307.
2. Davidson E.H., Hough B.R. High sequence diversity in the RNS synthesized at the lampbrush stage of oogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1969. – № 63. – P. 342–349.
3. Escobar M.L., Echeverria O.M., Sanchez-Sanchez L., Mendez C., Pedernera E., Vazquez-Nin G.H. Analysis of different cell death processes of prepubertal rat oocytes in vitro // *Apoptosis.* – 2010. – **15**, № 4. – P. 511–526.
4. Fiorenza M.T., Mangia F. Quantitative RT-PCR amplification of RNA in single mouse oocytes and preimplantation embryos // *Biotechniques.* – 1998. – **24**, № 4. – P. 618–623.
5. Goncalves J.S., Vannucchi C.I., Braga F.C., Paula-Lopes F.F., Milazzotto M.P., Assumpcao M.E., Visintin J.A. Oestrogen and progesterone receptor gene expression in canine oocytes and cumulus cells throughout the oestrous cycle // *Reprod. Domest. Anim.* – 2009. – **44** (Suppl 2). P. 239–242.
6. Greenfeld C.R., Roby K.F., Pepling M.E., Babus J.K., Terranova P.F., Flaws J.A. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 is an important mediator of TNF alpha function in the mouse ovary // *Biol. Reprod.* – 2007. – **76**, № 2. – P. 224–231.
7. Jones G.M., Song B., Cram D.S., Trounson A.O. Optimization of a microarray based approach for deriving representative gene expression profiles from human oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* – 2007. – **74**, № 1. – P. 8–17.
8. Li S.S., Liu Y.H., Tseng C.N., Singh S. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – **340**, № 1. – P. 48–53.
9. Livingston T., Rich K., MacKenzie S., Godkin J.D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes // *Anim. Reprod. Sci.* – 2009. – **116**, № 3–4. – P. 265–273.
10. Malcuit C., Trask M.C., Santiago L., Beaudoin E., Tremblay K.D., Mager J. Identification of novel oocyte and granulosa cell markers // *Gene Expr. Patterns* – 2009. – **9**, № 6. – P. 404–410.
11. Marcinkiewicz J.L., Balchak S.K., Morrison L.J. The involvement of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an intraovarian regulator of oocyte apoptosis in the neonatal rat // *Front. Biosci.* – 2002. – № 7. – P. d1997–2005.
12. Marcinkiewicz J.L., Krishna A., Cheung C.M., Terranova P.F. Oocyte tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat // *Biol. Reprod.* – 1994. – **50**, № 6. – P. 1251–1260.
13. Monti M., Redi C. Oogenesis specific genes (Nobox,

- Oct4, Bmp15, Gdf9, Oogenesis1 and Oogenesis2) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development // *Mol. Reprod. Dev.* – 2009. – **76**, № 10. – P. 994–1003.
14. Naz R.K., Zhu X., Menge A.C. Expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors type I and type II in human oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* – 1997. – **47**, № 2. – P. 127–133.
15. Pandey A., Gupta S.C., Gupta N. Effect of FSH and LH hormones on oocyte maturation of buffalo and gene expression analysis of their receptors and Cx43 in maturing oocytes // *Zygote*. – 2010. – № 4. P. 1–4.
16. Rappolee D.A., Brenner C.A., Schultz R., Werb Z. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos // *Science*. – 1988. – **241**. – P. 1823–1825.
17. Shepel O.A., Yanchiy R.I. Reactivating action of a small dose of anti ovarian antibodies on oocyte meiotic maturation of mice in conditions of oppressing influence of interleukin-2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  // *Top. Probl. Pharmaceut. and Med. Sci. and Pract.* – 2007. – № 2. – P. 245–251.
18. Shimada M., Ito J., Yamashita Y., Okazaki T., Isobe N. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes // *J. Endocrinol.* – 2003. – **179**, № 1. – P. 25–34.
19. Spaczynski R.Z., Arici A., Duleba A.J. Tumor necrosis factor-alpha stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells // *Biol. Reprod.* – 1999. – **61**, № 4. – P. 993–998.
20. Taft R.A., Denegre J.M., Pendola F.L., Eppig J.J. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap // *Biol. Reprod.* – 2002. – **67**, № 3. – P. 953–960.
21. Terranova P.F. Potential roles of tumor necrosis factor-alpha in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum // *Domest. Anim. Endocrinol.* – 1997. – **14**, № 1. – P. 1–15.
22. Thomas P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – № 77. – P. 5201–5205.
23. White B.A., Bancroft F.C. Cytoplasmic dot hybridization // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**. – P. 8569–8572.
24. Worrall D.M., Ram P.T., Schultz R.M. Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP // *Development*. – 1994. – **120**. – P. 2347–2357.
25. Zeng F., Schultz R.M. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes // *Biol. Reprod.* – 2003. – **68**, № 1. – P. 31–39.
26. Zuccotti M., Merico V., Sacchi L., Bellone M., Brink T.C., Stefanelli M., Redi C.A., Bellazzi R., Adjaye J., Garagna S. Oct-4 regulates the expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes // *Hum. Reprod.* – 2009. – **24**, № 9. – P. 2225–2237.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*  
E-mail: elena-shepel@ukr.net

*Received 18.11.2011*



Н.Л. Куценко, Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев

## Активатор ППАР-γ піоглітазон знижує експресію транскрипційного фактора NF-κB та апоптоз в мононуклеарних клітинах CD64<sup>+</sup> крові *in vitro*

*Для дослідження впливу активатора ППАР-γ на експресію транскрипційного фактора NF-κB і процеси апоптозу мононуклеарні периферичної крові (МНПК) інкубували за наявності піоглітазону в кінцевій концентрації 10, 30 та 100 мкмоль/л. Експресію NF-κB, CD64 та процеси апоптозу визначали методом проточної цитофлюориметрії, використовуючи відповідні моноклональні антитіла. Розвиток апоптозу вивчали за допомогою анексину V та йодиду пропідіуму. Активація ППАР-γ призводила до зменшення кількості CD64<sup>+</sup>-клітин та максимальних рівнів експресії цих рецепторів, дозозалежного зменшення концентрації NF-κB у суспензії МНПК та серед CD64<sup>+</sup>-клітин. Аналізуючи апоптоз відмічено зменшення апоптотичних клітин (AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>-клітин). Отримані результати дають змогу довести, що активація ППАР-γ задіяна в регуляції апоптозу МНПК та експресії транскрипційного фактора NF-κB, що свідчить про залучення ППАР-γ у регуляцію активності NF-κB, який відіграє одну з провідних ролей в реалізації запалення, онкогенезу тощо.*

*Ключові слова: рецептори, які активують проліферацію пероксисом-γ, піоглітазон, транскрипційний фактор NF-κB, CD64<sup>+</sup>-клітини, апоптоз.*

### ВСТУП

Транскрипційний ядерний фактор κB (NF-κB) контролює біологічно важливі функції клітин, у тому числі процеси вродженої та набутої імунної відповіді, а його активація – експресію багатьох генів, які кодують продукцію цитокінів, хемокінів, рецепторів імунокомпетентних клітин, молекул клітинної адгезії, факторів росту та реактантів гострої фази [2, 8]. Серед численних регуляторів каскадів, пов'язаних з NF-κB, чільне місце посідають ядерні рецептори, що активують проліферацію пероксисом (ППАР). Протизапальна функційна активність ППАР-γ сьогодні привертає увагу науковців різних галузей медицини. В дослідях *in vivo* ППАР-γ продемонстрували здатність зменшувати тяжкість перебігу експериментального коліту, артриту, зменшувати продукцію муноглобуліну M (IgM) [17].

Важливим є те, що активація ППАР-γ при зв'язуванні з лігандами в моноцитах призводить до пригнічення продукції прозапальних цитокінів – ФНП-α, інтерлейкінів 1 і 6 (ІЛ-1, ІЛ-6) та оксиду азота, матриксних металопротеїназ, індукує апоптоз моноцитів/макрофагів тощо [3, 12].

CD64 є високоафінними рецепторами до IgG1 та IgG3 з високою експресією на поверхні моноцитів і макрофагів, а також меншою мірою на еозинофілах і нейтрофілах. Доведена їх участь (на поверхні лейкоцитів) у процесах інтеграції імунної відповіді з залученням вроджених і набутих факторів, що є важливим механізмом для реалізації фагоцитозу бактеріальних частин та імунних комплексів. Нові дані про властивості цих рецепторів були отримані Devraj і співавт. [10]. Вони показали участь FcγRI (CD64) у процесах інтерналізації C-реактивного білка ендотеліальни-

© Н.Л. Куценко, Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев

ми клітинами з наступним синтезом прозапального ІЛ-8 і молекул адгезії ICAM-1 та VCAM-1, тобто в патогенезі прозапальних реакцій із залученням ендотеліальних клітин.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу активатора ППАР- $\gamma$  піоглітазону на експресію NF- $\kappa$ B і процеси апоптоза у мононуклеарах периферичної крові *in vitro*.

## МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження була гепаринізована кров 10 практично здорових жінок віком від 25 до 40 років. Згідно з їхньою згодою та заключенням комісії з біоетики, забір крові проводили натщесерце, стабілізували розчином гепарину. Як агоніст ППАР- $\gamma$  використовували гідрохлорид піоглітазону в кінцевій концентрації 10, 30 та 100 мкмоль/л, який попередньо був розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) [9]. Для дослідження використовували суспензію мононуклеарів периферичної крові (МНПК), яку отримували в асептичних умовах за стандартною методикою [5] центрифугуванням на градієнті густини фікол-верографіну з наступним відмиванням стерильним фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), а потім ресуспендуванням до концентрації  $2 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл у середовищі RPMI-1640 з глютаміном ("Sigma", США), з 10%-ю інактивованою телячою сироваткою („Bio Mark Inc", Львів Україна), з 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (Україна) при 37°C за наявності піоглітазону, або ДМСО, або ФСБ у контрольних групах. Суспензії свіжевиділених МНПК і через 18 год інкубації двічі відмивали для подальшого визначення апоптозу та експресії NF- $\kappa$ B.

Для визначення експресії NF- $\kappa$ B CD64<sup>+</sup> клітинами МНПК інкубували за наявності моноклональних антитіл до поверхневих антигенів CD64, мічених йодидом пропідіуму ("Caltag", США). Відмиті клітини

фіксували розчином ("Caltag", США). Пермеабілізацію проводили за допомогою розчину ("Caltag", США) за наявності моноклональних антитіл до субодиниці молекули p65 NF- $\kappa$ B ("BD Biosciences Pharmingen", США). Після одноразової відмивки до ресуспендованих клітин додавали вторинні моноклональні антитіла до Ig миші, мічені флюоресцеїнізотіоціонатом ("Caltag", США).

Розвиток апоптозу визначали за допомогою анексину V, міченого флюоресцеїнізотіоціонатом ("Caltag", США), та за допомогою флюоресцентного барвника – йодиду пропідіуму ("Sigma", США) [19].

Для виявлення змін використовували суспензію МНПК безпосередньо після виділення клітин та інкубації за наявності піоглітазону, ДМСО та ФСБ.

Апоптоз та фенотип лімфоцитів визначали, аналізуючи проби на проточному цитофлюориметрі EPIC LX-MCL ("Beckman Coulter", США), використовуючи програму System II™ software.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили використовуючи пакет програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) з розрахунком вибіркового середнього, вибіркового стандартного відхилення, вірогідності отриманих результатів Т-тестом для парнозв'язаних величин (t). Результати наведено у вигляді вибіркового середнього (M), вибіркового стандартного відхилення (STD). Критичний рівень значимості під час перевірки статистичних гіпотез приймали за 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час отримання клітиною регуляторного стимулу активується NF- $\kappa$ B через фосфорилювання інгібіторного протеїну специфічними І $\kappa$ B-кіназами, що індукує дисоціацію комплексу І $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. Вільні активні гетеродимери транспортуються в ядро і приєднуються до сайтів  $\kappa$ B усередині промот-

орів та енхансерів, функціонуючи як активатори транскрипції [13]. Роль активуючих агентів, зазвичай, відіграють різноманітні фактори росту і цитокіни, бактеріальні токсини та вірусні агенти, а також зовнішні пронекротичні фактори.

Слід відмітити, що в контрольній пробі після 18 год. інкубації в поживному середовищі та за наявності ДМСО зменшилася кількість клітин CD64<sup>+</sup> у суспензії МНПК, при цьому в 1,5 раза збільшився рівень максимальної експресії відповідних рецепторів (таблиця). Як видно з результатів, активація ППАР-γ у найбільшій експериментальній дозі призводила до вірогідного зменшення кількості клітин, що експресували CD64 та максимальних рівнів експресії цих рецепторів. Під час досліджень концентрації у суспензії МНПК. Нами показано, що під впливом ДМСО зменшувалася кількість NF-kB у інкубаційному середовищі. При цьому на фоні дії піоглітазону, починаючи з 30 мкмоль/л, що відповідає середньотерапевтичній дозі, експресія цього показника прогресивно зменшувалась. Аналогічне дозозалежне зменшення числа NF-kB і рівня його експресії спостерігалось серед клітин

CD64<sup>+</sup>. Аналізуючи процеси апоптозу серед МНПК під впливом активатора ППАР-γ, що відображає кількість клітин AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> у суспензії, відмічено дозозалежне зменшення апоптотичних клітин. При цьому максимальні вірогідні зміни спостерігалися під впливом піоглітазону в кінцевій концентрації 100 мкмоль/л (вдвічі зменшення кількості клітин AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>).

Нещодавно було показано, що ліганд ППАР-γ – троглітазон здатний пригнічувати активацію NF-kB, що спричинено пригніченням процесів фосфорилування NF-kB p65 [16]. При цьому виявлено зменшення експресії адгезивних молекул ендотеліальних клітин, що регулюється NF-kB. Крім того, авторами був зафіксований базальний рівень фосфорилування p65 у контрольних пробах, що зумовлює та пояснює роль фонові активності NF-kB у підтримці сталості циркулюючих клітин і блокуванні апоптозу [14]. Важливо, що активатори рецепторів ППАР-γ мають протизапальну дію, неопосередковану NF-kB. Агоністи ППАР-γ здатні успішно впливати на запальний процес через ППАР-γ-незалежні шляхи, а саме через пригнічення субодиниці IKK-β з наступною супре-

**Вплив піоглітазону на рівень експресії ядерного фактора kB і процесів апоптозу в суспензії мононуклеарів периферичної крові**

Показник	Свіжевиділені мононуклеари периферичної крові	Контроль 1 (18год інкубації)	Контроль 2 (диметилсульфоксид)	Піоглітазон в кінцевій концентрації, мкмоль/л		
				10 мкмоль/л	30 мкмоль/л	100 мкмоль/л
Кількість клітин CD64 <sup>+</sup>	88,3±6,3	83,5±9,9	79,4±10,6	79,6±11,2	79,5±9,6	50,7±23,3**
Максимальний рівень експресії CD64	3,7±2,1	5,7±1,0*	5,8±2,9	5,6±1,0	4,6±1,3	1,6±0,6**
Кількість клітин NF-kB <sup>+</sup>	51,3±37,1	71,8±22,8	54,8±31,4	54,9±29,5	51,1±35,3	33,2±28,8
Максимальний рівень експресії NF-kB	1,6±0,8	2,8±1,2*	2,7±1,8	2,3±1,2	2,1±1,0	1,8±1,0
Кількість клітин CD64 <sup>+</sup> NF-kB <sup>+</sup>	58,0±36,2	83,5±24,3	69,0±31,9	69,6±32,8	64,1±37,4	62,5±22,0
Кількість клітин AnV <sup>+</sup> PI <sup>+</sup>	14,8±2,5	3,9±2,5*	6,8±3,9*	5,6±2,9	4,5±4,2	3,7±2,2**

\* вірогідність відмін у порівнянні з показниками в суспензії свіжевиділених мононуклеарів периферичної крові; \*\* вірогідність відмін у порівнянні з показниками контрольних проб (диметилсульфоксид).

сією активності ядерного транскрипційного фактора [1, 15]. Є дані, що троглітазон активує ERK1/2 та блокує синтез c-fos, модулюючи протизапальні ефекти. Під час інкубації дендритних клітин, стимульованих ангіотензином II, за наявності агоністів ППАР- $\gamma$  пригнічується їх активність внаслідок залучення кінази мітогенактивованого білка (МАРК) і NF- $\kappa$ B, що підтверджує роль цих факторів та рецепторів ППАР- $\gamma$  у регуляції імунологічних і запальних процесів [21]. Нещодавно були отримані нові дані щодо впливу активації ППАР- $\gamma$  на ліпополісахаридіндуковану продукцію прозапальних цитокінів макрофагами [6]. Так, під впливом піоглітазону зменшувалася продукція пухлинонекротизуючого фактора  $\alpha$  і мРНК секреторної фосфоліпази A2. Це зумовлено підтвердженням пригніченням активності NF- $\kappa$ B і його транслокації в ядро ліпополісахаридіндукованих макрофагів мишей, що має перспективну протизапальну роль при атеросклерозі.

Дані вивчення лігандіндукованої активації дендритних клітин на локалізацію субодиниці c-Rel в ядрі свідчать про її зниження за наявності троглітазону. Це обґрунтовує участь c-Rel у пригнічувальних ефектах агоністів ППАР- $\gamma$  під час дозрівання дендритних клітин [20]. Крім того, авторами показано залучення МАРК- та NF- $\kappa$ B-сигнальних шляхів у регуляції TLR- та ППАР- $\gamma$ -опосередкованої сигналізації дендритних клітин, що може бути новим механізмом негативної регуляції реалізації імунологічних реакцій [11, 20].

У дослідженнях з вивчення апоптозу пухлинних клітин, індукованого агоністами ППАР- $\gamma$ , показано залучення 3- $\beta$ -кінази в процеси синтезу глікогену. Це є необхідним елементом для активації NF- $\kappa$ B, який відіграє важливу роль у передачі проліферативних сигналів пухлинних клітин. Стимуляція ППАР- $\gamma$  троглітазоном призводила до пригнічення росту пухлини прямої кишки (зниження активності антиапоптотичного білка Bcl-2, Cdk2, Cdk4, циклін B1, D1 та

E; підвищення активності проапоптотичних білків, каспази-3, каспази-9 та Вах) внаслідок зменшення активності NF- $\kappa$ B та експресії 3- $\beta$ -кінази синтезу глікогену [7].

За сучасними даними NF- $\kappa$ B має важливе регуляторне значення при запаленні та розвитку аутоімунних реакцій. Нині відомо декілька десятків ендо- та екзогенних агентів, здатних пригнічувати активність NF- $\kappa$ B [18, 22]. До цієї групи препаратів належать кортикостероїди, імунодепресанти тощо. Є дані, що такі нестероїдні препарати, як аспірин, повністю пригнічують I- $\kappa$ B-кіназний комплекс (ІКК- $\beta$ ), а сульфосалазін здатний блокувати транспорт NF- $\kappa$ B в ядро за рахунок пригнічення деградації I- $\kappa$ B [4].

У цілому, аналізуючи вищевказані ефекти активації ППАР- $\gamma$ , можна виділити два основних можливих напрямки її реалізації: опосередковано пригніченням МАРК-сигнального шляху [11] та пригніченням NF- $\kappa$ B-опосередкованої сигналізації. У той же час, визначено окремі ланки NF- $\kappa$ B-сигнального шляху, які можуть підлягати інгібіторному впливу агоністів ППАР- $\gamma$  – зокрема, це зниження фосфорилування p65 NF- $\kappa$ B [16], пригнічення активності ІКК- $\beta$  [15] та вплив на ядерну локалізацію c-Rel [20].

Отримані результати дозволяють довести, що активація ППАР- $\gamma$  задіяна в регуляції апоптозу МПНК та експресії транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B, що свідчить про залучення ППАР- $\gamma$  в регуляції активності NF- $\kappa$ B, який відіграє одну з провідних ролей у реалізації запалення, онкогенезу тощо.

**Н.Л. Куценко, Л.Э. Веснина, И.П. Кайдашев**

**АКТИВАТОР ППАР- $\gamma$  ПИОГЛИТАЗОН СНИЖАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF- $\kappa$ B И УГНЕТАЕТ ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА В МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ IN VITRO**

Для исследования влияния активатора ППАР- $\gamma$  на экспрессию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и процессы

апоптоза мононуклеары периферической крови (МНПК) инкубировали в присутствии пиоглитазона в конечных концентрациях 10, 30 и 100 мкмоль/л. Экспрессию NF-κB, CD64 и процессы апоптоза определяли, используя соответствующие моноклональные антитела, аннексин V и йодид пропидиума, методом проточной цитометрии. Активация ППАР-γ приводила к уменьшению количества CD64<sup>+</sup>-клеток и максимальных уровней экспрессии этих рецепторов, дозозависимо уменьшению концентрации NF-κB в суспензии МНПК и среди CD64<sup>+</sup>-клеток. Анализируя процессы апоптоза отмечено уменьшение количества AnV<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>-клеток. Полученные результаты позволяют доказать, что активация ППАР-γ вовлечена в регуляцию апоптоза МНПК и экспрессию транскрипционного фактора NF-κB. Это свидетельствует о вовлечении ППАР-γ в регуляцию активности NF-κB, который играет одну с главных ролей в реализации воспаления, онкогенеза и др.

Ключевые слова: рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом-γ, пиоглитазон, транскрипционный фактор NF-κB, CD64<sup>+</sup>-клетки, апоптоз.

**N.L. Kutsenko, L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev**

**PIOGLITAZONE, AN ACTIVATOR OF PPAR-γ,  
REDUCES THE EXPRESSION OF KB  
NUCLEAR FACTOR AND INHIBITS  
APOPTOSIS IN MONONUCLEAR CELLS  
OF PERIPHERAL BLOOD IN VITRO**

In order to examine the impact of PPAR-γ activator on the expression of κB nuclear transcription factor and apoptosis, the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated with pioglitazone at concentrations 10, 30 and 100 mM. Expression of NF-κB in CD64<sup>+</sup> cells was evaluated by flow cytometry using monoclonal antibodies. The development of apoptosis was evaluated using annexin V and propidium iodide. Activation of PPAR-γ resulted in a reduction of the number of CD64<sup>+</sup> cells and expression of the maximum levels of these receptors. We also observed a dose-dependent decrease of NF-κB concentration in PBMC suspension and in CD64<sup>+</sup> cells. While analyzing the apoptosis, the reduction of apoptotic cells (reduction of AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> cells) has been observed. The results obtained allow to prove that PPAR-γ activation participates in the PBMC apoptosis regulation and in the expression of transcriptional factor NF-κB. Our results indicate for the involvement of PPAR-γ in the regulation of NF-κB activity which plays one of the most significant roles in the inflammation realization, oncogenesis, and so on.

Key words: Peroxisome proliferator-activated receptors-γ, pioglitazone, NF-κB nuclear transcription factor, CD64<sup>+</sup> cells, apoptosis.

*Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics, Higher State Educational Establishment of Ukraine "UMSA", Poltava*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Винник І.Н., Кайдашев І.П. Клиническая характеристика эффективности пиоглитазона в комплексной терапии больных ишемической болезнью сердца на фоне метаболического синдрома / Лікар. справа. – 2011. – №1/2. – С. 82–89.
2. Громакова І.А., Сорочан П.П., Прохач Н.Е., Сухіна О.М., Пономарьов І.М., Кузьменко О.В. Транскрипційний фактор NF-κB як мета для подолання радіорезистентності пухлини // Укр. радіол. журн. – 2011. – №19. – С. 85–89.
3. Кайдашев І.П., Расін О.М., Микитюк М.В. Аторвастатин і розиглітазон індукують апоптоз моноцитів/макрофагів крові: роль поліморфізму гена PPAR-γ // Ліки. – 2007. – №3–4. – С. 55–61.
4. Кунцевич Н.В. Роль нуклеарного фактора транскрипції NF-κB в розвитку отторжения трансплантата // Вестн. трансплантології и искусств. органов. – 2010. – 12, №1. – С.72–77.
5. Лимфоциты: методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
6. Ao C., Huo Y., Xiong Z. Pioglitazone suppresses the lipopolysaccharide-induced production of inflammatory factors in mouse macrophages by inactivating NF-κappaB // Cell Biol. Int. – 2010. – 34 (7). – P.723–730.
7. Ban J.O., Kwak D.H., Oh J.H. Suppression of NF-κappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone // Chem.-Biol. Interact. – 2010. – 188 (1). – P.75–85.
8. Bonizzi G., Karin M. The two NF-κappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity // Trends Immunol. – 2004. – 25. – P. 280–288.
9. de Dios S.T., Frontanilla K.V., Nigro J. Regulation of the atherogenic properties of vascular smooth muscle proteoglycans by oral anti-hyperglycemic agents // J. Diabetes Complications. – 2007. – №2. – 21. – P. 108–117.
10. Devaraj S., Du Clos T.W., Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. – 2005. – 25(7). – P. 1359–1363.
11. Dong C., Davis R.J., Flavell R.A. MAP kinases in the immune response // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – 20. – P.55–72.
12. Kaidashev I.P., Rasin A.M., Shlykova O.A., Gorbas I.M., Smirnova I.P., Petrushov A.V., Rasin M.S. Frequency of Pro12A1a-Polymorphism of the Gene PPARγ2 in the Ukrainian Population and Its Possible Relation to the Development of the Metabolic Syndrome // Cytology and Genetics. – 2007. – №5. – P. 43–47.
13. Lawrens T. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2009. – 1(6). – P. 68–73.

14. Romeo G., Liu W.H., Asnaghi V. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes // *Diabetes*. – 2002. – **51**. – P.2241–2248.
15. Rossi A., Kapahi P., Natoli G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase // *Nature*. – 2000. – **403**. – P.103–108.
16. Sasaki M., Jordan P., Welbourne T. Troglitazone, a PPAR- $\gamma$  activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF- $\alpha$  // *BMC Physiology*. – 2005. – **5**. – P. 352–359.
17. Setoguchi K., Misaki Y., Terauchi Y., Yamauchi K., Kawahata K., Kadowaki T., Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis // *J. Clin. Invest.* – 2001. – **108**. – P. 1667–1675.
18. Sheri M.F., Cleaveland J.S., Grosmaire L.S. A D-amino acid peptide inhibitor of NF- $\kappa$ B nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease // *J. Immunol.* – 2000. – **2**. – P. 1004–1012.
19. Strebel A., Harr T., Bachmann F. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis // *Cytometry*. – 2001. – **43**, №2. – P. 126–133.
20. Valdete Schaub. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor mediated activation of dendritic cells via MAP kinase and NF-kappaB pathways // *Diss. Des Doct. Der Medicine.-T.*, – 2010. – P. 1–50.
21. Wei-guo Z., Hui Y., Shan L. PPAR-gamma agonists inhibits Ang II-induced activation of dendritic cells via the MAPK and NF-kappaB pathways // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – **88**(3). – P. 305–312.
22. Yamamoto Y., Gaynor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer // *J. Clin. Invest.* – 2001. – **107**. – P. 135–142.

*Наук.-досл. ін-т генет. та імунол. основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навч. закладу України “Укр. мед. стомат. академія”, Полтава*  
E-mail: [congres2007@yandex.ru](mailto:congres2007@yandex.ru)

*Матеріал надійшов до редакції 11.05.2011*

**N.M. Zholobak, N.S. Kavok, O.S. Bogorad-Kobelska,  
I.A. Borovoy, M.Yu. Malyukina, M.Ya. Spivak**

## **Effect of tilorone and its analogues on the change of mitochondrial potential of rat hepatocytes**

*The influence of tilorone dihydrochloride and its analogues – diphenyl derivatives on the changes of transmembrane potential of mitochondrial membranes of the isolated rat hepatocytes has been estimated. Authors have shown a significant increase in mitochondrial potential thirty minutes after the introduction of the test compounds to the cells using the fluorescent probe JC-1. These results indicate the rapid activation with tilorone and its analog – dihydrochloride 4,4'-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl – of the RLR signaling pathway. The final stage of this pathway is the cell production of IFN type I. The authors concluded that there is an increasing of the organelles resistance to the extra/intracellular damaging agents under the influence of the test compounds.*

*Key words: tilorone, diphenyl derivatives, mitochondrial potential, fluorescent probes, rat hepatocytes.*

### **INTRODUCTION**

Mitochondria are important cellular organelles which undergo the dynamic cycles of synthesis and division. Beside the energy supply of the cell mitochondria are involved in mammals' cellular reactions of innate antiviral immunity. These reactions include a cascade response which final stage is the production of type I interferons [16]. Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) in particular adaptor protein of the mitochondria outer membrane plays an important role in this process. MAVS-mediated is the activation of transcription factors – interferon-regulatory factor-3 (IRF-3) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). The regulation of mitochondria-mediated antiviral response is associated with MAVS structural characteristics [19]. In addition, it was shown a close correlation between the antiviral response of the cells and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ): the reduction of  $\Delta\psi_m$  correlates with the decrease of the antiviral response [10]. The authors have shown that  $\Delta\psi_m$  dissipation does not affect on the acti-

vation of interferon-regulatory factor-3 (IRF-3) after the activation of the MAVS. This indicates the close relationship of  $\Delta\psi_m$  and MAVS in RLR signaling pathway. I.e. the physiological functions of mitochondria play a key role in innate antiviral immunity.

One way to enhance innate antiviral immunity for the prevention and treatment of viral infections is the use of interferon (IFN) inducers. Among them is the well-known low-molecular synthetic inducer Amixine IC (tilorone dihydrochloride) which has, due to its structure, both antiviral and immunomodulating properties [7]. Being double cyclic compounds with aminoalkoxyl groups, diphenyl derivatives are structurally similar to tilorone dihydrochloride. Antiviral and interferon-inducing activities were shown for these compounds as for tilorone [3]. The result of the effect of these substances in the cell is the IFN production. That is why the aim of our study was to investigate their influence on the physiological functions of mitochondria, in particular, the dynamics of  $\Delta\psi_m$  changes in rat hepatocytes.

© N.M. Zholobak, N.S. Kavok, O.S. Bogorad-Kobelska, I.A. Borovoy, M.Yu. Malyukina, M.Ya. Spivak

## METHODS

In our experiments we used dihydrochloride 2,7-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]fluoren-9-one (tilorone dihydrochloride, drug Amixine IC) [2] and its analogues – dihydrochloride 4,4'-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 1) and dihydrochloride 2-metoksycarbonil-4-4'-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 2) [9] (kindly provided for research by Dr. S.A. Lyakhov, O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of National Academy of Sciences of Ukraine), Table 1. To prepare basic solution, the specified compounds are dissolved in distilled water to a concentration of 1,0 mg/ml.

Isolated liver hepatocytes of 3 month old white male Wistar population rats were used in the work. The cells were isolated by non-enzyme method using the perfusion medium, containing 2 mM EDTA [8]. The cell viability was assessed on the staining with trypan blue. Viability of freshly isolated hepatocytes made about 90%.

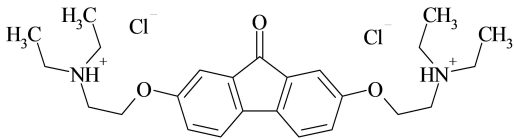
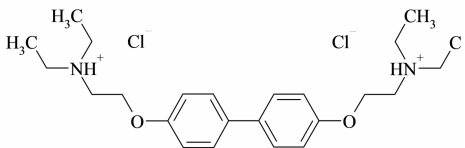
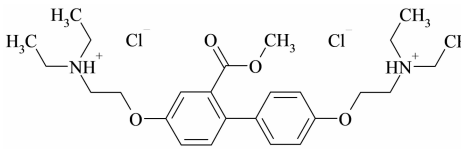
Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) of single cells was assessed by the accumulation JC-1 fluorescent probe aggregates within cells by quantitative microfluorimetry [5]. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide) was synthesized in the Laboratory of Nanodisperse

Materials of the Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov) by standard methods [6]. JC-1 has two band fluorescence with maxima at 510 nm (monomeric form) and 585 nm (J-aggregates). Initial solution (1 mM) of the studied probe in DMSO was diluted directly prior to the experiment up to the concentration required. The cells ( $5 \cdot 10^5$  cells/ml) were incubated with the probe JC-1 ( $10^{-6}$  M) in Eagle's medium with 10% fetal calf serum (BioloT, Russia) at 22°C during 60 min (incubation media produced by Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences). The experimental compounds were added in a concentration of 0,01 mg/ml of the cell suspension and incubated for 30 and 120 min.

Luminescent objects were examined and imaged by means of luminescent microscope Olympus IX71 and digital camera Olympus C-5060 (Japan). The luminescence spectra of single hepatocytes stained by the probe were recorded with a spectrometer USB4000 (Ocean Optics, USA).

The results were statistically processed by means of software Statistika v. 5.0 (StatSoft, USA) and Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, USA) using the Student's t-criterion. The results significantly differed in statistics at  $P < 0,05$ .

The structural formulas of the experimental compounds

Name of the compound	The structural formula
dihydrochloride 2,7-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]fluoren-9-one (tilorone dihydrochloride, drug Amixine IC)	
dihydrochloride 4,4'-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 1)	
dihydrochloride 2-metoksycarbonil-4-4'-bis-[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 2)	



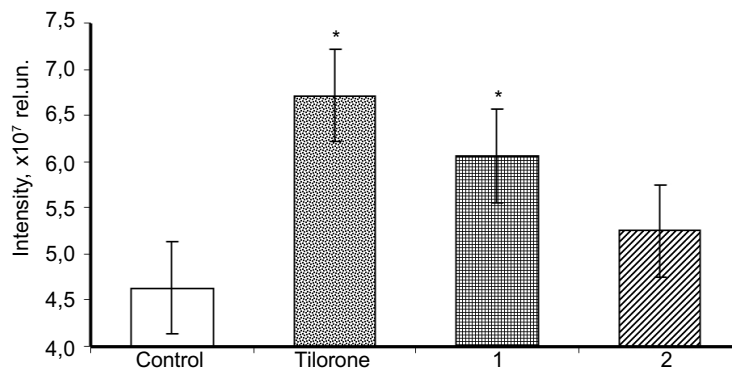
## RESULTS AND DISCUSSION

Fluorescent microscopy allows us to study mitochondrial function at the level of single cells. This is important in the study of subtle mechanisms which determine individual characteristics of cellular reaction to regulatory effects [14]. The accumulation of the fluorescent probe JC-1 in the mitochondria leads to the formation of J-aggregates depending on the value of  $\Delta\psi_m$ . This process is accompanied by a shift of the fluorescence emission from green color which inherent to monomers to red color which inherent to J-aggregates [15]. JC-1 allows us to study the local changes in the value of  $\Delta\psi_m$  and to visualize mitochondria with high and low membrane potential, unlike other dyes [17]. In studies using JC-1 probe for the characterization of mitochondrial processes are often used both the fluorescence intensity of the monomers and of the J-aggregates, as well as their ratio. However, some researchers believe that the fluorescence intensity of the J-aggregates is more accurate and adequate criterion for assessing  $\Delta\psi_m$  [11, 12]. Earlier we showed in isolated rat hepatocytes the applicability of this approach to assess mitochondrial function in intact cells and at various regulatory agents' influences [1, 5].

The results of investigation of the tilorone and its analogs – diphenyl derivatives influence on the fluorescence intensity of J-aggre-

gates in mitochondria within 30 min after the exposure with the rat hepatocytes are shown in Figure 1. Significant increase in the fluorescence intensity of J-aggregates is influenced by tilorone and compound 1 which indicates an increase in  $\Delta\psi_m$ . The observed effect varies in the severity degree which indicates the sensitivity of this system in the differential assessment of the effects of regulatory compounds. Thus, it was shown that the most significant changes in the value of  $\Delta\psi_m$  occurred under the influence of tilorone ( $145 \pm 13\%$  compared to the control). The fluorescence intensity of J-aggregates also increased under the influence of compound 1 and amounted after 30 min incubation  $131 \pm 10\%$  compared to the control. The effect of compound 2 was not expressed ( $113 \pm 13\%$  compared with the control cells). Subsequent incubation of the cells (up to 120 min) have not allowed to reveal a significant differences in the influence of the experimental substances on the value of  $\Delta\psi_m$  compared to the control. These data indicate that tilorone and its analogue – compound 1 – demonstrate the stimulating effect on the mitochondrial activity in isolated rat hepatocytes.

It is known that high membrane potential in intact mitochondria prevents the protons transport from crossing the inner membrane which is associated with the work of the respiratory chain; providing thus a low rate of mitochondria respiration. The increase in



Effect of tilorone and its analogues on the fluorescence of the J-aggregates in rat hepatocytes.

Note: \* –  $P < 0,05$  relative to the control.

the rate of respiration is due to the leakage of ions through the membrane when organelles are damaged because of hypoxia or lipid peroxidation and is accompanied by a decrease in membrane potential [4]. The discovered fact of the increase of the value of  $\Delta\psi_m$  after the exposure with tilorone and compound 1 indicates that these compounds increase the membrane potential of mitochondria and may increase their resistance to the damaging agents of extra/intracellular microenvironment.

The change in mitochondrial membrane potential  $\Delta\psi_m$  after the 30 min exposure of the cells with the test compounds may be considered in the context of well-known fact of the direct relation of the innate antiviral response severity on the value of mitochondrial potential  $\Delta\psi_m$  which starts RLR signaling pathway (MAVS-mediated activation of IRF-3, NF- $\kappa$ B) which ends with production of type I IFN [10, 16, 19]. The interferon-inducing activity is known for tilorone [13, 18] and this activity is shown for its analogue – compound 1 [3, 9]. Based on the obtained results we can say that the experimental compounds at the thirtieth minute of exposure with the cells activate the classical pathway of interferon response that is required for recognition the RNA viruses in different cells.

The observed differences in the degree of the mitochondrial processes activation of the tested analogues of tilorone – compounds 1 and 2 – can be explained by the peculiarities of the cellular reception of these compounds and by the peculiarities of the initial stages of the cell activation which requires a more detailed study.

**Н.М. Жолобак, Н.С. Кавок,  
О.С. Богорад-Кобельська, І.А. Боровой,  
М.Ю. Малюкіна, М.Я. Співак**

### **ВЛИВ ТИЛОРОНУ ТА ЙОГО АНАЛОГІВ НА ЗМІНУ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ**

Проведено дослідження впливу тилорону дигідрохлориду та його аналогів – похідних дифенілу на зміну мембранного

потенціалу мітохондрій гепатоцитів щурів. З використанням зонда JC-1 показано, що на 30-ту хвилину після внесення досліджуваних сполук до клітин спостерігається значне збільшення мітохондріального потенціалу. Отримані результати свідчать про швидку активацію за допомогою тилорону та його аналога – 4,4'-біс-[2-(діетиламіно)етоксидифеніл дигідрохлориду – RLR сигнального шляху, завершальним етапом якого є продукція клітиною ІФН I типу. Зроблено висновок про збільшення резистентності органел до поза/внутрішньоклітинних пошкоджувальних агентів під впливом досліджуваних сполук.

Ключові слова: тилорон, похідні дифенілу, мітохондріальний потенціал, флуоресцентні зонди, гепатоцити щурів.

**Н.М. Жолобак, Н.С. Кавок, Е.С. Богорад-Кобельская, И.А. Боровой, М.Ю. Малюкина, М.Я. Спивак**

### **ВЛИЯНИЕ ТИЛОРОНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС**

Проведено исследование влияния тилорона дигидрохлорида и его аналогов – производных дифенила на изменение мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов крыс. При помощи зонда JC-1 показано, что на 30-ю минуту после внесения исследуемых соединений к клеткам наблюдается значительное увеличение митохондриального потенциала. Полученные результаты свидетельствуют о быстрой активации при помощи тилорона и его аналога – 4,4'-бис-[2-(диэтиламино)этоксидифенил дигидрохлорида – RLR сигнального пути, завершающим этапом которого является продукция клеткой ИФН I типа. Авторы пришли к выводу об увеличении резистентности органелл к вне/внутриклеточным повреждающим агентам под действием исследуемых соединений.

Ключевые слова: тилорон, производные дифенила, митохондриальный потенциал, флуоресцентные зонды, гепатоциты крыс.

### **REFERENCES**

1. Averchenko E.A., Kavok N.S., Stepanenko A.M., Borovoy I.A., Malyukina M.Yu. Assessment of mitochondrial potential of isolated hepatocytes when the oxidative status changes // *Biophys. Herald.* – 2009. – 22, №1. – P. 49–56.
2. Bogatsky O.V., Gren A.I., Litvinova L.O., Lempart G.V. Synthesis of 2,7-bis-[2-(diethylamino) ethoxy] fluoren-9-on // *Extras. AS URSS. Ser. B.* – 1976. – №7. – P. 610–612.
3. Bogorad-Kobelska O.S., Zholobak N.M., Dolga O.V., Maltzev G.V., Lyakhov S.A., Andronati S.A., Spivak M.Ya. Diphenyl derivatives: cytotoxicity, antiviral and IFN-inducing activities in vitro // *Int. J. Biomed.* – 2011. – 1, № 3. – P. 153–157.

4. Vladimirov Yu.A. Physical and chemical basics of cell pathology. Lecture 3. Impairment of the mitochondria functions in tissue hypoxia. – M.: MSU, RSMU. – 1998. – P. 1–6.
5. Kavok N.S., Borovoy I.A., Malyukina M.Yu. Effect of different DMSO concentrations on dynamics of hormone-stimulated changes in transmembrane potentials of isolated rat hepatocytes during assessment with fluorescent probes // *Probl. Cryobiol.* – 2010. – **20**, №4. – P. 407–415.
6. Kiprianov A. I., Pilyugin G. T. Synthesis of polymethine dyes // *Scient. Notes of Kharkiv Univ.*–1937. – **10**. – P. 91–107.
7. Lyakhov S.A., Litvinova L.A., Andronati S.A., Berezina L.K., Galkin B.N., Osetrov V.E., Philippova T.O., Golovenko N.Ya. Biochemical mechanisms of realization of the antiviral and interferon-inducing activity of amixine and its analogues // *Ukr. Biohim. J.* – 2001. – **73**, №4. P. 108–113.
8. Petrenko A.Yu., Grishuk V.P., Sukach A.N., Roslyakov A.D., Belous A.M. The energy state of rat hepatocytes isolated by use of EDTA and vibration // *Biochem.* – 1989. – **54**, № (12). – P. 1952–1955.
9. Shay D.S., Zholobak N.M., Lyahov S.A., Maltzev G.V., Fernandes de Rivas S.O., Litvinova L.O., Andronati S.A., Spivak M.Ya. Interferon activity of amixin analogs and diphenyl derivatives // *Microbiol. Zh.* – 2007. – **69**, №5. – P. 59–64.
10. Koshiba T., Yasukawa K., Yanagi Y., Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling // *Sci. Signal.* – 2011. – **4**, №158. – P. ra7.
11. Mancini M., Anderson B.O., Caldwell E., Sedghinasab M., Paty P.B., Hockenbery D.M. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line // *J. Cell Biol.* – 1997. – **138**, №2. – P. 449–469.
12. Mancini M., Sedghinasab M., Knowlton K., Tam A., Hockenbery D., Anderson B.O. Flow cytometric measurement of mitochondrial mass and function: a novel method for assessing chemoresistance // *Ann. Surg. Oncol.* – 1998. – **5**, №3. – P. 287–295.
13. Mayer G.D., Krueger R.F. Tilorone hydrochloride: mode of action // *Science.* – **169**. – P. 1214–1215.
14. Mitochondria in pathogenesis // Eds. by John J. Lemasters and Anna-Liisa Nieminen. – New York: Kluwer Acad./ Plenum Publish. – 2001. – 540 p.
15. Reers M., Smith T.W., Chen L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential // *Biochem.* – 1991. – **30**, №18. – P. 4480–4486.
16. Seth R.B., Sun L., Chen Z.J. Antiviral innate immunity pathways // *Cell Res.* – 2006. – **16**, №2. – P. 141–147.
17. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C., Lin M., Chen A., Smith T.W., Steele G.D. Jr, Chen L.B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – **88**, №9. – P. 3671–3675.
18. Stringfellow D.A., Glasgow L.A. Tilorone hydrochloride: an oral interferon-inducing agent // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1972. – **2**, №2. P. 73–78.
19. Yasukawa K., Oshiumi H., Takeda M., Ishihara N., Yanagi Y., Seya T., Kawabata S., Koshiba T. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling // *Sci. Signal.* – 2009. – **2**, №84. – P. ra47.

*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov  
E-mail: n.zholobak@gmail.com*

*Received 20.10.2011*

Я.В. Ткаченко, Г.М. Воробйова, В.А. Жовнір, І.М. Ємець

## Вплив аутологічної пуповинної та донорської крові на цитокіновий профіль новонароджених з транспозицією магістральних судин

*Досліджено вміст прозапальних і протизапальних цитокінів: фактора наркозу пухлин  $\alpha$ , інтерлейкін  $1\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ), ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 у сироватці крові новонароджених з транспозицією магістральних судин, яким під час корекції вади застосовували аутологічну пуповинну кров або компоненти донорської крові до операції, на 1-, 3-, 7-му добу після неї. З'ясовано, що у новонароджених, яким під час операції застосовували компоненти донорської крові, вміст прозапальних ІЛ був підвищений як до операції, так і після неї, вміст ІЛ-10 був зниженим. У післяопераційний період ці пацієнти мали дисбаланс у системі цитокінів, який супроводжувався гіпертермією та легеневиими ускладненнями. У новонароджених, яким проводили операцію з використанням аутологічної пуповинної крові, не було значних відхилень від норми вмісту цитокінів у сироватці крові до операції. На 1-шу добу після неї підвищувався вміст як прозапальних, так і протизапальних цитокінів. До 7-ї доби вміст інтерлейкінів поступово знижувався. Новонароджені цієї групи мали адекватну імунну відповідь на проведену операцію. Ключові слова: пуповинна кров, транспозиція магістральних судин, фактор некрозу пухлин  $\alpha$ , інтерлейкін  $1\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ), ІЛ-6, ІЛ-8 ІЛ-10.*

### ВСТУП

Одним з актуальних завдань сучасної кардіоанестезіології є успішна реабілітація дітей раннього віку після кардіохірургічних операцій з використанням штучного кровообігу (ШК). Значне число проблем ведення післяопераційного періоду у дітей цього віку пов'язано з генералізованою відповіддю імунної системи дитячого організму на анестезію, обширне хірургічне втручання і ШК [1]. Ускладнення після трансфузії донорської крові об'єднуються терміном "трансфузійні реакції", можуть бути зумовлені різними причинами і спостерігатися у різні терміни після переливання крові.

Класичною відповіддю на операцію на серці у дорослих пацієнтів в умовах ШК вважається підвищення концентрації як про- так і протизапальних цитокінів у сироватці крові з їх наступною нормалізацією [11]. У

новонароджених зі вродженими вадами серця після операції з ШК цей процес недостатньо вивчений. Перший тиждень життя дитини являє собою період радикальної функціональної, іноді анатомічної перебудови всіх органів і систем. Ці зміни відбуваються внаслідок адаптації організму до позаутробного життя та самостійної підтримки сталого внутрішнього середовища. Перший рік життя в імунологічному відношенні – перехідна ланка від імуносупресивного періоду новонародженості до дозрівання тонких механізмів імунної відповіді. В цей час відбуваються відхилення в типах імунного реагування на такі потужні агресивні фактори, як оперативне втручання та переливання крові [2].

У регуляції імунної відповіді новонароджених дітей велику роль відіграє моноцитарно-макрофагальна ланка імунної системи. Місцеве та системне збільшення

© Я.В. Ткаченко, Г.М. Воробйова, В.А. Жовнір, І.М. Ємець

концентрацій прозапальних цитокінів (інтерлейкіна  $1\beta$  (ІЛ- $1\beta$ ), ІЛ-8, ІЛ-6, фактора некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ), виникає в процесі розпізнавання та представлення антигенів макрофагами і є необхідним для активації, проліферації та диференціровки лімфоцитів, зміни функціонального стану нейтрофілів [3, 12, 13]. Високий вміст прозапальних цитокінів викликає розвиток системної запальної реакції [14]. Встановлено, що фетальні моноцити та макрофаги мають здатність до секреції прозапальних цитокінів вже в кінці першого триместру вагітності [15, 16]. У новонароджених зі складними вродженими вадами серця, як було встановлено нами раніше, спостерігається дисфункція імунної відповіді (зниження вмісту Т- та В-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів поєднувалося з підвищенням концентрації ІgА та ІgМ в сироватці циркулюючих імунних комплексів, прозапальних цитокінів, показників реакції бласттрансформації з серцевим антигеном) [4].

Неонатальна кардіохірургія зі ШК потребує використання донорської крові. Зважаючи на це, нами пропонується використання аутологічної пуповинної крові в хірургії вроджених вад серця у новонароджених [5].

Дослідження цитокінового профілю у новонароджених з транспозицією магістральних судин, яким під час операції з ШК використовували аутологічну пуповинну кров, раніше не проводили. Великий практичний інтерес представляє аналіз вмісту цитокінів у сироватці крові як показників, доступних для моніторингу в клінічних умовах у пацієнтів під час операції з ШК, яким використовували пуповинну кров або компоненти донорської крові. А також підрахунок цитокінового індексу запалення розробленого нами як показника стану запального процесу. Індекс відображає стан цитокінового балансу, чи дисбалансу. Тобто, чим більший цитокіновий індекс, тим більш виражений запальний процес. У клінічній практиці деякі автори [6] використовували дослідження концентрації цитокінів

у сироватці крові хворих на ішемічну кардіоміопатію та розраховували відхилення кожного показника від норми, що давало змогу визначити рівень імунопатологічного процесу. Деякі автори [7] оцінювали активність запального процесу при генералізованому парадонтиті у хворих на ревматоїдний артрит за допомогою визначення прозапальних цитокінів ІЛ- $1\beta$  та ФНП- $\alpha$ . Про наявність запального процесу в тканинах пародонта і ступінь його активності судили за співвідношенням одержаних показників та їх значень для здорової людини.

Для оцінки вираженості ендогенної інтоксикації в клінічній практиці використовують лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ). Нормальний показник ЛІІ близько 1,0. Формула розрахунку являє собою співвідношення вмісту клітин, кількість яких підвищується при запальних і гнійних захворюваннях (нейтрофільні лейкоцити), до клітин, кількість яких знижується (лімфоцити, моноцити, еозинофіли, базофіли). Наприклад, ЛІІ при набряку гострого панкреатиту рідко перевищував 3,0, тоді як при деструктивних формах підвищувався до 3–5 і більше [5].

Таким чином ми можемо оцінити стан новонародженого пацієнта з транспозицією магістральних судин після проведеної операції з переливанням пуповинної та компонентів донорської крові, за допомогою визначення загального аналізу крові, концентрації інтерлейкінів у сироватці, підрахунку цитокінового індексу запалення (ЦІЗ) та ЛІІ.

Мета роботи – дослідити вміст цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ- $1\beta$ , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10) у сироватці крові новонароджених з транспозицією магістральних судин, яким під час корекції вади застосовували аутологічну пуповинну кров і компоненти донорської крові, до операції та на 1-шу, 3-тю, 7-му добу після неї.

## МЕТОДИКА

Новонароджені з транспозицією магістральних судин, яким проводили операцію

артеріального переключення з використанням апарата ШК, були розподілені на 2 групи. До 1-ї групи ввійшли 20 дітей, яким застосовували аутологічну пуповинну кров (діагноз встановлено пренатально, операцію проводили у перші 2–6 год після народження); 2-га група – 40 новонароджених, яким використовували компоненти донорської крові (діагноз встановлено постнатально, операцію проводили через 3–7 дів після народження). Контрольну групу склали 20 клінічно здорових новонароджених. Дослідження вмісту ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 у сироватках периферичної крові проводили у динаміці: до операції, на 1-шу, 3-тю та 7-му добу після неї.

Вміст ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 визначали методом ELISA («Bioscience», Австрія).

Визначали ЦІЗ, розроблений авторами (заявка на винахід № 2011/09/446 від 27/07/201. МПК G01N33/53) це співвідношення про- та протизапальних цитокінів. Він є показником імунної відповіді новонародженого на проведену операцію. Його підвищення свідчить про дисбаланс системи цитокінів, а саме про збільшення вмісту прозапальних цитокінів у сироватці крові, які в нормі наявні в невеликій кількості, та зменшення протизапальних цитокінів, які у здорових новонароджених завжди наявні в кровотоці і є антоганістами прозапальних цитокінів. ЦІЗ визначали за формулою:  $ЦІЗ = (A+B+C+D) \setminus E$ , де А – ФНП- $\alpha$ , В – ІЛ-1 $\beta$ , С – ІЛ-6, D – ІЛ-8, E – ІЛ-10.

Загальний аналіз крові проводили на аналізаторі «ABX PENTRA 60» (Франція), підраховували лейкоцитарну форму крові за загальноприйнятою методикою та ЛПІ на 7-му добу після операції, збільшення якого вказує на інтоксикацію організму [10].

ЛПІ визначали за формулою:  $(Mи+Ю+Пл+П+C/E+B+Л+M)$ , де Ми – мієлоцити, Ю – метамієлоцити, Пл – плазматичні клітини, П – паличкоядерні нейтрофіли, С – сегментоядерні нейтрофіли,

Е – еозинофіли, Б – базофіли, Л – лімфоцити, М – моноцити. Всі показники рахували у відсотках. Значення індексу від 1 до 2 свідчить про легкий ступінь інтоксикації, 2,1–7 – середній, 7,1–12 – тяжкий, більше ніж 12, 1 – термінальний стан.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакету програм “StatSoft STATISTICA 8.0.550 Portable (Eng)” 2008 г. Результати представлено у вигляді: середнє значення ( $\pm$ ) стандартна похибка. Для порівняння середніх значень використовували U-критерій Манна-Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати загального аналізу крові у новонароджених з транспозицією магістральних судин, яким переливали аутологічну пуповинну та компоненти донорської крові, на 7-му добу після операції, представлені в табл. 1.

Саме 7-ма доба після операції є цікавою для визначення ЛПІ у новонароджених як показника післяопераційного стану пацієнта в період одужання. У пацієнтів 1-ї групи  $ЛПІ = Mи+Ю+Пл+П+C/E+B+Л+M = 2+1,3+39,8/4,2+1+30,3+14 = 50,5/49,5 = 1,02$ , знаходився в межах норми (норма = 1,0); в 2-й групі  $ЛПІ = Mи+Ю+Пл+П+C/E+B+Л+M = 2,58+2,8+14,8+41,83/4,8+1+20+12,2 = 62,01/38 = 1,63$ , що свідчить про інтоксикацію організму навіть на 7-му добу після операції, а, отже, на негативний вплив чужорідної донорської крові на організм дитини.

Після операції відбуваються певні зміни в організмі на клітинному рівні. В перші 3–4 доби з’являється виражений запальний процес, який поступово зникає. В формулі крові також спостерігався «зсув вліво», тобто в бік молодих клітин (збільшувалася кількість паличкоядерних, сегментоядерних нейтрофілів, інколи з’являлися метамієлоцити та мієлоцити). Це нормальна захисна реакція організму. Це перші

клітини, які беруть участь у розвитку запальних процесів і захищають організм від інфекцій. При зсуві формули крові «вліво» підвищується ЛП. Далі при нормалізації формули крові зменшується і ЛП. При нормальній роботі імунної системи на 7-му добу після операції запальний процес поступово стихає, загальний аналіз крові з лейкоцитарною формулою нормалізується і ЛП відповідає нормі.

Результати дослідження продукції про- і протизапальних цитокінів у новонароджених з транспозицією магістральних судин у динаміці представлено у табл. 2.

У підтримці гомеостазу після кардіохірургічних операцій з ШК і попередженні системного запалення важливу роль відіграє збалансована цитокінова відповідь. До пригнічення імунітету може призвести надлишкова продукція як про-, так і протизапальних цитокінів.

У 1-й групі дітей операція проведена в перші години життя, до операції вміст прозапальних цитокінів практично не відрізнявся від значень здорових новонароджених (за даними літератури, в нормі в перші години життя в сироватці крові прозапальні ІЛ є в невеликій кількості). Був підвищений вміст ІЛ-8, що за літературни-

ми даними характеризує неоднозначний вплив гіпоксії на здатність недоношених дітей продукувати ІЛ-8. Так, якщо помірна асфіксія при народженні супроводжувалася значним збільшенням вмісту ІЛ-8, то при тяжкій формі у недоношених новонароджених він був зниженим [9]. Новонароджені з транспозицією магістральних судин мали після народження помірну гіпоксію, яка прогресувала на доопераційному етапі. В 2-ій групі новонароджених, що прооперовані на 5- –7-му добу життя, до операції ми виявили підвищений вміст ІЛ-8, ФНП- $\alpha$ . Це може свідчити про особливості становлення імунної системи в перший тиждень життя. Вважається, що останній відіграє важливу роль у регуляції імунної відповіді. Протягом першого тижня життя активізується моноцитарно-макрофагальний ряд і підвищується вміст ІЛ-1 $\beta$  та ФНП- $\alpha$ .

ІЛ-10 є протизапальним і в нормі постійно наявний у сироватці крові. Він має більшу молекулярну масу ніж прозапальні ІЛ, які у циркуляторному руслі крові здорових дітей, наявні в невеликій кількості. Це і є збалансований цитокіновий патерн. При різних патологічних станах, у тому числі запальних процесах, відбувається зсув у бік прозапальних інтерлейкінів. Але після опера-

**Таблиця 1. Показники загального аналізу крові на 7-му добу після операції у новонароджених з транспозицією магістральних судин, яким переливали аутологічну пуповинну та компоненти донорської крові**

Показники	Новонароджені		
	Здорові	1-ша група	2-га група
Лейкоцити, $10^9$ /л	14-21	13,0 $\pm$ 2,89	13,7 $\pm$ 4,28
Еритроцити, $10^{12}$ /л	4-6,5	3,26 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,77
Гемоглобін, г/л	160-210	115 $\pm$ 17,95	127,14 $\pm$ 25,98
Тромбоцити, тис.	180-400	329 $\pm$ 57,99	344,57 $\pm$ 188,22
Швидкість зсідання еритроцитів, мм/год	1-20	14 $\pm$ 4	20 $\pm$ 18,5
Паличкоядерні нейтрофіли, %	1-6	7,4 $\pm$ 2,94	14,8 $\pm$ 9,16
Сегментоядерні нейтрофіли, %	35-70	39,8 $\pm$ 12,54	41,83 $\pm$ 11,4
Лімфоцити, %	18-40	33,3 $\pm$ 14,28	20 $\pm$ 11,24
Моноцити, %	2-9	14,0 $\pm$ 0,82	12,29 $\pm$ 5,09
Еозинофіли, %	0,5-5	4,2 $\pm$ 4,19	4,8 $\pm$ 2,8
Базофіли, %	0-2	1	1
Мієлоцити, %	0	2,0 $\pm$ 0,8	2,58 $\pm$ 2,0
Метамієлоцити, %	0	1,3 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 1,8
Плазматичні клітини, %	0	0	0

тивних втручань, особливо в 1-шу добу, цей зсув є нормальною імунною відповіддю організму на пошкодження тканини, далі вміст цитокінів нормалізується, наближаючись до показників здорових новонароджених.

На 1-шу добу після проведеної операції збільшився вміст ІЛ-8 і ФНП- $\alpha$ , та ІЛ-10 в обох групах пацієнтів.

Активация системи цитокінів попереджає розвиток синдрому системної запальної відповіді в перші години після операції. Збільшення вмісту ІЛ-8 і ФНП- $\alpha$  після операції відіграє захисну роль, тому що ФНП- $\alpha$  і ІЛ-1 $\beta$  є головними в регуляції неспецифічного захисту та специфічного імунітету. Основними продуцентами їх є макрофаги та моноцити. ІЛ-1 $\beta$  має високу цитотоксичну активність і у новонароджених продукується моноцитами в дуже малих кількостях і швидко розпадається.

На 3-тю добу після операції в 1-й групі пацієнтів вміст ФНП- $\alpha$  та ІЛ-10 знижувався, ІЛ-8 залишався на тому самому рівні. В 2-й групі вміст ФНП- $\alpha$  та ІЛ-10

знижувалися, а вміст ІЛ-8 продовжував підвищуватися з  $99,1 \pm 16,4$  до  $154$  пг/мл  $\pm 59,6$  пг/мл. Це може вказувати на прогресування запального процесу в організмі дитини після перелитої чужорідної донорської крові. На 7-му добу поступово нормалізуються всі процеси, які були дисбалансовані під час операції, що видно у пацієнтів 1-ї групи за показниками ЦІЗ=13,3 та ЛПІ=1,02; не було післяопераційних ускладнень. Пацієнти 2-ї групи мали значно підвищений вміст ІЛ-8–85,5 та ФНП- $\alpha$  – 63. При цьому у них визначався низький вміст протизапального ІЛ-10-2,1 що може свідчити про дисбаланс системи цитокінів (ЦІЗ=75,1).

Підвищення ЦІЗ вказує на запальний процес. На 7-му добу після операції у новонароджених 1-шої групи він становив 13, 3:

(ЦІЗ=(A+B+C+D)\E=39,1+3,04+5,57+ 58,44/7,96=13, 3);

у новонароджених 2-ої групи – 75,1;

ЦІЗ = (A+B+C+D)\E=63+2,76+6,5+85,5/2,1=75,1.

**Таблиця 2. Вміст (пг/мл) прозапальних та протизапальних цитокінів у сироватці крові новонароджених з транспозицією магістральних судин**

Показники	Термін після операції				Здорові (ново-народжені)
	До операції	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	
<b>Фактор некрозу пухлин <math>\alpha</math></b>					
1-ша група	10,7 $\pm$ 4,1*	63,6 $\pm$ 27,4***	16,9 $\pm$ 4,6***	19,5 $\pm$ 4,5***	7,35 $\pm$ 0,75
2-га група	15,25 $\pm$ 9,8***	37 $\pm$ 16,3***	12,6 $\pm$ 6,5***	29,4 $\pm$ 12,2***	
<b>Інтерлейкін-1<math>\beta</math></b>					
1-ша група	2,85 $\pm$ 0,2	2,93 $\pm$ 0,1	2,82 $\pm$ 0,3	3,04 $\pm$ 0,2	3,43 $\pm$ 0,16
2-га група	2,6 $\pm$ 0,13	2,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,19	2,76 $\pm$ 0,15	
<b>Інтерлейкін-6</b>					
1-ша група	3,47 $\pm$ 0,79	39,3 $\pm$ 10,8	5,1 $\pm$ 2,0	5,57 $\pm$ 1,0	5,27 $\pm$ 1,6
2-га група	5,95 $\pm$ 1,9	36 $\pm$ 8,7	7,9 $\pm$ 1,5	6,5 $\pm$ 1,3	
<b>Інтерлейкін-8</b>					
1-ша група	20,57 $\pm$ 2,2***	58,2 $\pm$ 11,6***	62,9 $\pm$ 16,7***	58,44 $\pm$ 17***	12,54 $\pm$ 1,3
2-га група	96,93 $\pm$ 27***	99,1 $\pm$ 16,4***	154 $\pm$ 59,6***	85,5 $\pm$ 18,2***	
<b>Інтерлейкін-10</b>					
1-ша група	14,0 $\pm$ 3,5*	29,64 $\pm$ 5,9***	6,06 $\pm$ 1,6	7,96 $\pm$ 1,6	7,1 $\pm$ 3,45
2-га група	5,4 $\pm$ 2,4*	38,1 $\pm$ 25***	7,22 $\pm$ 1,68	2,1 $\pm$ 0,38***	

\* різниця статистично достовірна між двома групами, \*\* порівняно з контролем (P<0,001).



У здорових новонароджених ЦІЗ= (A+B+C+D)\E=7,35+3,43+5,27+12,54/7,1=4,02.

У пацієнтів 2-ї групи в ранньому післяопераційному періоді діагностували ускладнення з боку дихальної системи (дихальна недостатність у зв'язку з альвеолярним набряком, викликаним обструкцією кровотоку на рівні гіпоплазованих легеневи вен, що вимагало тривалої механічної вентиляції з використанням височастотного апарата ШВЛ), гіпертермія.

Проведені нами дослідження вказують на те, що аутологічна пуповинна кров позитивно впливає на організм новонародженого. Використовуючи її під час операції зі ШК як альтернативу чужорідній донорській крові, ми не порушуємо балансу імунної системи дитини, яка є інтегруючою в усіх важливих процесах життєдіяльності організму та відіграє важливу роль у процесах репарації тканин, а також сприяє більш швидкому одужанню пацієнта.

## ВИСНОВКИ

1. Новонароджені з транспозицією магістральних судин, яким проводили операцію з використанням аутологічної пуповинної крові не мали значних відхилень від норми вмісту цитокінів у сироватці до операції. На 1-шу добу після операції підвищувався вміст як про-, так і протизапальних цитокінів. До 7-ї доби вміст ІЛ поступово знижувався. Таким чином, новонароджені цієї групи мали адекватну імунну відповідь на проведену операцію.

2. У новонароджених, під час операції яким використовували компоненти донорської крові, вміст прозапальних інтерлейкінів був високим як до операції, так і після неї на 1-шу, 3-тю та 7-му добу, але вміст протизапального ІЛ-10 був знижений. Таким чином, для пацієнтів цієї групи в післяопераційному періоді характерний дисбаланс у системі цитокінів, який супроводжувався гіпертермією та легеневи ускладненнями.

3. Аутологічна пуповинна кров не порушує балансу імунної системи новонародженого.

**Я.В. Ткаченко, Г.М. Воробьева,  
В.А. Жовнір, И.Н. Емец**

## **ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ПУПОВИННОЙ И ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ НОВОРОЖДЕННЫХ С ТРАНСПОЗИЦИЕЙ МАГИСТРАЛЬНЫХ СОСУДОВ**

Исследовано содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов фактора некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкина  $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ), ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 в сыворотке крови новорожденных с транспозицией магистральных сосудов, которым при коррекции порока применяли аутологичную пуповинную кровь или компоненты донорской крови, до операции, на 1-, 3-, 7-е сут после нее. Выяснено в группе новорожденных, которым во время операции переливали компоненты донорской крови, содержание в сыворотке крови провоспалительных интерлейкинов было высоким как до операции, так и после нее на 1-, 3- и 7-е сутки, но содержание противовоспалительного ИЛ-10 было снижено. Новорожденные этой группы в послеоперационном периоде имели дисбаланс в системе цитокинов, сопровождавшийся гипертермией и легочными осложнениями. Новорожденные, которым проводили операцию с использованием аутологичной пуповинной крови, не имели значительных отклонений от нормы концентрации цитокинов в сыворотке крови до операции. На 1-е сутки после операции повышалось содержание как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. До 7-х суток концентрация ИЛ постепенно снижалась. У новорожденных этой группы не отмечалось послеоперационных осложнений, они имели адекватный иммунный ответ на проведенную операцию.

Ключевые слова: пуповинная кровь, транспозиция магистральных сосудов, фактор некроза опухоли  $\alpha$ , интерлейкин  $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ), ИЛ-6, ИЛ-8 ИЛ-10.

**Y. Tkachenko, G. Vorobyova,  
V. Zhovnr, I. Yemets**

## **THE INFLUENCE OF AUTOLOGOUS UMBILICAL CORD BLOOD AND DONOR BLOOD ON CYTOKINE PROFILE OF NEWBORNS WITH TRANSPOSITION OF GREAT VESSELS**

We investigated the serum levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10) in newborns with transposition of the great arteries to whom

during the defect correction the autologous umbilical cord blood and blood components were administered before the surgery and at the 1st, 3rd, 7th day after the surgery. We found that in the group of newborns to whom during the operation the blood components were used, the levels of pro-inflammatory interleukins were high before surgery and at the 1st, 3rd and 7th day after it, but IL-10 was reduced. During the postoperative period, the newborns of this group had imbalance in the system cytokine, accompanied by clinical complications such as hyperthermia and pulmonary complications. Newborns with transposition of the great arteries who had the surgery using the autologous cord blood, had no significant abnormalities in serum levels cytokine before the surgery. The 1st day after surgery there was an increase in both proinflammatory and antiinflammatory cytokines. Up to 7 days the levels of interleukin gradually decreased. Newborns in this group had no postoperative complications, had an adequate immune response to the operation.

Key words: cord blood, transposition of great vessels, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 IL-10.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Білоклицька Г.Ф., Цецура Н.В., Воробйова Г.М. Спосіб оцінки активності запального процесу при генералізованому пародонтиті у хворих на ревматоїдний артрит / Пат. на винахід №47130 UA МПК А61В 5/00. / опубл. 11.05.10. Бюл. №9.
2. Ємець І.М., Воробйова Г.М., Руденко Н.М., Федевич О.М., Чаковський К.С., Третякова І.А., Василенко Л.І., Ткаченко Я.В., Говсєєв О.Д., Макаренко М.В. Цитокиновий профіль при складних вадах серця у новонароджених // Щорічник наук. праць Асоціації серцево-судинних хірургів України. Серцево-судинна хірургія. – К., 2010. – 18. – С. 175–179.
3. Кетлинский С.А. Современные аспекты изучения цитокинов // Rus. J. Immunol. – 1999. – №4 (Suppl.1). – Р. 46–52.
4. Книшов Г.В., Беспалова О.Я., Баланнік З.Т., Береговий О.А., Воробйова Г.М. Спосіб лікування ішемічної кардіоміопатії / Пат. на корисну модель. № 48050 / 10.03. 2010. Бюл. №5.
5. Маликов И.С. Диагностические аспекты острого панкреатита // Прак. медицина. – 2007. – № 21. – С. 45–48.
6. Струнин О.В., Сенников С.В., Князькова Л.Г., Горбатов Ю.Н., Мунькин А.В., Маслова Ю.В., Полетаева Н.В. Цитокиновый профиль при коррекции врожденных пороков сердца в условиях экстракорпоральной перфузии у детей первого года жизни // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2005. – №1. – С. 49–52.
7. Таболин В.А., Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Дегтярев Д.Н., Бахтиян К.К. Актуальные вопросы перинатальной иммунологии // Int. J. Immunorehabilit. – 1997. – №6. – Р. 112–122,.
8. Ткаченко Я.В., Воробйова А.М., Федевич О. М., Часовський К.С., Жовнір В.А., Сідорик Л.Л., Ємець І.М. Ефективність трансфузії аутологічної пуповинної крові в неонатальній кардіохірургії // Укр. біохім. журн. – 2010. – 82. – С. 177.
9. Шишко Г.А., Крастылева И.М., Устинович Ю.А. Диагностическая значимость интерлейкина-8 при перинатальной гипоксии инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных // Науч.-практ. мед. журн. – 2010. – №2. – С. 113–116.
10. Benitz W.E., Han M.Y., Madan A., Ramachandra P. Serial serum C-Reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection // Pediatrics. – 1998. – 102(4). – Р. 41.
11. Calhoun D.A., Ponnelly W.H., Du Y., Dame J.B., Li Y., Cristensen R.D. Distribution of granulocyte colony-stimulating factor and G-CSF. Receptor mRNA and protein in the human fetus // Pediatric Res. – 1999. – 46(3). – Р. 333–338.
12. Dame J.B., Christensen R.D., Juul S.E. The distribution of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in the developing human fetus // Pediatric Res. – 1999. – 46(4). – Р. 358–366.
13. Eck, M. J., Sprang S. R. The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution: implications for receptor binding // Biol. Chem. – 1989. – 264. – Р. 17595–17605.
14. Plotz F.B., Oeveren W., Bartlett R.H., Wildevuur C.R. Blood activation during neonatal extracorporeal life support // Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1993. – 105. – Р. 823–832.
15. Shabalov N.P., Ivanov D. O. Clinical and laboratory characteristics of neonatal sepsis // Medical blog: Pediatric Med. Acad., St. Petersburg. – 2011. – 29, April.
16. Zentay Z., Sharaf M., Qadir M., Drafta D., Davidson D. Mechanism for Dexamethasone Inhibition of Neutrophil Migration upon Exposure to Lipopolysaccharide in Vitro: Role of Neutrophil Interleukin-8 Release // Pediatric Research. – 1999. – №46(4). – Р. 406.

ДУ «Наук.-практ. мед. центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України»  
E-mail: Yani\_t2008@ukr.net

Матеріал надійшов  
до редакції 07.09.2011

І.Г. Літовка, В.Я. Березовський, Т.М. Заморська

## Нормобарична гіпероксія впливає на остеогенез щурів

*Вивчено вплив нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини у 3- і 12-місячних щурів-самців лінії Вістар. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одноденних щодобових сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O<sub>2</sub>) супроводжується вірогідним зниженням концентрації С-термінальних пропептидів калагену I типу на 36 %, активності кислої фосфатази (КФ) на 32 %, зростанням активності лужної фосфатази на 64 %, концентрації піридиноліну на 37 %, β-CrossLaps на 8 %, та глікозаміногліканів (ГАГ) на 72 % у сироватці крові. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія порушує синтез колагену. У дорослих щурів за тих самих умов концентрація ГАГ у сироватці крові вірогідно зростає на 60 % відносно контрольних значень. Через 28 сеансів дихання гіпероксичною газовою сумішшю (ГГС) із 90 % O<sub>2</sub> – на 195 %. Активність КФ і тартратрезистентної кислої фосфатази знижувалась від 18 до 25 % при диханні ГГС як із 40 %, так і 90 % O<sub>2</sub> протягом 14 та 28 діб. Припускаємо, що у дорослих тварин 90%-ва гіпероксія не змінює активність остеобластів, проте порушує зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену, знижує активність лізосомальних ферментів, продукованих остеобластами, що може призвести до гальмування остеогенезу. Ключові слова: нормобарична оксигенація, кісткова тканина.*

### ВСТУП

Парціальний тиск кисню є одним із суттєвих факторів, що зумовлює функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його клітин, у тому числі й кісткових. Його зниження (гіпоксія) найчастіше є порушенням газового складу зовнішнього середовища. Існує чимало досліджень *in vitro* та *in vivo* в яких доведено, що знижений парціальний тиск кисню газової суміші відіграє важливу роль у процесах ремоделювання кісткової тканини (КТ) [2, 10, 13]. І в наших попередніх працях наведено значення фізіологічних, біохімічних і морфологічних показників стану КТ та її клітинних елементів за умов дозованої нормобаричної гіпоксії різної тривалості [3, 8].

Особливу актуальність набуває порівняльне дослідження помірних і підвищених доз кисню у газовій суміші на показники остеогенезу, які відображають онтогенетич-

© І.Г. Літовка, В.Я. Березовський, Т.М. Заморська

но зумовлені, адаптаційні процеси, що відбуваються на клітинному, субклітинному і молекулярному рівнях [12, 14].

Мета нашої роботи – дослідження впливу нормобаричної гіпероксії на показники остеогенезу щурів різного віку.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведено у весняний період на 80 щурах-самцях віком 3 і 12 міс (на початок експерименту). Щури контрольних груп перебували за стандартних умов виварію протягом 14 або 28 діб. Дослідним тваринам подавали штучну газову суміш із підвищеним парціальним тиском кисню (ГГС) по 1 год на добу протягом 14 або 28 діб із вмістом кисню 40 і 90 %. За одну добу загальна тривалість гіпероксичного впливу становила 60 хв, 14 діб – 840 хв і 28 діб – 1680 хв відповідно.

Досліди проводили з виконанням міжна-

родних вимог про гуманне ставлення до тварин.

Маркери остеогенезу досліджували за допомогою спектрофотометричних і імуноферментних методів. У сироватці крові визначали показники формування КТ: активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1, «Лакхема», Чехія), концентрацію С-термінальних пропептидів колагену І типу (СІСР) за допомогою стандартних наборів реактивів («IDS Inc.», США). Показники резорбції КТ – загальну каталітичну активність кислій фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентної кислій фосфатази (ТРКФ, «Лакхема», Чехія), гіалуронідазну активність, концентрацію С-термінальних телопептидів колагену І типу ( $\beta$ -CrossLaps, «IDS Inc.», США), піридиноліну («Quidel Corporation», США), глікозаміногліканів (ГАГ) визначали за методом Кляцкіна [6], гіалуронідазну активність – за методом Шараєва та співавт. [9].

Цифрові результати обробляли з використанням пакету програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2007. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Швидкість утворення або руйнування органічного матриксу КТ може оцінюватися вимірюванням активності таких специфічних ферментів остеобластів і остеокластів, як ЛФ і КФ або ж визначенням компонентів, що надходять у кровотік під час синтезу чи резорбції кістки.

Результати досліджень показали, що у 3-місячних тварин активність ЛФ у сироватці крові як через 14, так і 28 сеансів дихання ГГС із 40 %  $O_2$  не змінювалася. Збільшення вмісту  $O_2$  протягом 28 сеансів до 90 % призвело до вірогідного зростання цього показника (на 64 %) порівняно з контролем. Дещо по-іншому реагували 12-

місячні щури на підвищення вмісту  $O_2$  у газовій суміші. Вірогідне зниження на 32 % ЛФ ми спостерігали лише через 28 сеансів дихання ГГС із 40%  $O_2$ .

Певний інтерес має вивчення компонентів колагену І типу, насамперед, пропептидів проколагену І типу – СІСР. Адже за їх вмістом можна оцінювати спроможність остеобластів синтезувати колаген І типу. У 3-місячних тварин цей показник вірогідно знизився на 36 % через 14 сеансів дихання ГГС із 90 %  $O_2$ . Після 28 сеансів спостерігали лише тенденцію до його зниження. У 12-місячних щурів концентрація С-термінальних пропептидів колагену І типу не змінювалась у жодній із досліджуваних груп тварин.

Отримані нами результати свідчать про відсутність змін концентрації СІСР у сироватці крові молодих і дорослих щурів, які як 14, так і 28 діб дихали нормобаричною ГГС з 40 %  $O_2$ . Це відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації  $O_2$  у газовому середовищі, призначеному для оксигенотерапії. Перебування молодих тварин протягом 14 сеансів за умов більш високого ступеня нормобаричної гіпероксії (90 %) призводить до вірогідних змін концентрації СІСР, що є ознакою оксидативного стресу. У разі останнього змінюється активність ферментів внаслідок пошкодження біополімерів (порушення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків) [5]. У наших дослідженнях він супроводжувався також зниженням вмісту СІСР на 36 %. Припускаємо, що такі зміни можуть бути наслідком зниження як кількості остеобластів, так і їх спроможності синтезувати колаген І типу в кількостях, потрібних для нормального розвитку КТ молодих тварин.

Дослідження показників резорбції КТ показало вірогідне зниження порівняно з контролем активності КФ у сироватці крові 3-місячних тварин на 32 і 36 % відповідно, що дихали ГГС із вмістом 90%  $O_2$  протягом

14 і 28 сеансів (рис. 1). Аналогічно більш низькою була активність ТРКФ у щурів цієї вікової групи на 47 і 44 % ( $P<0,05$ ) через 14 і 28 сеансів відповідно (див. рис. 1).

У 12-місячних тварин через 14 сеансів спостерігали лише тенденцію до зниження активності КФ після вдихання ГГС із 40 %  $O_2$ . Через 28 сеансів цей показник знизився на 18 % ( $P<0,05$ ) порівняно з контрольними значеннями. При диханні газовою сумішшю із 90 %  $O_2$ , навпаки, відбулося вірогідне зниження активності КФ на 24 % через 14 сеансів, в той час як при 28 сеансах вона не змінювалася (рис. 2).

Активність ТРКФ у сироватці крові 12-місячних тварин знижувалася на 18 % ( $P<0,05$ ) через 14 сеансів 40%-ї гіпероксії і на 25 % при диханні ГГС із 90 %  $O_2$  (див. рис. 2).

Таким чином, зниження активності лізосомальних ферментів у сироватці крові свідчить про гальмування резорбції КТ і як наслідок затримання подальшого її утворення. Гіпероксія (40 і 90 %) протягом 14 і 28 сеансів негативно впливає на остеокласти, пригнічуючи їх активність здебільшого у молодих щурів.

Концентрація ГАГ у 3-місячних щурів після 14 сеансів перебування у ГГС із 40 %  $O_2$  мала лише тенденцію до підвищення, водночас як через 28 сеансів вона вірогідно зростала на 79 % порівняно з контрольними значеннями (рис. 3). При перебуванні тварин у ГГС із 90 %  $O_2$  як 14 діб, так і 28 діб, цей показник підвищувався на 72 і 138 % ( $P<0,05$ ) відповідно.

У 12-місячних тварин в умовах гіпероксії (40 і 90 %) протягом 14 сеансів концентрація ГАГ вірогідно збільшилася приблизно на 60 % відносно контрольних значень (див. рис. 3). Через 28 сеансів дихання газовою сумішшю із 90 %  $O_2$  вона залишалася підвищеною порівняно з контролем на 195 % ( $P<0,05$ ).

Таким чином, збільшення концентрації ГАГ у сироватці крові молодих і дорослих тварин в умовах гіпероксії може свідчити про порушення зв'язку між ним і фібрилами колагену.

Гіалуронідазна активність – це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроглюкозоамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. Підвищення гіалуронідазної активності у сиро-

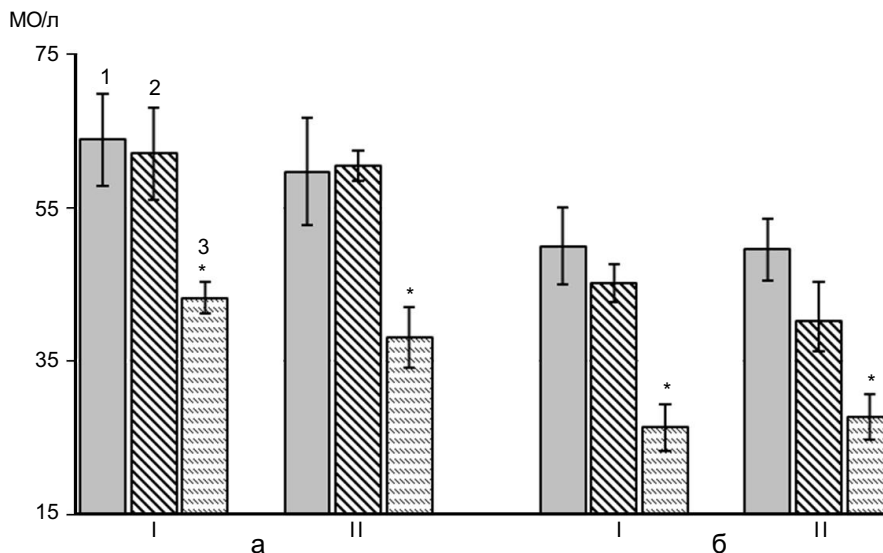


Рис. 1. Зміни активності кислої фосфатази (а) і тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові 3-місячних контрольних (1) і дослідних (2 – 40 %  $O_2$ , 3 – 90 %  $O_2$ ) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. \* $P<0,05$  порівняно з контролем

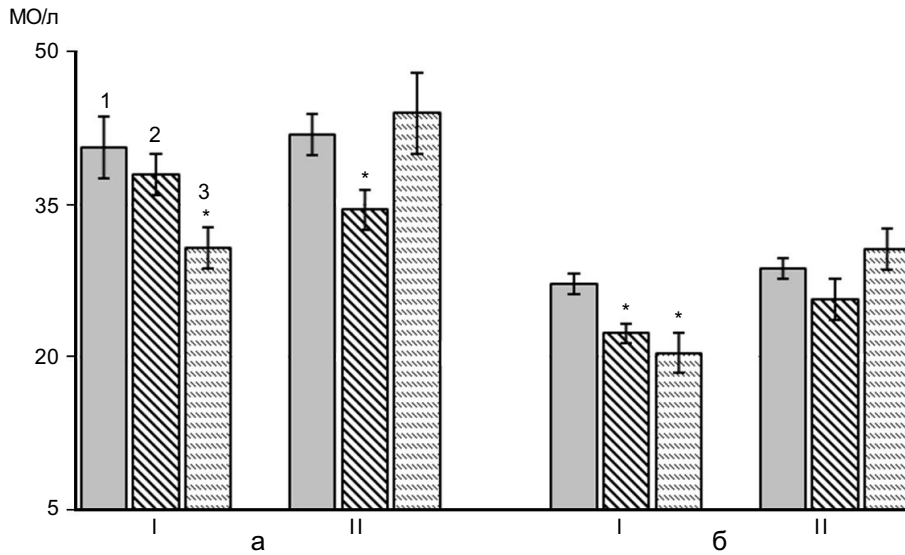


Рис. 2. Зміни активності кислої фосфатази (а) і тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові 12-місячних контрольних (1) та дослідних (2 – 40 % O<sub>2</sub>, 3 – 90 % O<sub>2</sub>) груп урів. \*P<0,05 порівняно з контролем

ватці крові 3-місячних тварин спостерігали через 14 сенсів їх перебування в умовах гіпероксії (40 і 90 %) на 114 і 76% відповідно порівняно з контролем. Через 28 сеансів цей показник не змінювався порівняно з контролем у жодній з досліджуваних груп щурів. У 12-місячних тварин гіалуронідазна активність зростала на 50 % лише за умов їх перебування протягом 14 діб у ГГС із 90 %

O<sub>2</sub>. Отримані результати узгоджуються з вищенаведеними щодо визначення вмісту ГАГ і свідчать про негативний вплив гіпероксії (40 і 90%) на ремоделювання КТ.

Концентрація С-термінального телопептиду колагену I типу (β-CrossLaps) вірогідно збільшилася відносно контрольних значень у молодих тварин після 14 сеансів дихання ГГС із вмістом O<sub>2</sub> 90 %. Через 28

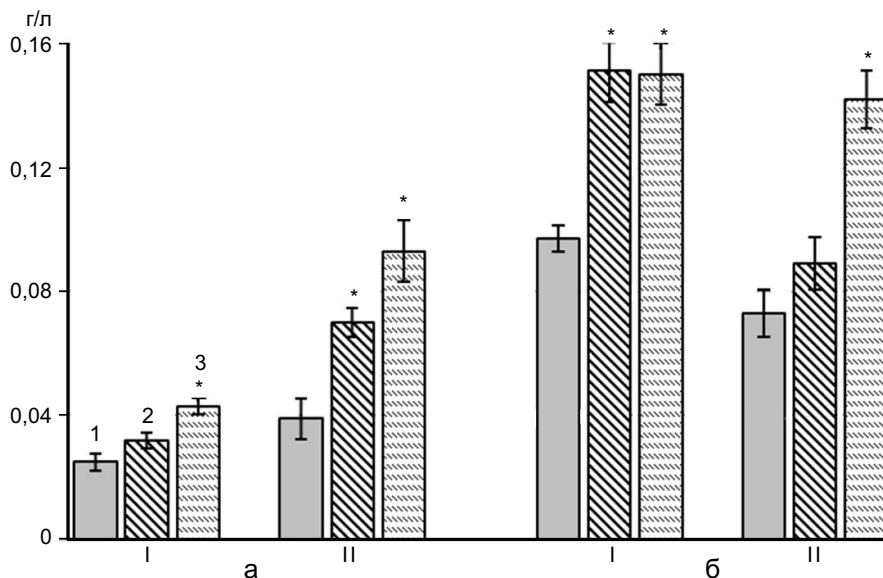


Рис. 3. Зміни концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (1) і дослідних (2 – 40 % O<sub>2</sub>, 3 – 90 % O<sub>2</sub>) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. \*P<0,05 порівняно з контролем

сеансів у них статистично вірогідних відмінностей щодо контролю не спостерігали у зв'язку зі значними розбіжностями показників (рис. 4).

Дорослі тварини дещо по-іншому реагували на нормобаричну гіпероксію. У них через 14 сеансів дихання ГГС із вмістом  $O_2$  40 % концентрація С-термінального телопептиду колагену I типу вірогідно знижувалася (рис. 4).

Таким чином, визначення вмісту  $\beta$ -CrossLaps у сироватці крові молодих щурів показало підвищення темпів деградації колагену після дихання газовою сумішшю із 90 %  $O_2$  протягом 14 сеансів. Перебування дорослих тварин у ГГС із 40 %  $O_2$  не викликало вірогідних змін показників метаболізму колагену.

На наш погляд, така різниця в реакції може відбуватися за рахунок надлишку дози кисню, який отримували тварини протягом експерименту. Якщо прийняти, що в атмосферному повітрі 21 %  $O_2$ , що відповідає 160 мм рт. ст.·год, то за одну годину умовна доза впливу кисню буде 9,6

·  $10^3$  мм рт. ст.· год. У ГГС (40 %  $O_2$  за годину) вона становить  $18 \cdot 10^3$  мм рт. ст.·год і зростає майже вдвічі відносно атмосферного повітря. При подальшому підвищенні кисню у ГГС (90 %  $O_2$ ) протягом години умовна надлишкова доза кисню стає  $41 \cdot 10^3$  мм рт. ст.·год, що в 4,3 раза вище, ніж при диханні атмосферним повітрям. Саме це призвело до істотних змін у метаболізмі колагену КТ молодих щурів.

Піридинолін також є компонентом колагену I типу. Він відіграє значну роль в його стабілізації і надає своєрідність структурі колагену та еластину. Під час резорбції КТ, що здійснюється остеокластами, та руйнуванні колагену, можливий вихід піридиноліну в судинне русло.

У разі визначення концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин, які протягом години дихали газовою сумішшю зі вмістом 40 %  $O_2$  як 14, так і 28 сеансів, ми спостерігали лише тенденцію до його підвищення. При перебуванні цих щурів у газовому середовищі з 90 %  $O_2$  протягом 14 діб вміст піридиноліну віро-

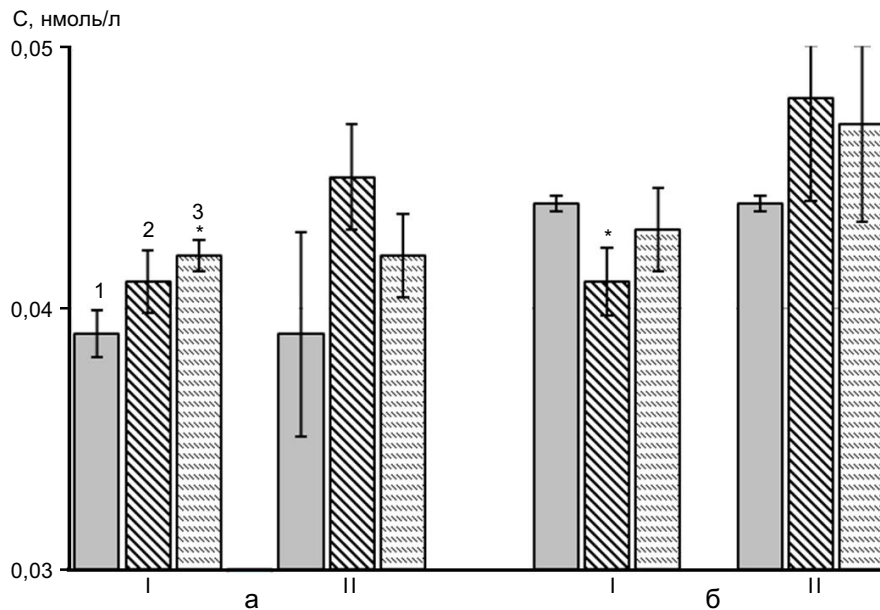


Рис. 4. Зміни концентрації С-термінального телопептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) місячних контрольних (1) та дослідних (2 – 40 %  $O_2$ , 3 – 90 %  $O_2$ ) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем

гідно підвищувався порівняно з контролем на 37 % (рис. 5). Отримані результати односпрямовані з такими щодо визначення вмісту СІСР при цій самій умовній дозі надлишку кисню.

У дорослих тварин за умов дихання ГГС зі вмістом кисню 90 % протягом 14 сеансів концентрація піридиноліну вірогідно знизилася порівняно з контрольними значеннями на 27 % (див. рис. 5), а зі вмістом  $O_2$  40 % протягом 14 і 28 сеансів цей показник не змінювався.

Вірогідне підвищення концентрації піридиноліну у молодих тварин після 14 сеансів дихання газовою сумішшю зі вмістом  $O_2$  90 % свідчить про руйнування колагену і зростання активності остеокластів.

Існують відомості про те, що в експериментах *in vitro* на культурі остеобластів максимальний остеогенез відбувається в газовому середовищі з  $O_2$  35 %, тобто у стані помірної нормобаричної гіпероксії. Концентрація кисню 95 % спричиняє істотне гальмування остеогенезу та значну втрату клітин. Автори дослідження припускають, що такий ефект виникає внаслідок збільшення продукції високотоксичних активних

форм кисню, які викликають оксидативний стрес [13]. Подібні дані отримані й іншими дослідниками: проліферація остеоцитів склепіння черепа ембріонів щурів, інкубованих у середовищі, що містить 90 % кисню, була більш низькою, ніж при 10 % [10]. Хрящоутворення, простежене на періостальному експлантаті проксимальної ділянки великої гомілкової кістки 2-місячних кролів у середовищах інкубації з різним вмістом кисню (від 1 до 90 %), виявилось максимальним при 12 – 15 %  $O_2$  [12].

Водночас є відомості про прямо пропорційну залежність між підвищенням парціального тиску кисню і збільшенням активності остеобластів і остеокластів [11, 14]. Відомо, що гіпербарична оксигенація позитивно впливає на репаративний остеогенез внаслідок зниження активності катаболічних і стимулюванні анаболічних процесів, прискорення синтезу органічної складової кісткової тканини та її мінералізації, покращення регіонального кровообігу [4, 7].

На підставі результатів проведених нами експериментів можна зробити висновок, що 40 %  $O_2$  у вдихуваному повітрі по 1 год щодобово не викликає істотних змін

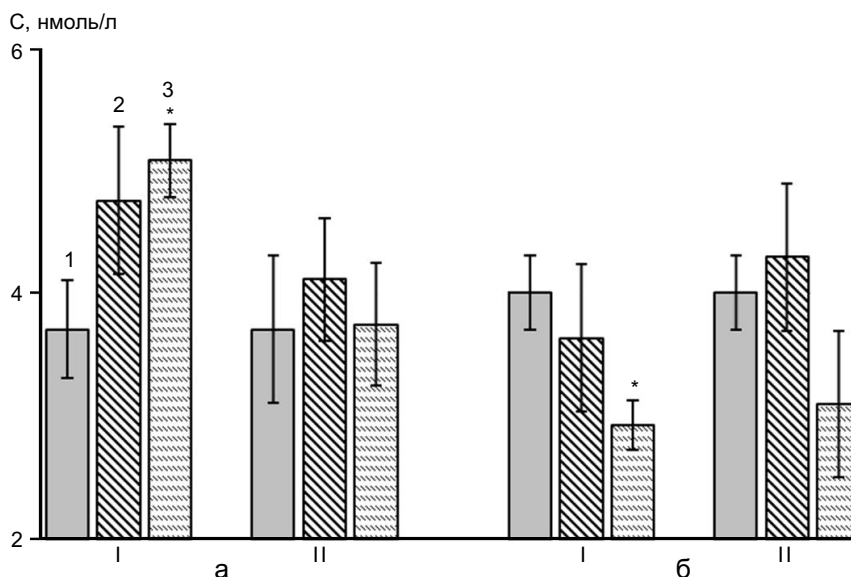


Рис. 5. Зміни концентрації піридиноліну у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (1) та дослідних (2 – 40 %  $O_2$ , 3 – 90 %  $O_2$ ) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем



досліджених показників синтезу колагену, що відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації кисню у газовому середовищі. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одиноднинних щодобових сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O<sub>2</sub>) супроводжується вірогідним зниженням концентрації СІСР на 36 % та активності КФ на 32 %, зростанням активності ЛФ на 64 % і концентрації піридиноліну на 37 %, β-CrossLaps на 8 % та ГАГ на 72 % у сироватці крові. Отримані значення біохімічних показників ремоделювання у молодих тварин свідчать про істотне розбалансування процесів утворення та руйнування КТ під впливом ГГС. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90 %) порушує синтез колагену.

У дорослих щурів за тих самих умов концентрація ГАГ у сироватці крові вірогідно збільшувалася приблизно на 60 % відносно контрольних значень. Через 28 сеансів дихання ГГС із 90 % O<sub>2</sub> цей показник залишався підвищеним порівняно з контролем на 195 %. Також спостерігали зниження активності КФ і ТРКФ у межах 18–25 % при диханні ГГС як із 40 %, так і 90 % O<sub>2</sub> протягом 14 та 28 діб. Припускаємо, що у дорослих тварин 90%-ва гіпероксія не змінює активність остеобластів, проте порушує зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену, знижує активність лізосомальних ферментів, продукованих остеокластами, що може призвести до гальмування остеогенезу.

**І.Г. Литовка В.А. Березовский,  
Т.М. Заморская**

### **НОРМОБАРИЧЕСКАЯ ГИПЕРОКСИЯ ВЛИЯЕТ НА ОСТЕОГЕНЕЗ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Изучено влияние нормобарической гипероксии на метаболизм костной ткани у 3- и 12-месячных крыс-самцов линии Вистар. Пребывание молодых крыс (3 мес) в течение 14 одночасовых ежесуточных сеансов в условиях

нормобарической гипероксии (90 % O<sub>2</sub>) сопровождается достоверным снижением концентрации СІСР на 36 %, активности кислой фосфатазы (КФ) на 32 %, повышением активности щелочной фосфатазы на 64 %, увеличении концентрации пиридинолина на 37 % и β-CrossLaps на 8 %, гликозаминогликанов (ГАГ) на 72 % в сыворотке крови. Считаем, что нормобарическая гипероксия (90 %) сопровождается нарушением синтеза коллагена. У взрослых крыс в тех же условиях в течение 14 сеансов концентрация ГАГ достоверно повысилась на 60 % относительно контрольных значений. После 28 сеансов дыхания гипероксической газовой смесью (ГГС) с 90 % O<sub>2</sub> – на 195 %. Активность КФ и тартратрезистентной кислой фосфатазы снижалась в пределах 18–25 % при дыхании ГГС как из 40 %, так и 90 % O<sub>2</sub> в течение 14 и 28 сут. Полагаем, что у взрослых животных 90%-я гипероксия не влияет на активность остеобластов, но нарушает взаимосвязь ГАГ и фибрилла коллагена, снижает активность лизосомальных ферментов, продуцированных остеокластами, что способно затормозить остеогенез.

Ключевые слова: нормобарическая оксигенация, костная ткань.

**I.G. Litovka, V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska**

### **NORMOBARIC HYPEROXIA AFFECTS OSTEOGENESIS IN LABORATORY ANIMALS**

We studied the influence of normobaric hyperoxia on bone metabolism in 3 - and 12-month-old male Wistar rats. Maintaining young rats (3 months) during the 14-hour daily sessions under normobaric hyperoxia (90% O<sub>2</sub>) was accompanied by a significant decrease in the concentration of C-terminal propeptides of collagen type I (by 36%), the acid phosphatase activity (by 32%), an increased activity of alkaline phosphatase (by 64%), an increased concentration of pyridinoline (by 37%) and β-CrossLaps (by 8%), glycosaminoglycans (by 72%) in the blood serum. We believe that normobaric hyperoxia (90%) is accompanied by the disturbance of collagen synthesis. In adult rats under the same conditions for 14 sessions, the concentration of glycosaminoglycans significantly increased by 60% relative to the control values. After 28 sessions of breathing the normobaric gas mixture containing 90% O<sub>2</sub> this parameter increased by 195%. Breathing normobaric gas mixture containing both 40% and 90% of O<sub>2</sub> for 14 and 28 days decreased the acid phosphatase activity and the tartrat-resistant acid phosphatase activity by 18-25%. We believe that in adult animals 90% hyperoxia does not affect the activity of osteoblasts, but breaks the link between glycosaminoglycans and collagen fibrils, decreases the activity of lysosomal enzymes which are produced by osteoclasts and which can inhibit osteogenesis.

Key words: normobaric oxygenation, bone tissue.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Иоффе И.Д. Адаптационные механизмы костной ткани и регуляторно-метаболический профиль организма // Морфология. – 2001. – №6. – С. 7–12.
2. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека. – К.: Феникс, 2000. – 176 с.
3. Березовський В.Я., Літовка І.Г., Костюченко О.С. Фізіологічна регенерація кісткової тканини за умов дозованої нормобаричної гіпоксії // Фізіол. журн. – 2007. – 53, №6. – С. 40–45.
4. Вохмякова Т.В., Кулешов В.М., Овденко А.Г., Тихилов Р.М. ГБО в комплексном лечении больных с повреждениями опорно-двигательного аппарата // Гипербар. физиология и медицина. – 2002. – №1. – С. 27–31.
5. Гершенович З.С. Молекулярные механизмы действия повышенного давления кислорода. – В кн.: Влияние повышенного давления кислорода на организм. – Ростов н/Д: Изд-во Ростов. ун-та, 1969. – С. 16–18.
6. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 51–53.
7. Котельников Г.П., Арбагов С.В., Панкратов А.С. Новый подход к лечению нейродистрофического синдрома при травмах нижних конечностей // Гипербар. физиология и медицина. – 2002. – №1. – С. 10–16.
8. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – ДП «Інформаційно-аналітичне агентство», 2011. – 244 с.
9. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В., Сосулина Л.Л. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях // Клин. лаб. диагностика. – 1996. – №3. – С. 21–22.
10. Dodd J.S., Raleigh J.A., Gross T.S. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 3 (pt. 1). – P. 958–602.
11. Gokce S., Bengi A.O., Akin E., Karacay S. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement // Angle Orthodontist. – 2008. – 78, №2. – P. 304–308.
12. O'Driscoll S.W., Fitzsimmons J.S., Commisso C.N. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum // J. Orthopaedic. Res. – 1997. – 15, №2. – P. 682–687.
13. Tuncay O.C. Ho D, Barker M.K. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Amer. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. – 1994. – 105, №5. – P. 457–463.
14. Shaw J. L., Bassett C.A. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro // J. Bone and Joint Surgery. – 1967. – 49-A, №1. – P. 73–80.

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

*Матеріал надійшов до редакції 29.07.2011*

І.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, Т.М.Фалалєєва, Т.В. Берегова

## Вплив тривалого введення глутамату натрію на структуру підшлункової залози щурів

*Вивчали вплив тривалого введення глутамату натрію на підшлункову залозу у щурів. Встановлено, що 30-добове введення в дозах 15 і 30 мг/кг (відповідає 1 і 2 г/людину) викликає некротичні, некробіотичні та дистрофічні зміни екзо- і ендокриноцитів, лейкоцитарну і лімфоїдну інфільтрацію, периваскулярний і інтерстиціальний фіброз, набряк та дисциркуляторні розлади. Слід відмітити збільшення площі поперечного перерізу ядер ендокриноцитів та екзокриноцитів, що свідчить про інтенсифікацію синтетичних процесів у клітинах підшлункової залози, а також зменшення площі поперечного перерізу екзокринних клітин підшлункової залози, що є ознакою стимуляції секреторних процесів у екзокринних клітинах. Описані зміни є характерними для гострого панкреатиту. Зроблено висновок, що максимальні добові дози харчових добавок, що містять глутамінову кислоту та її солі, мають бути переглянуті, враховуючи їх несприятливий вплив на підшлункову залозу.  
Ключові слова: глутамат натрію, підшлункова залоза, панкреатит.*

### ВСТУП

У 1907 р. професор Токійського імперського університету Кікунае Ікеда вперше виділив глутамат натрію за допомогою гідролізу пшеничного білка і виявив його здатність підсилювати природні смакові якості їжі, які втрачаються при обробці й зберіганні. З тих пір глутамат натрію (Е621) використовується в більшості сучасних харчових технологій як харчова добавка, підсилює смак і аромат. Сумніви, що стосуються безпеки споживання харчової добавки глутамату натрію, почалися в 1968 р. після публікацій в англійському медичному журналі даних про те, що натрієва сіль глутамінової кислоти може бути причиною багатьох хвороб [10, 15, 17, 18]. Ці захворювання були об'єднані терміном "синдром китайського ресторану", симптомами якого є різкий біль у шлунку, грудях або голові, почервоніння обличчя, підвищена температура тіла, посилення потовиділення [7, 12]. Проведено велику кількість дослі-

джень у багатьох країнах як на здорових добровольцях, так і на людях, які себе вважають чутливими до глутамату натрію [11]. Однак єдиної думки щодо безпечної дози немає [7, 18].

У Україні тільки у 2000 р. після постанови Кабміну № 342 від 17 лютого глутамат натрію внесли до переліку дозволених в Україні харчових добавок. За останні 10 років зростає захворюваність населення хворобами шлунково-кишкового тракту. Нині в Україні 40 % дорослого населення і 10 % дитячого мають проблеми з травленням [5].

У наші дні характер харчування населення викликає серйозну стурбованість: все зростає споживання продуктів «fast food», що супроводжується зниженням частки в денному раціоні овочів, фруктів, молочних і кисломолочних продуктів може позначитися на стані здоров'я.

Встановлено, що прийом харчової добавки глутамату натрію в кількості 3 г на добу може викликати ознаки «синдрому

© І.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, Т.М.Фалалєєва, Т.В. Берегова

китайського ресторану» [19]. Однак раніше нами було показано, що щоденне введення глютаму натрію щурам у дозах 15 і 30 мг/кг, які відповідають 1 і 2 г на середньостатистичну людину (безпечні для здоров'я людини дози), впродовж 20 і 30 діб призвело до збільшення маси тіла тварин, секреції соляної кислоти та ураження слизової оболонки шлунка, що проявлялося у розвитку крововиливів, ерозій і виразок [6]. Оскільки в ендо- і екзокринній частині підшлункової залози щурів знайдені для L-глютаму везикулярні транспортери першого та другого типу та іонотропні і метаболічні рецептори [14, 15], то метою нашої роботи було дослідити вплив тривалого введення глютаму (10, 20 і 30 діб) на морфологію підшлункової залози щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 63 щурах з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі [3, 4]. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами з упорядкування, устаткування та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

За добу до проведення експерименту тварин, яких було розділено на три групи, піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. Тваринам I групи протягом 10, 20 та 30 діб ми вводили 0,5 мл води (*per os*, один раз на день). Тварини II і III груп упродовж цього самого терміну

отримували 15 і 30 мг/кг глютаму натрію (0,5 мл *per os*, один раз на день) відповідно. Через 10, 20 та 30 діб у щурів усіх груп були проведені гістологічні та морфометричні дослідження тканини підшлункової залози. Тварин умертвляли летальною дозою уретану (3 г/кг, внутрішньоочередово) [8]. Після чого видаляли підшлункову залозу та фіксували у 10%-му нейтральному формаліні протягом 1-2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчинах етилового спирту зростаючих концентрацій (70, 80, 90, 96 % – по одній добі у кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год) та хлороформі (1 год), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год при +37°C) та чистим парафіном (2 год при +56°C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи шлунка завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікроскопі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином [2].

Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа у 100, 400 і 1500 разів. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom і мікроскопа Olympus BX-41 («Olympus Europe GmbH», Японія).

На знімках, отриманих зі збільшенням у 1500 разів вимірювали площу поперечного перерізу ядер ендо- і екзокринних клітин підшлункової залози, площу поперечного перерізу екзокринних клітин підшлункової залози і відстань між часточками підшлункової залози за допомогою безкоштовного програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool, яке було розроблено у Техаському державному університеті, Сан-Антоніо, штат Техас, у 1995–2002 рр. і доступне в Інтернеті (<ftp://maxrad6.uthscsa.edu>).

Наші результати згідно з тестом Шапіро-Вілкса були розподілені нормально і представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистичне порівняння між групами проводили з використанням критерію *t* Стьюдента для нез'язаних вибірок. Статистична значимість була встановлена на рівні  $P < 0,05$  [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У щурів контрольної групи підшлункова залоза щурів мала типову будову. Ациноси екзокринної її частини були нормальної будови, ациноцити мали конічну форму та виражену полярність – апікальну (зимогенну) та базальну (гомогенну) зони. У базальній частині ациноцитів розміщені ядра з чітко окресленими ядерцями (рис 1). Площа поперечного перерізу ациносів становила  $1243,1 \text{ мкм}^2 \pm 17,7 \text{ мкм}^2$ , ядер ациноцитів –  $19,6 \text{ мкм}^2 \pm 1,4 \text{ мкм}^2$ , а відстань між часточками підшлункової залози –  $17,6 \text{ мкм} \pm 1,7 \text{ мкм}$  (таблиця). Ендокринна частина представлена острівцями Лангерганса різної форми та розмірів, острівці відокремлені від ациносів сполучною тканиною та складаються з інсуліноцитів між якими розміщена пухка волокниста сполучна тканина з гемокapілярами. Площа поперечного перерізу ядер ендокриноцитів острівців Лангерганса становила  $20,5 \text{ мкм}^2 \pm 1,6 \text{ мкм}^2$  (див. таблицю).

У підшлунковій залозі щурів, що отримували глутамат натрію протягом 10 діб у дозі 15 мг/кг, виявлені дистрофічні зміни екзокриноцитів і повнокров'я судин (рис. 2,а). У щурів, які отримували 30 мг/кг харчової добавки спостерігалися стази в просвіті судин (див. рис. 2,б).

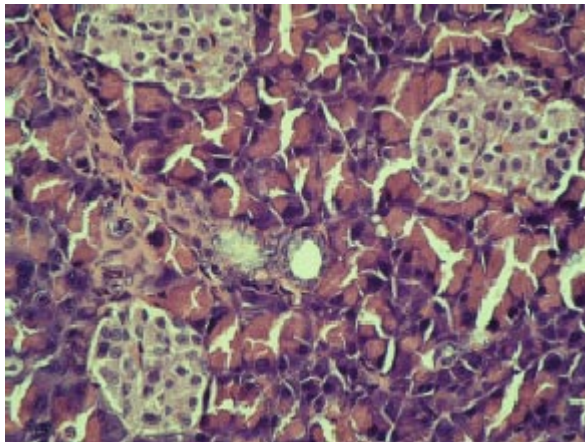
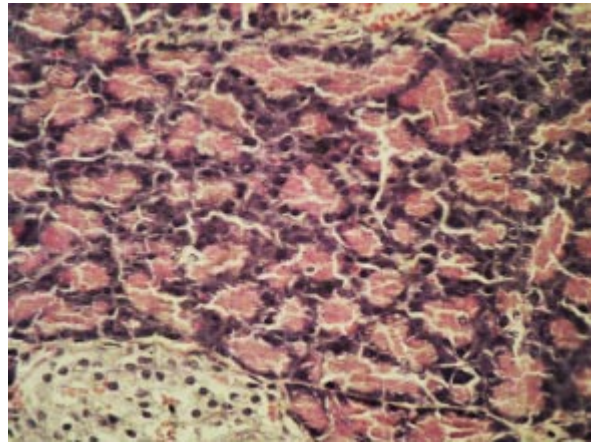


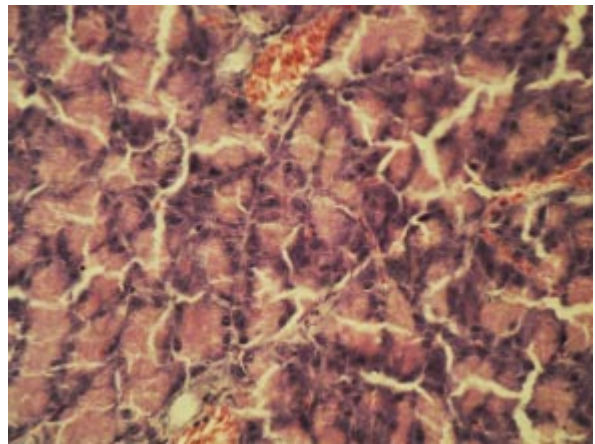
Рис. 1. Мікрофотографія підшлункової залози контрольної групи щурів, х400

Введення глутамату натрію протягом 20 діб в дозі 15 мг/кг викликало в тканині підшлункової залози некробіотичні зміни екзокриноцитів, помірний периваскулярний фіброз і лімфоїдну інфільтрацію. Збільшення дози харчової добавки вдвічі справляло значно сильніший вплив. Спостерігалися виражені некробіотичні і некротичні зміни екзокриноцитів, дистрофічні зміни ендокриноцитів і стаз у просвіті судин ендокринної частини. Введення протягом 10 та 20 діб глутамату натрію вірогідно не змінювало морфометричні показники підшлункової залози.

У разі подовження введення глутамату натрію (15 мг/кг) до 30 діб ступінь ураженості тканини підшлункової залози ще



а



б

Рис. 2. Мікрофотографії підшлункової залози щурів, котрим упродовж 10 діб вводили глутамат натрію: а – 15 мг/кг, б – 30 мг/кг, х400

**Вплив 30 добового введення глютаму натрію на морфометричні показники підшлункової залози у щурів (M±SD; n = 10)**

Показник	Контроль	Глютама́т натрію	
		15 мг/кг	30 мг/кг
Площа поперечного перерізу, мкм <sup>2</sup>			
ядер ендокриноцитів	20,5±1,6	23,5±1,4*	23,7±1,5*
ядер екзокриноцитів	19,6±1,4	21,6±1,6*	22,3±1,5*,**
ацинусів	1243,1±17,7	1170,2±27,3**	1169,9±25,0*
Відстань між часточками підшлункової залози, мкм	17,6±1,7	33,6±1,6*	33,3±1,6*

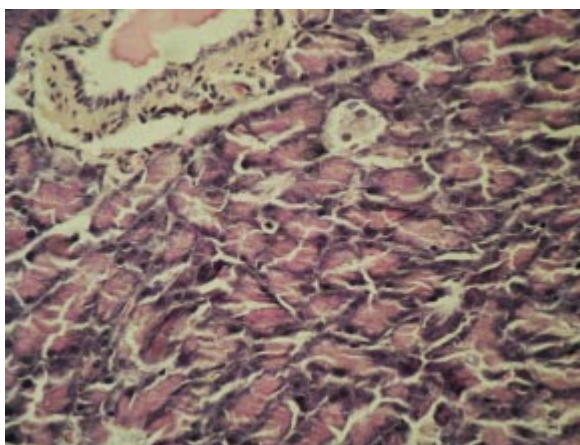
\* P<0,001 у порівнянні з контролем, \*\* P<0,001 у порівнянні з глютамом натрію в дозі 15 мг/кг

збільшилася: були наявні некротичні, некробіотичні та дистрофічні зміни екзо- і ендокриноцитів, виражена лімфоїдна інфільтрація, інтерстиціальний набряк, помірний периваскулярний і інтерстиціальний фіброз. При дозі 30 мг/кг спостерігалася аналогія, однак були більш виражені некротичні, некробіотичні та дистрофічні зміни екзо- і ендокриноцитів, збільшувалася лейкоцитарна і лімфоїдна інфільтрація, виявлений периваскулярний і інтерстиціальний фіброз, виражений інтерстиціальний набряк і дисциркуляторні розлади.

Введення глютаму натрію в дозах 15 та 30 мг/кг протягом 30 діб призводило до збільшення площі поперечного перерізу ядер ендокриноцитів на 14,6 і 15,6 % (P<0,001) відповідно. Площа поперечного перерізу ядер екзокринних клітин підшлункової залози також збільшується на 10,2 і 13,8 % (P<0,001) відповідно, а відстань між часточками підшлункової залози – на 90,5 і 89,2 % (P<0,001). Проте площа поперечного перерізу екзокринних клітин підшлункової залози була знижена на 5,9 % (P<0,001; див. таблицю).

Після 30-добового введення глютаму натрію в дозі 30 мг/кг спостерігались подібні зміни морфології підшлункової залози, як і в дозі 15 мг/кг, однак значно посилювалися некротичні, некробіотичні та дистрофічні зміни екзо- і ендокриноцитів, збільшувалась лейкоцитарна і лімфоїдна інфільтрація, виявлений периваскулярний і

інтерстиціальний фіброз, виражений інтерстиціальний набряк і дисциркуляторні розлади (рис. 4,б).



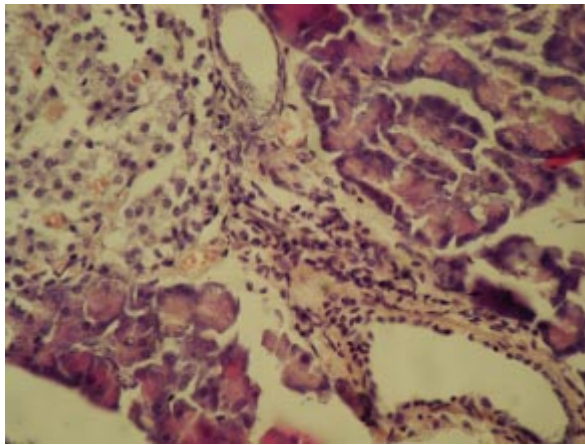
а



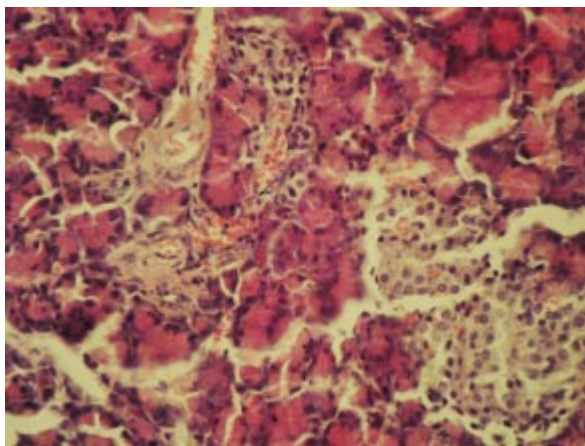
б

Рис. 3. Мікрофотографії підшлункової залози щурів, котрим впродовж 20 діб вводили глютама́т натрію: а – 15 мг/кг, б – 30 мг/кг, x400

Отже, введення глутамату натрію протягом 30 діб у дозах 15 і 30 мг/кг викликає некротичні, некробіотичні та дистрофічні зміни екзо- і ендокриноцитів, лейкоцитарну і лімфоїдну інфільтрацію, периваскулярний і інтерстиціальний фіброз, набряк і дисциркуляторні розлади. А також збільшення площі поперечного перерізу ядер ендо- та екзокриноцитів, що свідчить про інтенсифікацію синтетичних процесів у клітинах підшлункової залози, і зменшення площі поперечного перерізу екзокринних клітин, що є ознакою стимуляції у них секреторних процесів. Описані зміни є характерними для гострого панкреатиту.



а



б

Рис. 4. Мікрофотографії підшлункової залози щурів, котрим впродовж 30 діб вводили глутамат натрію: а – 15 мг/кг, б – 30 мг/кг, х400

Таким чином, отримані нами результати ставлять під сумнів традиційні твердження про те, що використання харчової добавки глутамату натрію в розумних межах (1 г на добу) є безпечним [11, 18]. Ми показали, що щодобове введення глутамату натрію щурам у дозі 15 і 30 мг/кг протягом 30 діб призводить до запалення підшлункової залози. Можна припустити, що його споживання в кількості 3 г на добу є небезпечним для здоров'я людини [7, 12, 16]. Небезпечними можуть бути і низькі дози глутамату натрію (1 і 2 г на добу для середньостатистичної людини) тому, що введення його щурам в дозах 15 і 30 мг/кг (в порівнянні на 1 і 2 г глутамату натрію для людини) протягом 30 діб, призводить до збільшення площі поперечного перерізу ядер ендо- та екзокринних клітин підшлункової залози. Ці факти свідчать про стимуляцію секреторних процесів у екзокринних клітинах.

Що стосується механізму дії глутамату натрію на підшлункову залозу, то глутамат/аспартатпоглинаюча система, аналогічна описаній у центральній нервовій системі, була знайдена в тканині цієї залози [14]. Крім того, численні дослідження показали наявність глутаматних рецепторів в ендо- та екзокринних клітинах підшлункової залози [13]. Отже, можна припустити, що тривале щодобове введення глутамату натрію викликає надмірне збудження глутаматних рецепторів останньої, що призводить до збільшення синтетичних і секреторних процесів у її клітинах та до розвитку панкреатиту.

Для інтерпретації одержаних результатів на людину, слід взяти до уваги той факт, що вік щурів набагато менший, ніж у людини та метаболічні процеси проходять набагато швидше. Більшість дослідників вважають, що 10 діб щурів, відповідають 3 міс людини, 20 та 30 діб – 6 і 9 міс відповідно [9]. Таким чином, глутамат натрію можна включити до групи речовин, що стимулюють секрецію підшлункової

залози, а отримані результати можуть стати експериментальним обґрунтуванням і поясненням погіршення захворюваності на панкреатит, особливо тієї частини населення, що зловживає харчуванням в закладах «фаст-фуд». Одержані результати слід враховувати кожній людині при формуванні щоденного раціону, оскільки глютамат натрію широко використовується в багатьох харчових виробництвах і користується великою популярністю в світі.

## ВИСНОВКИ

1. Тривале щодобове вживання глютамату натрію навіть у безпечних дозах призводить до розвитку панкреатиту, що проявляється лімфоїдною інфільтрацією та фіброзом у інтерстиції, дистрофічними, некробіотичними та некротичними змінами у екзокринній частині залежно від дози введення.

2. Максимальні добові дози харчових добавок, що містять глютамінову кислоту та її солі, мають бути переглянуті, враховуючи їх несприятливий вплив на підшлункову залозу.

**И.В. Лещенко, В.Г. Шевчук,  
Т.М. Фалалеева, Т.В. Берегова**

## ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЛУТАМАТА НАТРИЯ НА СТРУКТУРУ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

Изучали влияние длительного введения глютамата натрия на поджелудочную железу крыс. Установлено, что 30-суточное введение его в дозах 15 и 30 мг/кг (соответствует 1 и 2 г/человека) вызывает некротические, некробиотические и дистрофические изменения экзо- и эндокриноцитов, лейкоцитарную и лимфоидную инфильтрацию, периваскулярный и интерстициальный фиброз, отек и дисциркуляторные расстройства. Следует отметить увеличение площади поперечного сечения ядер эндо- и экзокриноцитов, что свидетельствует об интенсификации синтетических процессов в клетках поджелудочной железы, а также уменьшение площади поперечного сечения экзокринных клеток поджелудочной железы, что является признаком стимуляции в них секреторных процессов. Описанные изменения характерны для острого панкреатита. Сделан вывод, что максимальные суточные дозы пищевых добавок, содержащих глютаминовою кислоту и ее соли,

должны быть пересмотрены, учитывая их неблагоприятное воздействие на поджелудочную железу.

Ключевые слова: глютамат натрия, поджелудочная железа, панкреатит.

**I.V. Leschenko, V.G. Shevchuk,  
T.M. Falalyeyeva, T.V. Bereгова**

## THE INFLUENCE OF LONG-TERM MONOSODIUM GLUTAMATE FEEDING ON THE STRUCTURE OF RATS PANCREAS

The influence of prolonged administration of monosodium glutamate (MSG) on pancreas in rats was studied. It was established that 30-days feeding by MSG in the doses 15 to 30 mg/kg (equivalent to 1 and 2 g/person) leads to necrotic, necrobiotic and degenerative changes in exocrine and endocrine cells, leukocytic and lymphoid infiltration, perivascular and interstitial fibrosis, edema and discirculatory disorders. Introduction of sodium glutamate increases the cross-sectional area of nuclei of exocrine and endocrine cells, indicating intensification of synthetic processes in the cells of the pancreas and reduces the cross-sectional area of exocrine pancreatic cells, which is a sign of stimulation of secretory processes in exocrine cells. The changes described are characteristic of the acute pancreatitis. It is concluded that the maximum daily dose of food supplements containing glutamic acid and its salts should be reviewed because of their adverse effects on the pancreas. It is concluded that the maximum dose of MSG should be reconsidered taking into account its influence on the pancreas.

Key words: monosodium glutamate, pancreas, pancreatitis.

*O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv;*

*Taras Shevchenko National University of Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.:Практика, 1998. – 459 с.
2. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – К. : Мир, 1969.– 648 с.
3. Мальцев В.И., Белоусов Д.Ю. Этическая оценка методик проведения исследований // Ежемесячник «Аптека». – 2001. - № 34. - С. 35.
4. Покровский В.И. Биомедицинская этика. – М., 1997. – 224 с.
5. МОЗ, Центр медичної статистики МОЗ України. – К., 2009. – 105 С.
6. Фалалеева Т.М., Кухарський В.М., Берегова Т.В. Вплив тривалого введення глютамату натрію на структурно-функціональний стан шлунка та масу тіла щурів // Фізіол. журн. – 2010. – 56, № 4. – С. 102–110.
7. Allen D.H., Delohery J., Baker G. Monosodium L-glutamate-induced asthma // J. Allergy and Clin. Immunol. – 1987. – 80. – P. 530–537.



8. Cao Y., Song G. Purinergic modulation of respiration via medullary raphe nuclei in rats // *Respir. Physiol. & Neurobiol.* – 2007. – **155**, № 2. – P. 114–120.
9. Cutler R.G. Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – **82**, № 14. – P.4798–4802.
10. Davies N.E. Chinese-restaurant syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 1968. – **278**, № 20. – P. 1124.
11. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review // *J. Amer. Acad. Nurse Pract.* – 2006. – **18**, № 10. – P. 482–486.
12. Garcна O.J.C., Moyano C., Fonseca J.L., Bellido J. The Chinese restaurant syndrome // *Med. Clin. (Barc).* – 1996. – **107**, № 13. – P. 518.
13. Gendron T.F. Glutamate receptors in peripheral tissue / Eds. Gill S., Pulido O. – New York: Plenum Publishers, 2005. – P. 147–168.
14. Howell J.A. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas // *J. Anim. Sci.* – 2001, – **79**, №5. – P. 1329–1336.
15. Kwok R.H.M Chinese-restaurant syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 1968. – **278**, № 20. – P. 796.
16. Morselli P.L., Garattini S. Monosodium glutamate and the Chinese restaurant syndrome // *Nature (Lond.).* – 1970. – **227**. – P. 611–612.
17. Williams A.N., Woessner K.M. Monosodium glutamate ‘allergy’: menace or myth? // *Clin. Exp. Allergy.* – 2009. – **39**, № 5. – P. 640–646.
18. Yang W.H., Drouin M.A., Herbert M., Mao Y., Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1997. – **99**. – P. 757–762.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;  
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка  
E-mail: neetnool@gmail.com*

*Матеріал надійшов до  
редакції 03.01.2011*

Ю.А. Коряк

## Сократительные свойства и мышечно-сухожильная жесткость трехглавой мышцы голени и их изменения в результате продолжительного постельного режима

*Исследовали влияние длительного (120 сут) постельного режима в антиортостатическом положении (наклон головы  $-5^\circ$ ) на сократительные свойства и мышечно-сухожильную жесткость (МСЖ) трехглавой мышцы голени (ТМГ) у группы ( $n = 4$ ) молодых женщин. Измерялась максимальная произвольная сила (МПС), сила одиночного сокращения ( $P_{oc}$ ) ТМГ в ответ на одиночный стимул супрамаксимальной силой, приложенной к п. tibialis, максимальная сила ( $P_o$ ), развиваемая мышцей в ответ на ритмическую тетаническую стимуляцию п. tibialis с частотой 150 имп/с, время достижения пика  $P_{oc}$  (ВОС) и время полурасслабления ( $1/2$  ПР). Определяли силовой дефицит ( $P_o$ ), МСЖ – по значению электромеханической задержки (ЭМЗ) при выполнении произвольного «взрывного» сокращения. Поверхностными электродами регистрировали электромиографическую активность т. soleus. Использовался специальный таймер, позволяющий синхронно с предъявлением светового сигнала к началу движения выполнять запись развития механического ответа мышцы. По механограмме определяли общее время реакции (ОВР), премоторное время (ПМВ) и моторное время (или ЭМЗ). После экспозиции МПС ТМГ уменьшилась в среднем на 36,1 ( $P < 0,02$ ),  $P_{oc}$  и  $P_o$  – на 11,5 и 24,4 % ( $P < 0,02$ ) соответственно. Значение  $P_o/P_{oc}$  увеличилось на 39,8 % ( $P < 0,001$ ), ВОС – на 13,6 % ( $P < 0,05$ ), отношение  $P_o/P_{oc}$  – на 4,2 %, а время  $1/2$  ПР уменьшилось на 19,2 % ( $P < 0,05$ ). При парном раздражении наибольшая сила сокращения (плато) ТМГ отмечается при интервале 5–10 мс, но впервые она достигалась при интервале 5 мс. Время развития произвольного «взрывного» сокращения значительно возросло без существенных изменений при электрически вызванных сокращениях. ЭМЗ увеличилась на 27,4 % ( $P < 0,05$ ), а ПМВ и ОВР – на 8,7 и 13,6 % ( $P < 0,01$ ) соответственно. Полученные результаты позволяют предположить, что продолжительная механическая разгрузка ассоциируется с уменьшением способности ТМГ развить МПС, уменьшение МПС в большей степени – со снижением центральной (моторной) «посылки». Изменения в скоростных сократительных свойствах ТМГ могут указывать на изменения в кинетике активного состояния мышцы, в механизме электромеханической связи. Более того, исследование демонстрирует прямую связь между ЭМЗ и изменениями жесткости мышечно-сухожильного комплекса после продолжительного постельного режима.*

### ВСТУПЛЕНИЕ

Хорошо известно, что микрогравитация, с которой сталкивается человек во время космического полета или в условиях, моделирующих его, вызывает изменения в различных системах организма и особенно в нейромышечной системе [16]. Феномен

© Ю.А. Коряк

снижения функций и работоспособности мышц после длительного периода разгрузки мышечного аппарата обычно интерпретируется как результат недостатка гравитационной нагрузки. Влияние механической разгрузки на функции и работоспособность скелетных мышц у человека экстенсивно исследуется. Показано, что экспозиция

человека в условиях сниженной мышечной активности (условия 0 G) сопровождается развитием прогрессивной «слабости» скелетных мышц и преимущественно в антигравитационных мышцах [43]. «Слабость» мышц отражается в регистрируемых механических ответах. Без весовой нагрузки уменьшается сила сокращения мышц как следствие развивающейся атрофии. Последнее подтверждается изменениями размера волокон и/или даже типа волокна, в частности – относительно увеличивается быстросокращающиеся волокна в медленной мышце. Такой переход волокон отражается в механических свойствах мышцы, например, увеличивается скорость сокращения [16, 43] и уменьшается жесткость [8, 19].

После космических полетов или условий, их моделирующих, снижается сила сокращения мышц, их масса и физическая работоспособность, а скоростные характеристики мышц не всегда изменяются значительно [1, 15, 28–30]. Показано, что скорость укорочения отдельных мышечных волокон разгруженной мышцы у человека имела тенденцию к повышению, как после моделируемой, так и реальной микрогравитации [46, 47]. Более того, изменялись амплитуда поверхностной электромиограммы (ЭМГ) и отношение сила/ЭМГ, указывая, что нервная система реорганизует паттерн рекрутирования медленных двигательных единиц (ДЕ) со смещением их в сторону быстрых [40].

Поверхностная ЭМГ, ее значение, показывает степень активности мышцы и используется при анализе движения человека. Известно, что между началом появления ЭМГ активности мышцы-агониста движения и началом самого движения (генерирование силы мышцы) наблюдается задержка времени. Эта электромеханическая задержка (ЭМЗ), согласно двухкомпонентной модели мышцы [21,] происходит из-за присутствия серии упругих элемен-

тов, последовательно соединенных с сократительными элементами мышцы. ЭМЗ определяется временем растяжения серии эластического компонента сократительными компонентами мышцы [9, 44]. Таким образом, ЭМЗ является мерой измерения серии эластической жесткости. Жесткость определяется отношением между силой и длиной растяжения. Механически жесткая мышца передает большую силу при очень небольших растяжениях ряда упругих компонент. Наоборот, механически послушная или «слабая» ткань требует, намного большего сокращения мышцы, чтобы растянуть упругие компоненты и произвести силу. Послушным тканям надо больше времени от активности до генерирования силы, т.е. их ЭМЗ более продолжительна.

Снижение функций мышц представляет большой риск для жизнедеятельности космонавтов и/или астронавтов и особенно во время их продолжительных миссий. Поэтому исследования с участием человека позволяют лучше понять основные механизмы, определяющие и лимитирующие сократительные свойства мышц. Влияние механической разгрузки на нервно-мышечный аппарат у женщин остается малоизученным. Это первое исследование с количественной оценкой функциональных свойств отдельной скелетной мышцы *in vivo* у группы молодых женщин в условиях продолжительного постельного режима. Исследование было направлено на изучение влияния такого режима (моделируемого условия микрогравитации) на электрически вызванные (непроизвольные) и произвольные механические свойства антиортостатической мышцы (трехглавой мышцы голени – ТМГ) у здоровых испытуемых (молодых женщин). Таким образом, первая цель настоящего исследования состояла в том, чтобы исследовать изменения силовых, скоростных и скоростно-силовых свойств ТМГ у молодых женщин

в результате продолжительного 120-суточного постельного режима.

С другой стороны, по-видимому, никто не поднимал вопрос об исследовании изменений мышечно-сухожильной жесткости (МСЖ) у человека после механической разгрузки. Мышца и суставная жесткость – важные показатели в управлении движениями, поскольку их величина определяет сопротивление внешнему возмущению. Кроме того, жесткость мышцы может модулироваться изменениями в нервной активации [26]. В литературе описано, что иммобилизация/неупотребление увеличивает мышечную и суставную жесткость, уменьшая диапазон движения [5], а это затрудняет выполнение нормального движения и может изменить нервно-мышечную работоспособность, поскольку жесткость управляет механикой взаимодействия скелетно-мышечной системы и внешней окружающей среды. Если такие изменения происходят во время разгрузки, то ежедневная работа на космической станции может стать критической. Поэтому вторая цель настоящей работы состояла в том, чтобы определить МСЖ ТМГ и ее изменения после продолжительной разгрузки.

## МЕТОДИКА

*Обследованные.* В обследовании участвовала группа здоровых, ведущих обычный образ жизни, женщин-добровольцев возрастом от 28 до 36 лет ( $31,5 \text{ лет} \pm 1,7 \text{ лет}$ ), ростом – 158 и 167 см ( $162,3 \text{ см} \pm 1,9 \text{ см}$ ) и массой тела – 51 и 59 кг ( $55,0 \text{ кг} \pm 1,8 \text{ кг}$ ). Обследованные во время предварительного посещения лаборатории были информированы о целях, методах и процедурах исследования произвольных и электрически вызванных сокращений мышц. После этого каждый обследуемый подписал информированное согласие на участие в обследовании.

Отбор добровольцев базировался на анализе медицинской истории болезни, общего анализа крови, мочи, электрокардиограммы (в покое и при физической нагрузке), биохимического анализа крови, включая анализ глюкозы (натощак), содержание азота в моче в моче крови, креатинина, молочной кислоты, билирубина, мочевой кислоты и холестерина, а также оценки физического состояния при выполнении нагрузочного теста на велоэргометре.

Непрерывная ступенчато-возрастающая работа на велоэргометре при постоянной частоте педалирования 60 об/м с начальной нагрузкой 50 Вт в течение 3 мин; нагрузка последующих «ступеней» повышалась на 25 Вт; критерием прекращения работы было достижение субмаксимальной частоты сердечных сокращений.

Обследованные не принимали медикаментозных средств во время исследования и были некурящими.

Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с Хельсинской Декларацией 1975 г. по правам человека на участие в эксперименте в качестве испытуемого и, программа исследований была одобрена комиссией по биоэтике при Институте медико-биологических проблем.

*Постельный режим.* Моделью, имитирующей длительное влияние фактора невесомости, был постельный режим в антиортостатическом положении (угол наклона головы  $-5^\circ$ ). Длительность механической разгрузки мышечного аппарата составляла 120 сут. Женщины постоянно оставались в антиортостатическом положении, включая прием пищи и гигиенические процедуры. Во время экспозиции на протяжении 24 ч они постоянно находились под контролем медицинского персонала и дополнительно проводился мониторинг их поведения.

Медицинский персонал присутствовал при транспортировании обследуемого, при выполнении личной гигиены, включая

прием пищи, медицинском обслуживании в пределах протокола.

*Измерительная аппаратура.* Сократительные свойства ТМГ измеряли с использованием тендометрического динамометра (подробно описано ранее [2]) за 8–10 сут до начала постельного режима и на 3 сут после его окончания. Протокол испытаний сократительных функций ТМГ до и после постельного режима был идентичным.

*Стимуляция.* Для стимуляции *n. tibialis* применяли универсальный нейромышечный стимулятор (тип «ЭСУ-1», СССР) с изолирующей приставкой. Использовали монополярный электрод – активный электрод (катод, стальной шарик диаметром 1 см) устанавливали под коленной ямкой (место наименьшего сопротивления), а пассивный (анод, Ag/AgCl пластина 6 x 4 см) – на нижней трети передней поверхности бедра. Положение стимулирующих электродов подбирали так, чтобы при некоторой «минимальной» силе раздражения регистрировать (по электромиографическому залпу *m. soleus*) наибольший прямой ответ мышцы (М-ответ). В дальнейшем силу раздражения увеличивали в 1,5–2 раза, что позволяло использовать супрамаксимальную силу раздражения (сила на 30–40 % больше той «минимальной» силы, при которой впервые достигается максимальный М-ответ).

*Электромиограмма.* Для регистрации поверхностной электромиограммы (ЭМГ) биполярные Ag/AgCl электроды (Ø 8 мм; межэлектродное расстояние 25 мм) были помещены по средней линии брюшка камбаловидной мышцы на уровне ниже 2 см головок икроножных мышц. Электроды были заполнены гелем для лучшего электрического контакта с кожей. Дополнительно для уменьшения межэлектродного импеданса до 5 кΩ поверхность кожи в месте установки Ag/AgCl электродов обрабатывали абразивной пастой и протирали раствором спирта с эфиром. Электрод

заземления (Ag/AgCl пластина размером 7,5 x 6,5 см) был помещен в проксимальной части голени между отводящими и раздражающими электродами. Для сигнала ЭМГ использовали усилитель с выносным катодным повторителем (тип «УБП-1-02», СССР). Усиленный сигнал визуально контролировали на экране запоминающего осциллоскопа (тип «С8-9А», СССР) и синхронно регистрировали на светолучевом осциллографе (тип «К-115», СССР).

*Процедура.* Сократительные свойства ТМГ оценивали по механическим показателям произвольного и электрически вызванных (непроизвольных) сокращений. Экспериментальный протокол состоял из четырех частей.

1. При выполнении произвольного изометрического сокращения ТМГ обследованного инструктировали как реагировать на звуковой сигнал – «сократить мышцу как можно сильнее». Во время выполнения задания ему сообщали величину развиваемого произвольного усилия и разрешали зрительный контроль за ним по стрелке динамометра. Каждый обследованный выполнял от 3 до 4 попыток, отделенных отдыхом не менее 1 мин, и наибольшую величину в одной из попыток принимали за показатель максимальной произвольной силы (МПС).

Непроизвольные изометрические сокращения (одиночные, парные и тетанические) ТМГ вызывали электрическим раздражением *n. tibialis*, используя нейромышечный электростимулятор.

Амплитуда сокращения мышцы в ответ на одиночный электрический импульс супрамаксимальной силы, приложенный к *n. tibialis*, являлась показателем изометрической силы одиночного сокращения ( $P_{oc}$ ), а при тетанической ритмической стимуляции (частота 150 имп/с) – максимальной силы ( $P_o$ ) сокращения ТМГ (рис. 1, верхняя панель). Для количественной оценки степени совершенства центрально-

нервных координационных механизмов управления произвольным движением (2) рассчитывали силовой дефицит ( $P_d$ ), определяемый как дельта между  $P_o$  и МПС (см. рис. 1, а).

При парном раздражении второй электрический импульс подавали с интервалом в 3, 4, 5, 10, 20 и 50 мс после первого (2) и определяли максимальную амплитуду второго (суммированного) механического ответа ТМГ. Тетанический индекс (ТИ) определяли отношением амплитуд  $P_o / P_{oc}$  [2]

2. По тендограмме изометрического  $P_{oc}$  ТМГ (см. рис. 1, а) рассчитывали время от момента нанесения электрического стимула (артефакт раздражения) до пика  $P_{oc}$  (время одиночного сокращения  $s_{BOC}$ ) и время от пика  $P_{oc}$  до половины расслабления.

3. Каждого испытуемого тщательно инструктировали, как реагировать на звуковой сигнал – «сократить мышцу максимально быстро и сильно». Регистрируемое произвольное сокращение ТМГ принималось как

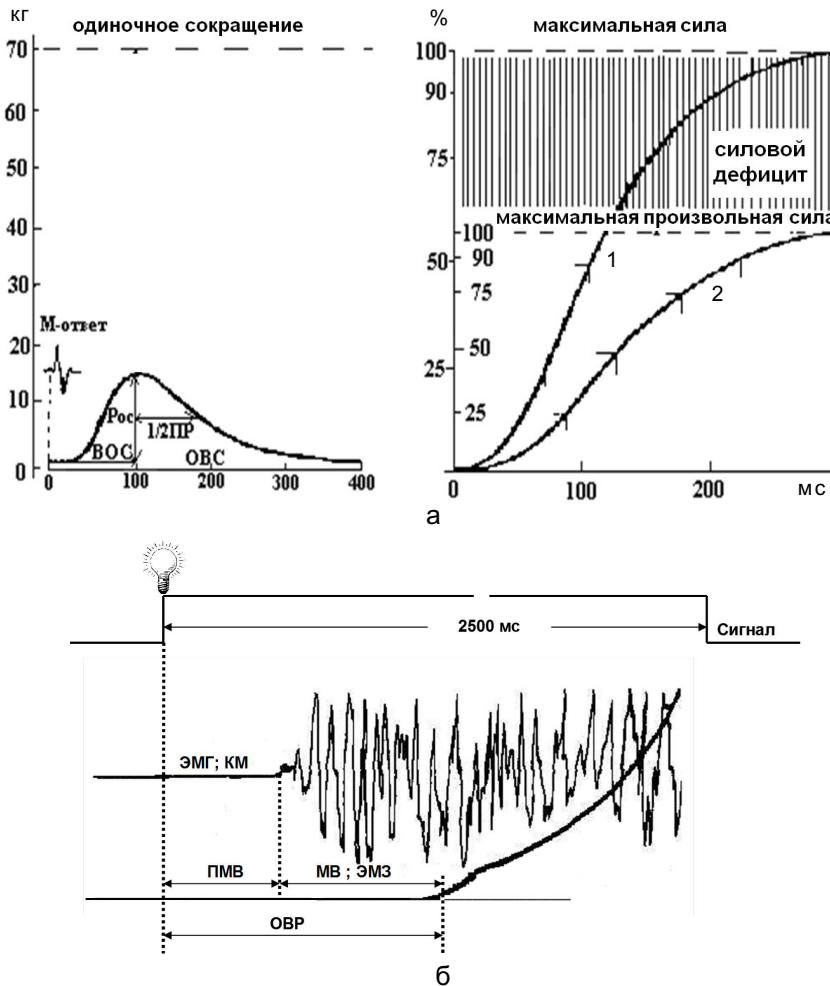


Рис. 1. Тендограммы развития (а) изометрического одиночного сокращения (слева), изометрического тетанического (1) и произвольного сокращения (2) скелетной мышцы (справа) с последующей схемой расчета показателей механических ответов мышечного сокращения. BOC время одиночного сокращения, 1/2ПР время полурасслабления, OBC общее время сокращения,  $P_{oc}$  сила одиночного сокращения. По оси абсцисс: время (мс); по оси ординат – абсолютная (кг) и относительная (% от максимума) сила сокращения. На б: начало развития силы сокращения, общее время реакции (OBR), пре-моторное время (PMB) и моторное время (MB) или электромеханическая задержка (ЭМЗ) и электромиограмма (ЭМГ) камбаловидной мышцы (KM).

«взрывное» баллистическое сокращение. В кривой сила-время определяли время достижения силы сокращения до уровня в 25, 50 75 и 90 % от МПС (2). Аналогично по тендограмме электрически вызванного сокращения при стимуляции *n. tibialis* с частотой 150 имп/с (2) определяли время нарастания электрически вызванного сокращения (см. рис. 1, а).

4. На предъявляемый световой сигнал обследованный выполнял подошвенное сгибание стопой при условии «сократить как можно быстро и сильно» (см. рис. 1, б). Сигналом к движению «взрывного» характера был световой диод ( $\varnothing$  7 мм, 1 Вт), помещенный на расстоянии 1 м перед обследованным, подаваемый от электронного блока. Длительность сигнала составляла 2,5 с и пауза между сигналом в случайном порядке составляла 1,4–4,0 с.

В работе использовали специальный таймер, позволяющий синхронно с предъявлением светового сигнала к началу движения выполнять запись развития механического ответа ТМГ. По механограмме определяли общее время реакции (ОВР), рассчитываемое как временной интервал от предъявления светового стимула до начала развития силы сокращения. ОВР было представлено премоторным временем (ПМВ), определяемым как временной интервал от предъявления светового стимула до начала изменений в электромиографической активности мышцы, и моторным временем (МВ или электро-механическая задержка – ЭМЗ), определяемая как временной интервал от момента появления электрической активности мышцы-агониста движения до начала самого движения, т.е. момента развития сокращения [45] (см. рис. 1,б).

Каждый обследованный выполнял три попытки и лучшая использовалась для определения ОВР, ПМВ и ЭМЗ.

*Статистика.* При обработке полученных результатов исследования использовали

общепринятые статистические методы: рассчитывали среднюю и стандартную ошибку средней ( $M \pm m$ ). Различие между фоновыми (контрольными) показателями и показателями, зарегистрированными после 120-суточного жесткого постельного режима оценивали с помощью параметрического критерия *t* Стьюдента. Значение  $P < 0,05$  принимали как существенное.

Корреляционный анализ использовался, чтобы проверить тесноту связи между ЭМЗ и МПС, а также между ЭМЗ и «взрывной» произвольной силой. Эти связи были определены при помощи коэффициента ранговой корреляции (*r*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса тела обследованных после экспериментального периода увеличилась в среднем на 7,4 % (до  $55,0 \pm 1,8$  после  $59,1 \text{ кг} \pm 2,9 \text{ кг}$ ;  $P < 0,01$ ).

Средние изменения сократительных свойств ТМГ в результате продолжительного постельного режима представлены на рис. 2. Анализ полученных результатов показал существенное уменьшение силы сокращения ТМГ. Так, изометрическая  $P_{oc}$  уменьшилась в среднем на 11,5 % (до  $10,7 \pm 1,3$ , после  $8,7 \text{ кг} \pm 0,6 \text{ кг}$ ;  $P < 0,05$ ), МПС – в среднем на 36,1 % (до  $31,3 \pm 2,2$ , после  $20,0 \text{ кг} \pm 2,3 \text{ кг}$ ;  $P < 0,01$ ) и  $P_o$  – на 24,4 % (до  $51,3 \pm 5,7$ , после  $38,8 \text{ кг} \pm 2,9 \text{ кг}$ ;  $P < 0,02$ ).  $P_d$  после 120-суточного постельного режима значительно увеличился в среднем на 39,8 % (до  $37,6 \pm 4,7$ , после  $48,8 \text{ \%} \pm 3,7 \text{ \%}$ ;  $P < 0,02$ ).

Динамика изометрической силы сокращения ТМГ в зависимости от межимпульсного интервала при парной стимуляции моторного нерва, когда второй импульс наносился через 3, 4, 5, 10, 20 и 50 мс после первого, представлена на рис. 3. Как следует из анализа данных, наибольшая сила сокращения ТМГ при этих условиях отмечается между импульсами 4–20 мс, а

уменьшение или увеличение интервала между импульсами сверх указанных сопровождается значительным ее снижением ( $P < 0,05$ ), не изменяя общей тенденции развития напряжения мышцы. Одновременно изменялся характер расположения кривых при одном и том же межимпульсном интервале, относительный прирост силы сокращения после продолжительного постельного режима был значительно меньше по сравнению с контрольным значением ( $P < 0,001$ ).

Средние значения динамики времени развития изометрического  $P_{oc}$  ТМГ после 120-суточной механической разгрузки представлены на рис. 4. Как следует из анализа результатов, разгрузка мышц-разгибателей стопы сопровождается

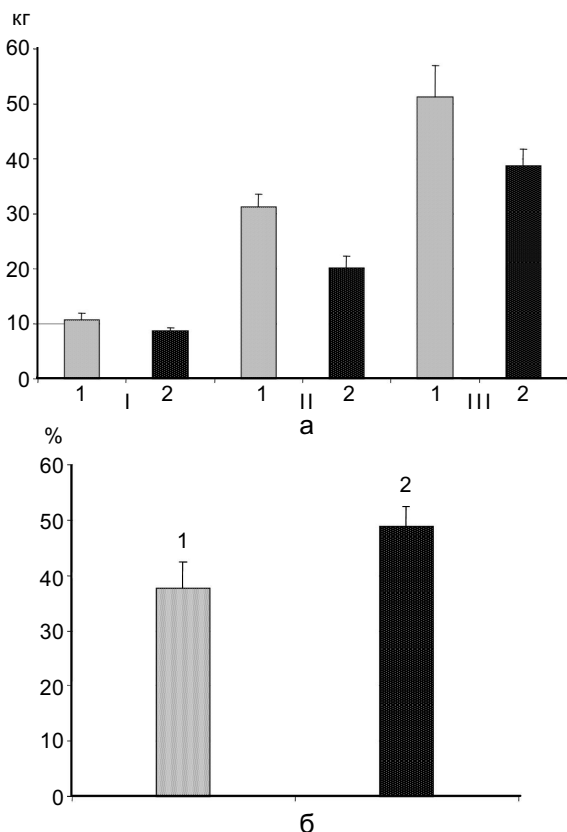


Рис. 2. Влияние постельного режима (120 сут) на силу одиночного изометрического сокращения (I), максимальную произвольную силу (II), электрически вызванное тетаническое сокращение (III) трехглавой мышцы голени (а) и силовой дефицит (б): до (1) и после режима (2)

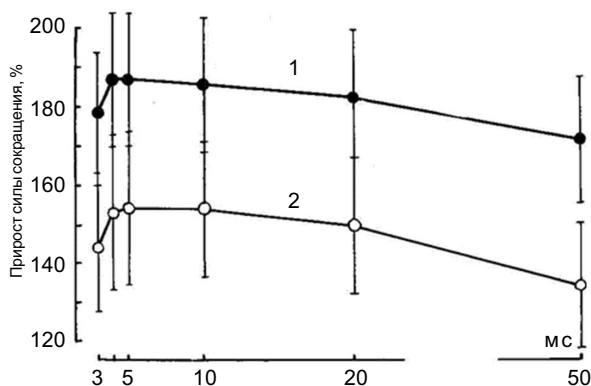


Рис. 3. Влияние постельного режима (120 сут) на максимальную силу изометрических сокращений трехглавой мышцы голени при парном раздражении с разными межимпульсными интервалами: до (1) и после режима (2)

«замедлением» скорости сокращения и увеличением скорости расслабления ТМГ. Так, ВОС после разгрузки увеличилось в среднем на 13,6 % (до  $118 \pm 5$ , после  $134 \text{ мс} \pm 5 \text{ мс}$ ;  $P < 0,05$ ) и уменьшилось время полурасслабления в среднем на 19,2 % (до  $123 \pm 6$ , после  $102 \text{ мс} \pm 7 \text{ мс}$ ;  $P < 0,05$ ) соответственно. Отношение  $P_o / P_{oc}$  увеличилось в среднем на 4,2 % ( $P > 0,05$ ).

На рис. 5 показано изменение времени нарастания, или иначе градиент, изометрического сокращения ТМГ. Из анализа данных следует, что скорость нарастания изометрического произвольного сокращения

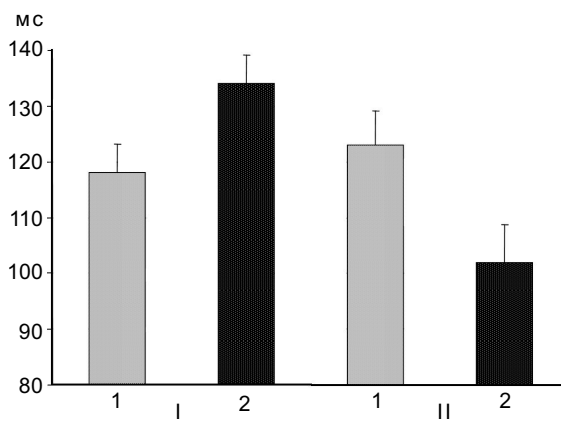


Рис. 4. Влияние постельного режима (120 сут) на время одиночного сокращения (I) и время полурасслабления (II) (1/2 ПР) трехглавой мышцы голени: до (1) и после режима (2)



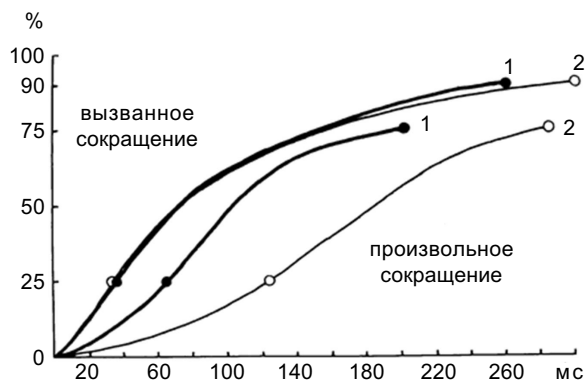


Рис. 5. Усредненные кривые сила-время, выраженные в относительных значениях, при выполнении произвольного «взрывного» (вверху) и электрически вызванного (внизу) сокращений трехглавой мышцы голени (частота 150 имп/с) до (1) и после (2) 120-суточного постельного режима

ТМГ значительно снижается ( $P < 0,01-0,001$ ), что хорошо заметно по уменьшению выпуклости кривой сила-время. Однако, оценивая те же свойства при электрически вызванном тетаническом сокращении, существенных изменений не обнаружено.

Средние данные изменения ЭМЗ при «взрывном» произвольном сокращении ТМГ на предъявляемый световой стимул были существенно больше (на 27,4 %) после постельного режима по сравнению с исходными значениями (до  $45,3 \pm 2,1$ , после  $57,7 \text{ мс} \pm 3,4 \text{ мс}$ ;  $P < 0,05$ ; рис. 6).

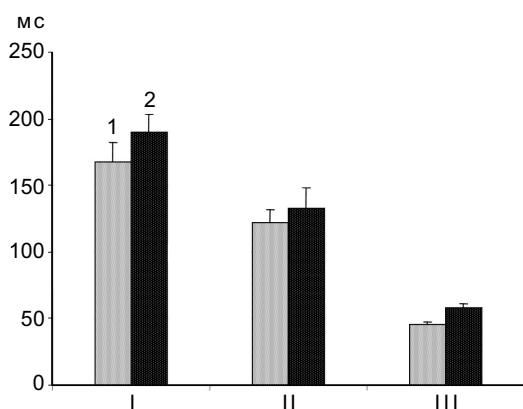


Рис. 6. Влияние постельного режима (120 сут) на общее время реакции (I), пре-моторное время (II) и электро-механическую задержку (III) до (1) и после (2) 120-суточного постельного режима

ПМВ после продолжительной механической разгрузки увеличилось на 8,7 % (до  $121,7 \pm 10,1$ , после  $132,3 \text{ мс} \pm 16,2 \text{ мс}$ ;  $P < 0,01$ ) и ОВР – на 13,6 % (до  $167,4 \pm 15,2$ , после  $190,2 \text{ мс} \pm 13,5 \text{ мс}$ ;  $P < 0,01$ ; см. рис. 6).

Корреляционный анализ, выполненный до механической разгрузки мышечного аппарата, обнаружил тесную связь между ЭМЗ и МПС ( $r = -0,67$ ;  $P = 0,05$ ) и сильную связь между ЭМЗ и «взрывной» произвольной силой ( $r = -0,85$ ;  $P = 0,01$ ). Однако после механической разгрузки корреляционная связь между ЭМЗ и МПС ( $r = -0,47$ ;  $P = 0,05$ ), а также между ЭМЗ и «взрывной» произвольной силой снижается ( $r = -0,65$ ;  $P = 0,07$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящие исследования подтверждают и расширяют полученные нами ранее данные относительно влияния кратковременной [30] и продолжительной разгрузки [28, 29] на механические характеристики медленносокращающейся мышцы, какой является ТМГ [3], подвергнутой механической разгрузке (неупотреблению). Отмечается существенное увеличение ВОС и уменьшение времени полурасслабления после 120-суточной разгрузки. Более вероятное объяснение изменений ВОС при механической разгрузке может быть относительно большая атрофия волокон типа I, которые составляют большинство в ТМГ [23]. Однако, поскольку неупотребление продуцирует атрофию как в быстрых, так и в медленных мышцах, то причиной изменений сократительного ответа [18] может быть другой фактор(ы).

Быстрые изометрические изменения, т.е. длительность  $P_{oc}$ , могут быть связаны с изменениями в функции саркоплазматического ретикула (СР) [7]. Первичным фактором (механизмом) объяснения этих изменений может быть уменьшение скорости возврата  $Ca^{2+}$  из миофибриллярного пространства [7]. Диссоциация была бы

более медленной, если бы скорость возврата  $\text{Ca}^{2+}$  в СР в результате разгрузки была уменьшенной. Такое уменьшение обнаружено после неупотребления [25]. Уменьшенная скорость высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из миофибриллярных белков могла бы увеличить не только время развития кривой  $P_{oc}$ , но также увеличить и силу сокращения, так как увеличилось бы время для разрыва поперечных мостиков. Тенденцию снижения  $P_{oc}$  в настоящем исследовании трудно объяснить. Можно предположить, что это снижение обусловлено нарушениями функций СР. Однако только влиянием СР это трудно объяснить, поскольку эффекты замаскированы атрофией. Это представляет интерес, так как предполагается, что изменения в характеристиках  $P_{oc}$  происходят главным образом в связи с изменениями в СР. Динамика отношения  $P_o/P_{oc}$  и кинетики развития механических ответов ТМГ при парной стимуляции можно было бы также объяснить изменением развития кинетики  $\text{Ca}^{2+}$ . Уменьшение длительности  $P_{oc}$  может отчасти быть следствием снижения  $P_{oc}$ , наблюдаемой в мышце.

Снижение  $P_{oc}$  после продолжительного постельного режима согласуется с предыдущими результатами, которые показали уменьшение МПС и  $P_o$  [28–30]. В настоящем исследовании у всех испытуемых уменьшались как  $P_{oc}$ , так и  $P_o$ . После механической разгрузки  $P_o$  значительно уменьшилось (на 24 %).  $P_o$  является показателем собственно силовых свойств мышцы и, как предполагается, отражает число активных взаимодействий между актином и миозином [11]. Неупотребление, как показано ранее, приводит к снижению  $P_o$  [14, 28–30]. Это снижение вероятно отражает уменьшение числа активных поперечных мостиков и как следствие этого снижение работоспособности. Можно предположить, во-первых, что это произошло после разгрузки, и, во вторых, что сила, генерируемая каждым мостиком,

была снижена. Однако, когда сила мышцы была рассчитана на единицу площади поперечного сечения (ППС), то оказалось, что после неупотребления сила практически не изменялась [42]. Это указывает, что первое предположение об уменьшении максимального числа поперечных мостиков более адекватно объяснению полученных нами результатов, чем изменение плотности мостиков.

Феномен неупотребления как причину реальной или моделируемой невесомости обычно связывают со снижением объема/массы или ППС мышцы. Однако, поскольку большинство мышц у человека перистые, то правильнее было бы интерпретировать атрофию мышцы и ее функциональное последствие, принимая во внимание изменения внутренней организации мышцы, известной как ее архитектура. Ультразвуковые исследования в условиях *in vivo* показали, что неупотребление вызывает существенные изменения мышечной архитектуры, в частности существенное уменьшение длины и угла наклона мышечных волокон по сравнению с исходным состоянием [3, 17, 37]. Уменьшение длины и угла наклона мышечного волокна отражает потерю не только параллельных, но и последовательных саркомеров [37, 41].

Не последнее значение имеют изменения эластических свойств сухожилия, поскольку последнее влияет на длину, при которой функционируют мышечные волокна [37, 41] и, в конечном счете, влияют на производящую силу мышцы. Более того, существенный вклад в снижение силы сокращения мышцы могут внести и изменения в структуре мышечно-сухожильного комплекса [32]. Связь между длиной и углом наклона мышечного волокна является высокоспецифической для мышцы. Архитектура мышцы вместе с ее внутренними свойствами основной детерминант ее функций [24], и если учитывать положение на кровати «лежа на спине», когда

нога в коленном суставе  $180^\circ$  (полное разгибание), то такое положение создает голеностопному суставу немного подошвенно-согнутую позицию. Следует отметить, что изменение положения сегментов тела у человека при разгрузке подтверждается ранее полученными данными [10], согласно которым в условиях реальной невесомости человек принимает особую позу – «сгибабельное положение», что предполагает изменение положения и голеностопного сустава, приводящее к изменению длины мышц-разгибателей стопы. В настоящем исследовании такой вынужденный стимул физиологического укорочения мышцы, возможно, был достаточным, чтобы уменьшить длину, угол наклона мышечных волокон и толщину мышцы, что согласуется с данными модельных исследований [24, 32].

Дополнительно, снижение  $P_0$  целой мышцы позволяет предположить, что продолжительная механическая разгрузка может быть повреждающим фактором по отношению к функционированию системы электромеханической связи [14, 30]. В частности, механическая разгрузка представляет собой фактор, который приводит к более активной адаптации в системе электромеханической связи. Вероятно, разгрузка включает изменения в саркомере потенциала действия и движения по Т-системе и/или прямо влияет на каналы высвобождения  $Ca^{2+}$  из СР. Альтернативно, неупотребление, вызывающее атрофию мышцы, может увеличить внеклеточное пространство так, что напряжение целой мышцы снизится больше, чем ППС волокна.

Механизмы, ответственные за потерю силы при разгрузке/неупотреблении мышц, до сих пор остаются недостаточно ясными. Уменьшение ППС медленно- и быстро-сокращающихся волокон ТМГ не может быть только одним механизмом, ответственным за потерю силы. Атрофия,

вероятно, вносит свой вклад в потерю силы сокращения мышцы [15]. В настоящем исследовании морфологические исследования хотя и не были выполнены, но как показано ранее [20], относительные изменения размера/объема мышцы и волокон были меньше по сравнению с относительным изменением силы сокращения.

Большее (36 %) сокращение МПС по сравнению с незначительным изменением  $P_0$  после 120-суточного постельного режима (24 %) указывает на неспособность центральной нервной системы нормально активировать ТМГ. Происходит ли это из-за недостатка мотивации со стороны обследованных или произвольным снижением нервного возбуждения трудно различить. Все женщины перед выполнением произвольных испытаний были хорошо мотивированы и не сообщали о дискомфорте или болевых ощущениях со стороны коленного сустава, что могло бы объяснить снижение МПС. Увеличение  $P_d$  (см. рис. 2) позволяет предполагать снижение центрального возбуждения в произвольном управлении мышцей моторной нервной системы. Действительно, во время развития МПС непосредственно после механической разгрузки было обнаружено снижение ЭМГ активности [14, 40]. Последнее позволяет предполагать, что меньшее число двигательных единиц (ДЕ) было активировано после неупотребления мышцы и что максимальная частота импульсации ДЕ была сниженной [14]. Уменьшение максимальной частоты импульсации ДЕ может объяснить изменение в проприоцептивных афферентах мотонейронов [34]. Это указывает на то, что будущие исследования с участием человека должны учитывать начальный физиологический статус, чтобы оценить до какой степени разгрузка/неупотребление затрагивает нервные и сократительные свойства мышц при их произвольной активации.

Скорость развития электрически выз-

ванного сокращения изменилась незначительно под влиянием продолжительной механической разгрузки. Это подтверждается ранее полученными данными [29, 50], что не отмечалось существенных изменений в скоростно-силовых характеристиках мышц как у млекопитающих после иммобилизации [50], так и у человека после продолжительного постельного режима [28]. И согласуется с наблюдениями об относительно постоянной механике тетанического сокращения и современной теории (поперечных мостиков) мышечного сокращения [39]. Поэтому можно предположить, что цикличность образования поперечных мостиков [11] мало изменяется (или совсем не изменяется) под воздействием продолжительного постельного режима.

В настоящем исследовании впервые представлены результаты изменения ЭМЗ при произвольных сокращениях ТМГ у группы женщин после длительного постельного режима. Как известно, одна из периферических компонент времени двигательной реакции человека – это ЭМЗ, которая отражает время от появления ЭМГ активности мышцы-агониста движения и началом самого движения, или иными словами, отражает время растяжения сократительными элементами серию вязкоэластического компонента [9], что в свою очередь связано со скоростью развития силы [9, 44]. Следовательно, увеличение/уменьшение ЭМЗ может быть косвенным показателем изменения жесткости МСК [35].

Как показывает настоящее исследование, обнаружено динамику ЭМЗ после постельного режима, что предполагает изменение свойств МСЖ мышцы. Ранее полученные результаты прямо показали, что разгрузка может изменять механическое поведение сухожилия мышцы, т.е. отмечается его удлинение и, как результат этого, снижение жесткости [13, 32, 34, 35], которое может привести к увеличению его

деформации при развитии силы мышцы. В результате мышечные волокна перемещаются в неоптимальную зону отношения напряжение–длина. Как показано ранее, наибольшая величина силы сокращения отмечается в зоне плато отношения напряжение–длина [22, 41]. Поэтому увеличенное укорочение сокращающегося мышечного волокна при увеличенной деформации сухожилия заставляет саркомеры «работать» при более коротких длинах, т.е. далеких от их оптимума, что приводит к снижению уровня генерированной силы.

Изменения в МСЖ мышцы затронут скорость передачи сократительной силы к костной системе. В настоящем исследовании были оценены две переменные, касающиеся скорости передачи силы от мышцы к скелету – это ЭМЗ и скорость развития напряжения. Последняя зависит от жесткости сухожилия и от скорости сокращения, с которой сила передается к костной системе, тогда как ЭМЗ зависит от распространения потенциала действия по мембране мышечного волокна и связи сокращение–возбуждение сократительного компонента, а также от свойств серии вязкоэластических компонент [49]. Поскольку известно, что при разгрузке снижается скорость проведения возбуждения по мембране мышечных волокон обоих типов [4], то это может способствовать удлинению ЭМЗ. Согласно нашим результатам, ЭМЗ после постельного режима увеличилась (+27,4 %) при снижении скорости развития произвольного сокращения, что позволяет предположить о значительном увеличении времени связи возбуждение–сокращение сократительного компонента и серии вязкоэластического компонента, что может быть результатом снижения жесткости сухожилия. Полученные результаты хорошо согласуются с описанными в литературе [32]. Следует отметить, что ЭМЗ существенно повышается после значительного снижения жесткости сухо-

жилия [12], но когда «слабое сухожилие поднято» [36], растягивая мышечно-сухожильный комплекс, то ЭМЗ не изменяется [35]. Это значит, что изменение жесткости сухожилия – важный фактор, определяющий скорость передачи сократительной силы к скелету.

Наши исследования показывают отрицательную связь ЭМЗ с МПС, т.е. короткой ЭМЗ соответствует более высокая МПС. Это означает, что женщины с более высокой МПС имеют более высокое содержание волокон типа II. Интересно, что эта связь изменяется с учетом экспериментальных условий. Так, после разгрузки отмечается ослабление этой связи, иными словами, отмечается меньшая зависимость ЭМЗ от пропорции волокон типа II в мышце. Это может произойти из-за различий в стратегии рекрутирования ДЕ, т.е. меньшее количество волокон типа II активируются при более низкой частоте импульсации. С другой стороны, как известно, увеличение процента волокон типа II в результате тренировки и/или подвешивания конечности, обнаруживает снижение жесткости серии упругих элементов [6, 48]. Полученные результаты согласуются с предыдущими исследованиями, в которых выявлена отрицательная корреляция между ЭМЗ и содержанием волокон типа II [38, 44]. Но изменения в жесткости серии упругих элементов могут быть связаны не только с активной фракцией мышцы, но также и с пассивной [31].

Таким образом, представленные в настоящей работе результаты, показывают, что механические свойства ТМГ у человека изменяются после продолжительного постельного режима. Сравнение механических изменений, зарегистрированных во время произвольных и электрически вызванных сокращений, предполагает, что под воздействием экспериментальных условий были изменены не только периферические процессы, связанные с сокращениями, но

также нервная, моторная, команда – максимальная произвольная (корковая), которая уменьшает частоту уже рекрутированных (работающих) ДЕ или уменьшает число рекрутирования ДЕ, или все вместе. Более того, исследование демонстрирует прямую связь между ЭМЗ и изменениями жесткости МСК после постельного режима. Таким образом, ЭМЗ может быть косвенным индексом степени изменений МСЖ мышцы.

**Yu.A. Koryak**

#### **CONTRACTION PROPERTIES AND MUSCULO-TENDINOUS STIFFNESS OF THE HUMAN TRICEPS SURAE MUSCLE AND THEIR CHANGE AS A RESULT OF A LONG-TERM OF BED-REST**

The effect of a 120-day 5° head-down tilt (HDT) bed rest on the mechanical properties and electromechanical delay (EMD) of the human triceps surae (TS) muscle was studied in four (mean age  $31.5 \pm 1.7$  yr) healthy young women subjects. The TS mechanical properties were evaluated based on the following indicators: maximal voluntary contraction (MVC), maximal strength ( $P_o$ ; frequency 150 Hz), peak twitch force ( $P_{oc}$ ), time-to-peak tension (TPT), half-relaxation time (1/2 RT) and tension development time to reach 25, 50, 75 and 90 % of maximal tension. Force deficit ( $P_d$ ) were estimated. In response to a light signal, the subject was supposed to make a voluntary foot flexion, with the instruction «to exert the fastest and greatest tension». EMD measurements were recorded from each subject during voluntary contraction. Surface electrodes sensed electromyographic (EMG) activity in the soleus muscle. A separate timer was used to determine total reaction time (TRT). Premotor time (PMT) was taken to be the time interval from the delivery of the signal to change in EMG. EMD was the time interval between the change in EMG and movement i.e. the time interval between EMG and the onset of muscle tension. After HDT  $P_{oc}$ , MVC and  $P_o$  decreased by 24.4, 36.1 and 11.5 %, respectively, while  $P_d$  increased by 38.8 %. TPT increased by 13.6 %, while 1/2RT decreased by 19.2 %. The rate of increase of voluntary contractions calculated according to a relative scale significantly increased, while the rate of development of electrically evoked contraction did not show any significant differences. The voluntary contraction EMD increased by 27.4 %; PMT by 8.7 %, and TRT by 13.6 %. Thus, the mechanical changes suggest that weightlessness changes not only the peripheral processes associated with contractions but also the central and neural command. EMD is a simple and quick method for evaluation of muscle stiffness changes. Moreover, EMD can serve as an

indicator of the functional condition of the neuromuscular system.

*State scientific Center of Russian Federation "The Institute of medical biological problems RAS" Moscow, Russia*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьева Л.С., Козловская И.Б. Влияние невесомости и гипокинезии на скоростно-силовые свойства мышц человек // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1987. – **21**. – С. 27–30.
2. Коряк Ю.А. Исследование скоростно-силовых свойств мышечного аппарата человека. – В кн.: Резерв. возможности организма спортсменов / Под ред. Каражанова Б.Б. – Алма-Ата: КазИФК. – 1985. – С. 86–97.
3. Коряк Ю.А. Функциональное и клиническое значение архитектуры скелетных мышц человека // Физиология человека. – 2008. – **34**. – С. 102–112.
4. Христова Л.Г., Гидиков А.А., Асланова И.Ф., Беляева М.Г., Киренская А.В., Козлова В.Г., Козловская И.Б. Влияние иммерсионной гипокинезии на потенциалы двигательных единиц мускулатуры человека // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1988. – **22**. – С. 39–43.
5. Akeson W.H., Amiel D., Abel M.F. Effects of immobilization on joints // Clin. Orthop. – 1987. – **219**. – P. 28–37.
6. Almeida-Silveira M.I., Lambert D., Pйrot C., Goubel F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon // Eur. J. Appl. Physiol. – 2000. – **81**. – P. 252–257.
7. Briggs F.N., Poland J.L., Solard R.J. Relative capabilities of sarcoplasmic reticulum in fast and slow mammalian skeletal muscle // J. Physiol. – 1977. – **266**. – P. 587–594.
8. Canon F., Goubel F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle // Pflug. Arch. – 1995. – **429**. – P. 332–337.
9. Cavanagh P.R., Komi P.V. Electromechanical delay in human skeletal muscle under concentric and eccentric contractions // Eur. J. Appl. Physiol. – 1979. – **42**. – P. 159–63.
10. Слймент G., Gurfinkel V.S., Lestienne F. Mechanisms of posture maintenance in weightlessness. – In: Vestibular and Visual Control on Posture and Locomotor Equilibrium, (Black I., ed.). Basel, Switzerland: Karger. – 1985. – P. 158–163.
11. Close R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscle // Physiol. Rev. – 1972. – **52**. – P. 129–197.
12. Costa P.B., Ryan E.D., Herda T.J. Acute effects of passive stretching on the electromechanical delay and evoked twitch properties // Eur. J. Appl. Physiol. – 2010. – **108**. – P. 301–310.
13. De Boer M., Maganaris C.N., Seynnes O.R. Time course of muscular, neural and tendinous adaptations to 23 day unilateral lower-limb suspension in young men // J. Physiol. – 2007. – **583**. – P. 1079–1091.
14. Duchateau J., Hainaut K. Effects of immobilization on contractile properties, recruitment and firing rates of human motor units // Ibid. – 1990. – **422**. – P. 55–65.
15. Dudley G.A., Duvoisin M.R., Adams G.R. Adaptation to unilateral lower limb suspension in humans // Aviat. Space Environ. Med. – 1992. – **63**. – P. 678–683.
16. Edgerton V.R., Roy R.R. Neuromuscular adaptations to spaceflight. – In: Handbook of Physiology. Environmental Physiology. Bethesda, MD: Amer. Physiol. Soc. – 1996. – 1. – Sect. 4. Chapt. **32**. – P. 721–763.
17. Friedrich J.A., Brand R.A. Muscle fiber architecture in the human lower limb // J. Biomech. – 1990. – **23**. – P. 91–95.
18. Gardetto P.R., Schluter J.M., Fitts R.H. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension // J. Appl. Physiol. – 1989. – **66**. – P. 2739–2749.
19. Goubel F. Changes in mechanical properties of human muscle as a result of spaceflight // Int. J. Sports Med. [Suppl. 4]. – 1997. – **18**. – P. S285–S287.
20. Hikida R.S., Gollnick P.D., Dudley G.A. Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity // Aviat. Space Environ. Med. – 1989. – **60**. – P. 664–670.
21. Hill A.V. The series elastic component of muscle // Proc. R. Soc. – 1950. – **137**. – P. 273–280.
22. Ichinose Y., Kawakami Y., Ito M., Fukunaga T. Estimation of active force-length characteristics of human vastus lateralis muscle // Acta Anat. – 1997. – **159**. – P. 78–83.
23. Johnson M.A., Polgar J., Weightman D., Appleton D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study // J. Neurol. Sci. – 1973. – **18**. – P. 111–129.
24. Kawakami Y., Akima H., Kubo K. Changes in muscle size, architecture and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise // Eur. J. Appl. Physiol. – 2001. – **84**. – P. 7–12.
25. Kim D.H., Witzmann F.A., Fitts R.H. Effects of disuse on sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle // Amer. J. Physiol. – 1982. – **243**. – P. C156–C160.
26. Kirsch R.F., Boskov D., Rymer W.Z. Muscle stiffness during transient and continuous movements of cat muscle: perturbation characteristics and physiological relevance. // IEEE Trans. Biomed. Eng. – 1994. – **41**. – P. 758–770.
27. Komi P.V., Tesch P. EMG frequency spectrum, muscle structure, and fatigue during dynamic contractions in man // Eur. J. Appl. Physiol. – 1979. – **42**. – P. 41–50.
28. Koryak Yu. Contractile properties of the human triceps surae muscle during simulated weightlessness // Ibid. – 1995. – **70**. – P. 344–350.
29. Koryak Yu. Electrically evoked and voluntary proper-

- ties of the human triceps surae muscle: effects of long-term spaceflights // *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* – 2001. – **26**. – №1–2. – P. 21–27.
30. Koryak Yu. Surface action potential and contractile properties of the human triceps surae muscle: effect of “dry” water immersion // *Exp. Physiol.* – 2002. – **87**. – P. 101–111
  31. Kubo K., Akima H., Kouzaki M. Changes in the elastic properties of tendon structures following 20 days bed-rest in humans // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2000. – **83**. – P. 463–468.
  32. Kubo K., Akima H., Ushiyama J. Effects of resistance training during bed rest on the viscoelastic properties of tendon structures in the lower limb // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2004. – **14**. – P. 296–302.
  33. Maganaris C.N., Reeves N.D., Rittweger J. Adaptive response of human tendon to paralysis // *Muscle Nerve.* – 2006. – **33**. – P. 85–92.
  34. Mayer R.F., Burke R.E., Toop J. The effect of long-term immobilization on the motor unit population of the cat medial gastrocnemius muscle // *Neuroscience.* – 1981. – **6**. – P. 725–739.
  35. Mora I., Quintero S., Pйrot C. Electromechanical assessment of ankle stability // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2003. – **88**. – P. 558–564.
  36. Muraoka T., Muramatsu T., Fukunaga T., Kanehisa H. Influence of tendon slack on electromechanical delay in the human medial gastrocnemius in vivo // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – **96**. – P. 540–544
  37. Narici M.V., Cerretelli P. Changes in human muscle architecture in disuse-atrophy evaluated by ultrasound imaging // *J. Gravit. Physiol.* – 1998. – **5**. – P. P73–P74.
  38. Norman R.W., Komi P.V. Electromechanical delay in skeletal muscle under normal movement conditions // *Acta Physiol. Scand.* – 1979. – **106**. – P. 241–248.
  39. Ranatunga K.W. Temperature-dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle // *J. Physiol.* – 1982. – **329**. – P. 465–483.
  40. Recktenwald M.R., Hodgson J.A., Roy R.R. Effect of spaceflight on rhesus quadrupedal locomotion after return to 1G // *J. Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P. 2451–2463.
  41. Reeves N.D., Narici M.V., Maganaris C.N. In vivo human muscle structure and function: adaptations to resistance training in old age // *Exp. Physiol.* – 2004. – **89**. – P. 675–689.
  42. Steven L., Mounier Y., Holy X., Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – **68**. – P. 334–340.
  43. Thomason D.B., Booth F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – **68**. – P. 1–12.
  44. Viitasalo J.T., Komi P.V. Interrelationships between electro-myographical, muscle structure and reflex time measurements in man // *Acta Physiol. Scand.* – 1981. – **111**. – P. 97–103.
  45. Weiss A.D. The locus of reaction time change with set, motivation and age // *J. Gerontol.* – 1965. – **20**. – P. 60–64.
  46. Widrick J.J., Knuth S.T., Norenberg K.M. Effect of a 17 days spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibers // *J. Physiol.* – 1999. – **516**. – P. 915–930.
  47. Widrick J.J., Norenberg K.M., Romatowski J.G. Force-velocity-power and force-pCa relationships of human soleus fibers after 17 days of bed rest // *J. Appl. Physiol.* – 1998. – **85**. – P. 1949–1956.
  48. Widrick J.J., Trappe S.W., Blaser C.A., Costill D.L., Fitts R.H. Isometric force and maximal shortening velocity of single muscle fibers from elite master runners // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1996. – **271**. – P. C666–C673.
  49. Wilkie D.R. The relation between force and velocity in human muscle // *J. Physiol.* – 1949. – **110**. – P. 249–280.
  50. Witzmann F.A., Kim D.H., Fitts R.H. Recovery time course in contractile function on fast and slow skeletal muscle after hind limb immobilization // *J. Appl. Physiol.* – 1982. – **52**. – P. 677–682.

Учреждение РАН «Гос. науч. Центр РФ – Ин-т мед.-биол. проблем РАН», Москва, Россия  
E-mail: < yurikoryak@mail.ru >

Материал поступил в редакцию 05.09.2011

І.В. Редька

## Вікові особливості церебральної гемодинаміки слабозорих дітей дошкільного та молодшого шкільного віку

*Методом реоенцефалографії обстежено 149 слабозорих дітей (75 дошкільників і 74 молодших школярів) та 159 з нормальним зором (I–II групи здоров'я; 79 дошкільників і 80 молодших школярів) з використанням фронтально- та окципітно-мастоїдального відведення. З'ясовано, що церебральна гемодинаміка слабозорих дітей, зберігаючи вікові закономірності, має особливості, що виявляються тенденцією до зниження артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку на фоні підвищення тону артеріальних і венозних судин дрібного калібру та периферичного судинного опору, що стає помітнішим з дорослішанням. Зазначені особливості мозкового кровообігу більш виражені в вертебро-базиллярному басейні порівняно з каротидним і в правій гемісфері порівняно з лівою. Встановлено, що вікові зміни церебральної гемодинаміки полягають у збільшенні дикротичного і діастолічного індексів і периферичного судинного опору при переході від дошкільного до молодшого шкільного віку, що пов'язані зі структурною перебудовою церебральних судин. Слабозорі діти мають більший віковий приріст зазначених показників порівняно з нормальновзорими дітьми.*

*Ключові слова:* церебральна гемодинаміка, слабозорі діти.

### ВСТУП

Переважає більшість морфологічних, фізіологічних і психофізіологічних досліджень феномену зорової депривації спрямована на з'ясування її ролі в становленні біоелектричної активності головного мозку [3, 5, 10], зорової перцепції [3, 13] та морфофункціональної організації кіркових і підкіркових відділів зорової сенсорної системи [18, 24, 28, 30, 33]. Однак, згідно з загальноприйнятою теорією функціональних систем П.К. Анохіна, при депривації будь-яких аферентацій виникають умови нестандартного функціонування, в результаті яких можуть запускатися адаптивно-компенсаторні механізми нервової системи для відновлення взаємодії організму з середовищем. Це зумовлює теоретичне значення досліджень, спрямованих на виявлення адаптивно-компенсаторних реакцій організму у відповідь на обмеження сенсорної аферентації.

© І.В. Редька

Дійсно, дослідження впливу зорової депривації у природних умовах демонструє високу пластичність мозкових функцій і наявність паралельних систем для забезпечення складної поведінки [32]. Аналіз останніх зарубіжних досліджень людей з вадами зору, свідчить про їх орієнтованість на з'ясування пластичності мозку за умов обмеження притоку зорової аферентації з використанням методів викликаних потенціалів і сучасної нейровізуалізації: функціональної магніторезонансної томографії, позитронно-емісійної томографії, причому обговорюється можливість участі потиличної ділянки мозку в обробці сигналів незорової модальності та визначенні їх просторової локалізації [19, 21–23, 25–27, 29, 31, 34].

Окрім з'ясування церебральних механізмів пластичності, важливим практико-орієнтованим напрямом дослідження феномену депривації є з'ясування ролі порушень



мозкового кровообігу в патогенезі захворювань зорового аналізатора та пошук найбільш чутливих періодів у розвитку дитини з вадами зору для впровадження корекційно-реабілітаційних і терапевтичних програм.

Метою нашого дослідження було з'ясування особливостей церебральної гемодинаміки слабозорих дітей у період дошкільного та молодшого шкільного віку та її вікових змін порівняно з нормальнозорими однолітками.

## МЕТОДИКА

Обстежено 149 слабозорих дітей (75 дошкільників і 74 молодших школярів) та 159 нормальнозорих (I–II групи здоров'я; 79 дошкільників і 80 молодших школярів) з використанням крос-секційного методу.

Стан мозкового кровообігу оцінювали за результатами реоенцефалографічного обстеження з використанням фронто-мастоїдального (FM) та окципіто-мастоїдального (OM) відведень з симетричних частин півкуль головного мозку. Під час дослідження реєстрували наступні показники: дикротичний індекс, діастолічний індекс, периферичний судинний опір, амплітуду реографічної кривої, об'ємну швидкість кровотоку.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel (2000) та Statistica 5.5. Розраховували середньоарифметичне значення та його стандартну похибку. Достовірність відмінностей між показниками слабозорих і нормальнозорих дітей встановлювали за допомогою двовибіркового критерію t Стьюдента або U-критерію Манна-Уїтні, вікові зміни – за одновибірковим критерієм t Стьюдента або одновибірковим критерієм Вілкоксона, що визначали типом розподілу результатів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження мікроциркуляторного русла та інтегральних показників

мозкової гемодинаміки дітей дошкільного та молодшого шкільного віку з різним станом зорового аналізатора наведено в таблиці.

Встановлено, що за значенням дикротичного індексу, що відображає тонус судин артеріального типу дрібного калібра, достовірних відмінностей між слабозорими і нормальнозорими дошкільниками не виявлено. Натомість у слабозорих молодших школярів значення цього показника виявилися достовірно вищими у правій гемісфері обох судинних басейнів (на 10,31 % у FMd,  $P \leq 0,01$  та на 16,19 % у OMd,  $P \leq 0,001$ ) порівняно з нормальнозорими дітьми.

При переході з дошкільного до молодшого шкільного віку у дітей обох груп спостерігалось істотне збільшення ( $P \leq 0,001$ ) тону судин артеріального типу дрібного калібра, що очевидно пов'язано з морфологічними змінами церебральних судин. Однак у слабозорих дітей вікове збільшення дикротичного індексу в середньому на 10 % вище за аналогічний показник нормальнозорих дітей.

Якісний аналіз виявив, що у всіх дітей переважає підвищений тонус артеріол, причому їх кількість з віком збільшується. Встановлено, що у молодшому шкільному віці він спостерігався частіше у нормальнозорих дітей порівняно зі слабозорими в басейні каротидних артерій правої гемісфери (97,00 і 87,85 % відповідно  $P \leq 0,05$ ).

Діастолічний індекс, що відображає тонус судин венозного типу дрібного калібра та стан венозного відтоку, у слабозорих дітей порівняно з нормальнозорими в дошкільному віці суттєво не відрізнявся ( $P > 0,05$ ), тоді як в молодшому шкільному віці був вищим у слабозорих дітей на 2,49 % у FMs ( $P > 0,05$ ), на 9,99 % у FMd ( $P \leq 0,01$ ), на 8,72 % у OMs ( $P \leq 0,01$ ) та на 13,53 % у OMd ( $P \leq 0,001$ ).

З віком у всіх дітей достовірно підвищувався дикротичний індекс ( $P \leq 0,001$ ), більш виражено у слабозорих дітей (у

Показники церебральної гемодинаміки слабозорих дітей дошкільного та молодшого шкільного віку

Показники	FM-відведення		OM-відведення		FM-відведення		OM-відведення	
	Ліва гемісфера	Права гемісфера	Ліва гемісфера	Права гемісфера	Ліва гемісфера	Права гемісфера	Ліва гемісфера	Права гемісфера
	Слабозорі діти дошкільного віку (n=75)				Нормальнозорі діти дошкільного віку (n=79)			
Дикротичний індекс, %	53,00±3,15	56,97±2,62	54,18±2,06	57,97±1,93	54,66±1,57	56,49±1,79	56,23±1,95	56,13±1,95
Діастолічний індекс, %	55,10±2,64	57,34±2,26	53,71±2,23	58,94±1,78	56,36±1,76	58,42±2,04	58,52±1,71	59,13±1,57
Периферичний судинний опір, %	76,32±1,68	77,41±2,10	73,27±1,80	75,10±1,81	76,00±1,06	76,88±1,41	76,38±1,34	72,90±1,47
Амплітуда реографічної кривої, Ом	0,20±0,01	0,20±0,01	0,18±0,01	0,16±0,01	0,21±0,01	0,21±0,01	0,17±0,01	0,19±0,01
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,49±0,02	0,50±0,04	0,45±0,04	0,41±0,03	0,55±0,03	0,56±0,02	0,45±0,02	0,52±0,03
	Слабозорі діти молодшого шкільного віку (n=79)				Нормальнозорі діти молодшого шкільного віку (n=80)			
Дикротичний індекс, %	80,65±1,14*	85,6±1,6**,**	78,11±0,99*	89,94±1,67**,**	78,94±1,24*	77,6±1,21*	79,30±1,74*	77,41±2,06*
Діастолічний індекс, %	86,12±0,93*	91,94±1,38**,**	91,65±1,15**,**	100,33±1,77**,**	84,03±1,2*	83,59±1,21*	84,30±1,76*	88,37±1,31*
Периферичний судинний опір, %	88,95±1,06*	92,52±1,6*	89,63±0,93*	98,42±1,71**,**	88,08±1,27*	87,98±1,13*	89,77±1,71*	90,95±1,37*
Амплітуда реографічної кривої, Ом	0,22±0,01	0,19±0,01**	0,19±0,01**	0,15±0,005**	0,22±0,004	0,21±0,01	0,22±0,01*	0,23±0,01*
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,51±0,02	0,46±0,01	0,47±0,02**	0,41±0,02**	0,48±0,02*	0,46±0,02**	0,56±0,02*	0,61±0,02*

\* – відмінності з показниками нормальнозорих дітей у межах однієї вікової групи,  $P < 0,05$ , \*\* – відмінності з показниками дітей дошкільного віку,  $P < 0,05$ .

середньому на 17,96 %), особливо в вертебро-базиллярній системі.

Підвищений тонус венул переважав у всіх дітей упродовж досліджуваного періоду онтогенезу. Відзначимо, що у дошкільному віці у слабозорих дітей у вертебро-базиллярній системі лівої гемісфери значно частіше, порівняно з нормальнозорими виявлявся знижений тонус венул (10,67 і 1,27 % відповідно,  $P \leq 0,01$ ) і рідше – підвищений (60,00 і 75,95 % відповідно,  $P \leq 0,01$ ), тоді як в молодшому шкільному віці – підвищений тонус венул (85,98 і 62,00 % відповідно,  $P \leq 0,001$ ). У цілому ж у слабозорих дітей з віком спостерігалася тенденція до збільшення кількості випадків підвищеного тонуусу венул, особливо у лівій гемісфері ( $P < 0,05$ ), тоді як у нормальнозорих дітей спостерігалася тенденція до їх зменшення.

Периферичний судинний опір, який значною мірою визначається співвідношенням тонуусу судин пре- та посткапілярного русла, у слабозорих дітей мав тенденцію до підвищення порівняно з нормальнозорими впродовж досліджуваного періоду онтогенезу, сягаючи достовірної різниці у молодшому шкільному віці в вертебро-базиллярній системі правої гемісфери (98,42 і 90,95 % відповідно,  $P \leq 0,05$ ).

При переході від дошкільного до молодшого шкільного віку спостерігалася істотне підвищення периферичного судинного опору у усіх дітей ( $P \leq 0,001$ ), яке більш виражене у слабозорих дітей.

У переважній більшості дітей дошкільного віку були нормальні значення периферичного судинного опору у усіх судинних басейнах, тоді як у молодшому шкільному віці в основному переважали – підвищені. У слабозорих дітей молодшого шкільного віку в вертебро-базиллярній системі лівої гемісфери значно частіше відмічали підвищений судинний опір порівняно з нормальнозорими однолітками (92,52 і 77,00 % відповідно,  $P \leq 0,01$ ).

Встановлено, що амплітуда реографічної кривої, що відображає кровонаповнення артеріального русла, у слабозорих дітей мала тенденцію до зниження порівняно з нормальнозорими, сягаючи свого максимуму в молодшому шкільному віці. Так, у слабозорих дітей молодшого шкільного віку артеріальне кровонаповнення у каротидному басейні правої гемісфери знижене на 10,53 % ( $P \leq 0,01$ ), у вертебро-базиллярному басейні лівої та правої гемісфер – на 15,78 ( $P \leq 0,05$ ) та 53,33 % ( $P \leq 0,001$ ) відповідно.

У нормальнозорих дітей з віком підвищувалося кровонаповнення артеріального русла головного мозку, яке найбільш виражене у вертебро-базиллярній системі ( $P < 0,01$ ), тоді як у слабозорих дітей аналогічна тенденція виявлялася тільки для судинних басейнів лівої гемісфери ( $P > 0,05$ ), а в правій гемісфері воно лише незначно знижувалося ( $P > 0,05$ ).

Відзначимо, що у всіх дітей в каротидному басейні переважало нормальне кровонаповнення артеріального русла. У каротидному басейні правої гемісфери у слабозорих дітей молодшого шкільного віку частіше порівняно з нормальнозорими виявлялося його зниження ( $P < 0,01$ ).

У дошкільному віці в вертебро-базиллярному басейні лівої гемісфери серед слабозорих дітей значно більша частина мала підвищене артеріальне кровонаповнення порівняно з нормальнозорими ( $P \leq 0,01$ ), тоді як в молодшому шкільному віці – знижене ( $P < 0,05$ ). У вертебро-базиллярному басейні правої гемісфери у слабозорих дітей спостерігалася більша частота випадків зниженого кровонаповнення артеріального русла порівняно з нормальнозорими дітьми ( $P < 0,05$ ) та менша – підвищеного кровонаповнення ( $P < 0,05$ ).

У цілому з віком незалежно від стану зорової функції відзначається тенденція до нормалізації кровонаповнення артеріального русла обох судинних басейнів, пере-

важно внаслідок зменшення випадків низького кровонаповнення ( $P < 0,05$ ), а у вертебро-базиллярному басейні слабозорих дітей – ще й за рахунок зниження частоти випадків підвищеного кровонаповнення ( $P < 0,01$ ).

Інтегративним показником, що відображає стан церебральної гемодинаміки, є об'ємна швидкість кровотоку. Встановлено, що у каротидному басейні достовірних відмінностей у значеннях цього показника у слабозорих і нормальнозорих дітей упродовж досліджуваного періоду онтогенезу не виявлено ( $P > 0,05$ ). Однак у вертебро-базиллярній системі спостерігалось виражене зниження об'ємної швидкості кровотоку у слабозорих дітей особливо в молодшому шкільному віці, яке сягнуло 19,15 % для лівої гемісфери ( $P \leq 0,05$ ) та 48,78 % для правої ( $P \leq 0,001$ ).

У нормальнозорих дітей з віком спостерігається зниження об'ємної швидкості кровообігу у каротидному басейні ( $P < 0,05$ ) та підвищення у вертебро-базиллярному ( $P < 0,05$ ). У слабозорих дітей вікові зміни цього показника не виражені ( $P > 0,05$ ) та мали різноспрямований характер: у лівій гемісфері спостерігалася тенденція до підвищення, а у правій – до зниження.

У всіх дітей упродовж досліджуваного періоду онтогенезу (за винятком вертебро-базиллярного басейну правої гемісфери нормальнозорих дошкільників) переважала нормальна об'ємна швидкість кровотоку. З віком спостерігалася тенденція до збільшення цього показника в усіх судинних басейнах внаслідок зменшення кількості випадків з гіповолемією ( $P < 0,05$ ). У нормальнозорих дітей в молодшому шкільному віці значно збільшилося число дітей з гіперволемією у вертебро-базиллярній системі ( $P < 0,05$ ). У слабозорих дітей в дошкільному ( $P \leq 0,01$ ) та молодшому шкільному віці ( $P > 0,05$ ) частіше порівняно з нормальнозорими дітьми у вертебро-базиллярній системі лівої гемісфери спостерігалася гіперволемія, тоді як у правій

гемісфері – гіповолемія ( $P < 0,05$ ).

Отже, церебральна гемодинаміка слабозорих дітей, зберігаючи вікові закономірності, має особливості, що виявляються тенденцією до зниження артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку на фоні підвищення тонуусу артеріальних і венозних судин дрібного калібра та периферичного судинного опору, що стає більш помітним з дорослішанням. Зазначені особливості мозкового кровообігу більш виражені в вертебро-базиллярному басейні порівняно з каротидним і в правій гемісфері порівняно з лівою.

Слід відмітити, що виявлені нами зміни церебральної гемодинаміки у слабозорих дітей молодшого шкільного віку узгоджуються з аналогічними реоенцефалографічними дослідженнями дітей 9–17-річного віку з міопією, у яких також відзначалося зниження об'ємної швидкості кровотоку, підвищення периферичного судинного опору, ускладнення венозного відтоку, що більш виражено у вертебро-базиллярному басейні [6, 14, 16].

Наші результати також корелюють з даними доплерографічного дослідження дорослих сліпих людей віком від 24 до 67 років, в якому виявлено підвищення судинного опору, венозну дизгемію та зниження швидкості кровотоку по артеріям головного мозку, ступінь яких залежав від характеру клінічних проявів сліпоти [7].

Дослідженнями показано, що виявлені особливості церебральної гемодинаміки у людей з вадами зору корелюють з загальними дисциркуляторними змінами в сумарній електричній активності головного мозку, що виявляються при електроенцефалографічному обстеженні [14]. Цікавим є факт встановлення компенсаторного підвищення кровотоку в середній мозковій артерії та його залежність від зниження амплітуди  $\alpha$ -ритму та тривалості сліпоти [7].

Відомо, що у зоні кровопостачання вертебро-базиллярного басейну розташовується практично весь зоровий тракт і

внутрішньомозкові відділи зорового аналізатора (верхні горбки чотиригорбикової пластинки, латеральне колінчасте тіло, претектальна ділянка, 17–19-ті поля зорової кори). Крім того, дослідями на тваринах показано, що повне або часткове обмеження зорової аферентації у критичні періоди для розвитку зорової системи здатне змінити або зруйнувати організацію кортикальних нейронів, рецептивні поля та функціональні нейронні зв'язки зорової системи [20, 24, 28, 30, 33]. За умов повної відсутності зорової аферентації розпочинається атрофія нервових клітин сітківки та зорової кори [17].

Зазначене дає змогу припустити, що виявлене нами серед слабозорих дітей зниження кровонаповнення артеріального русла та об'ємної швидкості кровотоку у вертебро-базиллярному басейні порівняно з нормальнозорими очевидно зумовлене зменшенням потоку зорової сенсорної аферентації внаслідок дисфункції зорового аналізатора, що в свою чергу, призводить до зниження рівня нейронної активації, а отже й до зниження метаболічних потреб зазначених структур головного мозку.

Відомо, що в структурах правої півкулі відбувається глобальна обробка зорової та слухової інформації, яка пов'язана з формуванням асоціацій між предметами, явищами, подіями в процесі пізнавальної діяльності, запам'ятовуванням сенсорних стимулів. Зміна кровопостачання структур правої гемісфери у слабозорих дітей порівняно з нормальнозорими, ймовірно, вказує на структурні зміни в асоціативних ділянках головного мозку (зокрема в потилично-тім'яній ділянці). Висловлене припущення узгоджується з даними досліджень, в яких показано, що захворювання периферичного відділу зорового аналізатора, які викликають обмеження зорової аферентації, негативно впливають на дозрівання міжнейронних зв'язків у асоціативних ділянках кори та на формування інтегративних процесів мозку, які лежать в основі

зорового сприйняття [3, 5, 12].

В обговоренні отриманих результатів слід звернути увагу на зміни церебральної гемодинаміки під впливом сенсорної депривації різної модальності. Реоенцефалографічними дослідженнями дітей віком від 7 до 20 років з сенсоневральною приглухуватістю III–IV ступеня виявлено зниження об'ємної швидкості кровообігу та артеріального кровонаповнення у вертебро-базиллярному басейні, починаючи з молодшого шкільного віку [2, 8], та у каротидному басейні, починаючи з підліткового віку [4, 15], що поєднувалося зі зниженням тону судин мікроциркуляторного русла (за винятком підлітків) і порушеннями венозного відтоку в обох судинних басейнах [2, 4, 15].

Таким чином, при сенсорній депривації зміни церебральної гемодинаміки можуть бути як специфічними, так і неспецифічними. На нашу думку [2, 8], до модально-специфічних змін при слуховому дефекті можна віднести підвищення гіпотонії мікроциркуляторного русла та ускладнення венозного відтоку, а при зоровому дефекті – зниження артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку на фоні підвищення тону судин мікроциркуляторного русла. До неспецифічних змін церебральної гемодинаміки в умовах сенсорних дефектів слід відносити більшу залученість до патологічного процесу правої гемісфери та вертебро-базиллярного басейну.

Встановлено, що вікові зміни церебральної гемодинаміки полягають у збільшенні значень дикротичних і діастолічного індексів і периферичного судинного опору при переході від дошкільного до молодшого шкільного віку, що пов'язано зі структурною перебудовою церебральних судин. Слабозорі діти мають більший віковий приріст зазначених показників порівняно з нормальнозорими. Вікова динаміка артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку у різних судинних басейнах розріз-

няється та потребує подальших досліджень. У слабозорих вона менш виражена порівняно з нормальнозорими дітьми.

У літературі єдиної думки щодо вікової динаміки церебральної гемодинаміки у дітей дошкільного та молодшого шкільного віку не існує. І.О. Тупицин [11] відзначає, що з віком дітей зменшується артеріальне кровонаповнення, причому з максимумом у 7-річному віці, а надалі спостерігається незначне зниження до підліткового віку. Тонус дрібних артерій від 7 до 12 років поступово знижується. Також показано [1], що у дітей в період з 5 до 9 років в лобних ділянках головного мозку знижується об'ємна швидкість мозкового кровотоку і тонус судин артеріального типу дрібного калібру. У 6-річному віці артеріальне кровонаповнення судин мозку дещо зменшується порівняно з 5-річними дітьми, а згодом цей показник не змінюється до 11 років, коли відбувається подальше зменшення кровонаповнення [9]. У дітей 7–10 років порівняно з дошкільнятами спостерігається підвищення артеріального кровонаповнення та зниження судинного тону [9].

Отже, вікові зміни церебрального кровообігу вимагають уточнення для чого потрібно є організація лонгітюдних або ж численних поперечних досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Церебральна гемодинаміка слабозорих дітей, зберігаючи вікові закономірності, має особливості, що виявляються тенденцією до зниження артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку на фоні підвищення тону артеріальних і венозних судин дрібного калібру та периферичного судинного опору, що стає більш помітним з дорослішанням. Зазначені особливості мозкового кровообігу більш виражені в вертебро-базиллярному басейні порівняно з каротидним та в правій гемісфері порівняно з лівою.

2. Вікові зміни церебральної гемоди-

наміки полягають у збільшенні значень дикротичного і діастолічного індексів та периферичного судинного опору при переході від дошкільного до молодшого шкільного віку, що пов'язано зі структурною перебудовою церебральних судин. Слабозорі діти мають більший віковий приріст зазначених показників порівняно з нормальнозорими.

**И.В. Редька**

### **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ СЛАБОВИДЯЩИХ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО И МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

Методом реоэнцефалографии обследованы 149 слабовидящих детей (из них 75 дошкольников и 74 младших школьника) и 159 нормальновидящих детей I–II группы здоровья (из них 79 дошкольников и 80 младших школьников) с использованием фронтально- и окципитально-мастоидального отведений. Выяснено, что церебральная гемодинамика слабовидящих детей, сохраняя возрастные закономерности, имеет особенности, проявляющиеся тенденцией к снижению артериального кровенаполнения и объемной скорости кровотока на фоне повышения тонуса артериальных и венозных сосудов мелкого калибра и периферического сосудистого сопротивления, которые становятся более выраженными по мере взросления детей. Указанные особенности мозгового кровообращения более выражены в вертебро-базиллярном бассейне, по сравнению с каротидным и в правой гемисфере по сравнению с левой. Установлено, что возрастные изменения церебральной гемодинамики заключаются в увеличении дикротического и диастолического индексов и периферического сосудистого сопротивления при переходе от дошкольного к младшему школьному возрасту, что связано со структурной перестройкой церебральных сосудов. Слабовидящие дети имеют больший возрастной прирост указанных показателей по сравнению с нормальновидящими.

Ключевые слова: слабовидящие дети, церебральная гемодинамика.

**I.V. Redka**

### **AGE PECULIARITIES OF CEREBRAL HEMODYNAMICS IN VISUALLY IMPAIRED CHILDREN OF PRESCHOOL AND PRIMARY SCHOOL AGE**

149 visually impaired children (including 75 preschoolers and 74 junior pupils) and 159 healthy children of the first- second group of health (including 79 preschoolers and 80 elementary school children) were examined by the method of REG with

using fronto-mastoidal and occipito-mastoidal recordings. Cerebral hemodynamics in impaired children, keeping the age patterns, has features of reduced blood volume and blood flow velocity. These changes were accompanied by an increased tone of arterial and venous vessels of small caliber and peripheral vascular resistance, which becomes more prominent as children get older. These features of cerebral circulation were more pronounced in the vertebro-basilar area compared to the carotid area, and in right hemisphere compared with the left hemisphere. Age-related changes of cerebral hemodynamics are to increase the diastolic and diastolic indices and peripheral vascular resistance during the transition from preschool to primary school age, which is related to restructurization of cerebral vessels. Visually impaired children have a greater increase in these age indices compared with healthy children. Key words: impaired children, cerebral hemodynamics.

*Kherson University*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Безобразова В.Н., Догадкина С.Б. Функциональное состояние кровообращения головного мозга и предплечья у детей 5–9 лет // Физиология человека. – 2001. – 27, № 5. – С. 49–53.
- Гасюк О.М. Взаємозв'язок психофізіологічних функцій з показниками серцево-судинної та респіраторної систем у дітей молодшого шкільного віку із слуховою депривацією: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 20 с.
- Григорьева Л.П., Рожкова Л.А., Толстова В.А. Дети со сложными нарушениями развития: Психологические исследования / Под ред. Григорьевой Л.П. – М.: Экзамен, 2007. – 352 с.
- Кравченко Ю.В. Особливості психофізіологічних параметрів і показників гемодинаміки у молоді із слуховою депривацією: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2003. – 18 с.
- Новикова Л.А. Влияние нарушений зрения и слуха на функциональное состояние мозга. – М.: Просвещение, 1966. – 319 с.
- Пыльцина Н.Ю. О взаимосвязи клинического течения близорукости с анатомическим соматотипом у детей и подростков: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2007. – 22 с.
- Прошина Е.В. Клинико-функциональная характеристика неврологических нарушений при различной длительности слепоты, обусловленной патологией глазного яблока: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Иваново, 2008. – 23 с.
- Редька І.В., Шмалей С.В. Состояние мозгового кровообращения у детей с сенсорными дефектами // Світ біології та медицини. – 2011. – № 2. – С. 155–157.
- Ронкин М.А., Иванов Л.Б. Реография в клинической практике. – М.: МБН, 1997. – 403 с.
- Строганова Т.А., Посикера И.Н. Влияние ранней зрительной депривации на реакцию на новые средовые стимулы в раннем онтогенезе человека // Физиология человека – 1996. – № 5. – С. 20–29.
- Тупицын И.О. Возрастная динамика и адаптационные изменения сердечно-сосудистой системы школьников. – М.: Педагогика, 1985. – 88 с.
- Толстова В.А., Котелов Ю.М. Зависимость эквивалентных источников разных поддиапазонов  $\beta$ -ритма от состояния зрительной системы у детей 8–10 лет // Физиология человека. – 1996. – 22, № 5. – С. 13.
- Фильчикова Л.И. Основы ранней психологической коррекции сенсорного развития детей с нарушениями зрения: Автореф. дис. ... д-ра психол. наук. – М., 1999. – 46 с.
- Хацуков Б.Х., Колчинская А.З. Зависимость электрической активности затылочных и лобных долей коры головного мозга, функции зрительного анализатора от кровоснабжения и обеспечения кислородом // Физиол. журн. – 2000. – 46, № 6. – С. 45–53.
- Шкурпат А.В. Біоелектрична активність і кровообіг головного мозку приглухуватих підлітків: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Херсон, 2010. – 22 с.
- Щербина Т.І. Фізіологічні особливості функціонування серцево-судинної та дихальної систем у слабозорих дітей молодшого шкільного віку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Херсон, 2005. – 19 с.
- Binns K.E., Salt T.E. Post eye-opening maturation of visual receptive field diameters in the superior colliculus of normal- and dark-reared rats // Develop. Brain Res. – 1997. – 97. – P. 263–266.
- Chapman B., Stryker M.P. Development of orientation selectivity in ferret visual cortex and effects of deprivation // J. Neurosci. – 1993. – f3(12). – P. 5251–5262.
- Collignon O., Vandewalle G., Voss P., Albouy G., Charbonneau G., Lassonde M., Lepore F. Functional specialization for auditory-spatial processing in the occipital cortex of congenitally blind humans // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – 108 (11). – P. 4435–4440.
- Crair M.C., Gillespie D.C., Stryker M.P. The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex // Science. – 1998. – 279. – P. 566–570.
- Cuevas I., Plaza P., Rombaux P., Mouraux A., Delbeke J., Collignon O., De Voorder A.G., Renier L. Chemosensory event-related potentials in early blind humans // B-ENT. – 2011. – 7 (1). – P. 11–17.
- Fernández E., Merabet Lotfi B. Cortical plasticity and reorganization in severe vision loss // Visual Prosthetics. – 2011. – Part 1. – P. 77–92.
- Fortin M., Voss P., Lassonde M., Lepore F. [Sensory loss and brain reorganization] // Med. Sci (Paris). – 2007. – 23 (11). – P. 917–922.
- Kossel A., Lowel S., Bolz J. Relationships between dendritic fields and functional architecture in striate cortex of normal and visually deprived cats // J. Neurosci. – 1995. – 15. – P. 3913–3926.
- Lewis L.B., Saenz M., Fine I. Mechanisms of cross-modal plasticity in early-blind subjects // J. Neuro-

- physiol. – 2010 – **104** (6). – P. 2995–3008.
26. Ma Y., Han S. Neural representation of self-concept in sighted and congenitally blind adults // Brain. – 2011. – **134** (Pt 1). – P. 235–246.
27. Renier L.A., Anurova I., De Volder A.G., Carlson S., VanMeter J., Rauschecker J.P. Preserved functional specialization for spatial processing in the middle occipital gyrus of the early blind // Neuron. – 2010. – **68** (1). – P. 138–148.
28. Royal D.W., Krueger J., Fister M.C., Wallace M.T. Adult plasticity of spatiotemporal receptive fields of multisensory superior colliculus neurons following early visual deprivation // Restor Neurol Neurosci. – 2010. – **28** (2). – P. 259–270.
29. Sathian K., Stilla R. Cross-modal plasticity of tactile perception in blindness // Restor Neurol Neurosci. – 2010. – **28**(2). – P. 271–281.
30. Smith E.L., Fern K., Manny R., Harwerth R.S. Interocular suppression produced by rivalry stimuli: a comparison of normal and abnormal binocular vision // Optom. Vis. Sci. – 1994. – **71**, № 8. – P. 479–491.
31. Stevens A.A., Snodgrass M., Schwartz D., Weaver K. Preparatory activity in occipital cortex in early blind humans predicts auditory perceptual performance // J. Neurosci. – 2007. – **27** (40). – P. 10734–10741.
32. Wallraff H.G. Navigation by homing pigeons: updated perspective // Ethology Ecology & Evolution. – 2001. – **13** (1). – P. 1–48.
33. Wiesel T. N., Hubel D. H. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body // J. Neurophysiol. – 1963. – **26**. – P. 978–993.
34. Weisser V., Stilla Randall, Peltier Scott, Hu Xiaoping, Sathian K. Short-term visual deprivation alters neural processing of tactile form // Exp. Brain Res. – 2005. – **166**, № 3–4. – P. 572–582.

*Херсон. ун-т*  
*E-mail: iredka@yandex.ru*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 25.03.2011*



# ОГЛЯДИ

УДК 616.131

Є.В. Стрелков, С.Б. Французова, О.С. Хромов

## Гіпоксична легенева гіпертензія: сучасні погляди на патогенез та шляхи її фармакологічної корекції

*У статті проаналізовано сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичної легеневої гіпертензії у взаємозв'язку з механізмами її розвитку, а також розглянуто перспективні напрямки досліджень для створення нових фармакологічних препаратів у цій галузі.*

*Ключові слова: гіпоксична легенева гіпертензія, гіпоксія, ендотелій, реактивні форми кисню, ліпосоми.*

### ВСТУП

Легенева гіпертензія (ЛГ) – це стан, який має ідіопатичну природу або виникає внаслідок впливу широкого спектра патологічних факторів і характеризується поступовим підвищенням легеневого судинного опору та тиску у легеневій артерії, що призводить до розвитку недостатності правого шлуночка, а за умов декомпенсації – до летальних наслідків. Діагноз ЛГ визначається при середньому тиску у легеневій артерії вище ніж 25 мм рт. ст. у стані спокою та 50 мм рт. ст. при фізичному навантаженні [1].

Розрізняють первинну (спорадичну, есенціальну) ЛГ та вторинну, що виникла як наслідок інших захворювань. Есенціальна ЛГ є патологією невідомої етіології, що швидко прогресує і за відсутності лікування призводить до передчасної смерті хворого. Слід відмітити, первинна ЛГ – це рідкісне захворювання, яке виявляється у 1–2 людей на мільйон [1].

Вторинна ЛГ виникає на тлі багатьох захворювань дихальної та серцево-судинної системи і є поширеною причиною інвалідизації та смертності. Незважаючи на етіо-

логію (вплив токсинів, аутоімунні та механічні ушкодження), у більшості випадків розвиток даної патології тією чи іншою мірою супроводжується гіпоксією. Остання може бути як однією з першопричин, так і виникати з часом як наслідок інших патологічних процесів, посилюючи прояви захворювання [1, 63].

Серед чинників, які викликають вторинну ЛГ можуть бути обструкція верхніх дихальних шляхів, обструктивне нічне апное, гіповентиляція при ожирінні, дисфункція дихального центру тощо. Крім того, гіпоксія може бути пов'язана з такими захворюваннями легень, як хронічна обструктивна хвороба, муковісцидоз, інтерстиціальний фіброз, бронхолегенева дисплазія, радіаційний фіброз, пухлина легень, колагенози [63]. Нейром'язові, скелетні порушення (сколіоз, м'язова дистрофія Дюшена, поліомієліт), високогірна гіпоксія також можуть призводити до гіпоксичної легеневої гіпертензії (ГЛГ) [63]. Такі фактори, як ушкодження паренхіми легень і запалення здатні безпосередньо викликати ЛГ, але у цих ситуаціях гіпоксія, безумовно, робить значний внесок у розвиток патології. Як у

© Є.В. Стрелков, С.Б. Французова, О.С. Хромов

згаданих, так і у багатьох інших випадках в основі розвитку ЛГ лежить явище гіпоксичної легеневої вазоконстрикції (ГЛВ).

*Пускові механізми ГЛГ.* ГЛВ є дуже консервативним процесом, що проявляється як у ссавців, так і у птахів і рептилій. Її вираженість залежить від біологічного виду, віку, статі, досліджуваного об'єкту та деяких генетичних факторів. Вона ініціюється помірною гіпоксією при парціальному тиску кисню в альвеолах меншому ніж 100 мм рт.ст. Головними ефекторними клітинами ГЛВ є прекапілярний шар гладеньком'язових клітин (ГМК) резистивних судин, що знаходяться у вході в ацинус [35, 79].

У фізіологічних умовах ГЛВ обмежує кровообіг ділянок легень з порушеною вентиляцією, наприклад, внаслідок обструкції, спрямовуючи таким чином кров до інших ділянок. У результаті цієї реакції зберігається загальний рівень газообміну, оскільки вирівнюється співвідношення альвеолярної вентиляції та перфузії, зменшується альвеолярне шунтування крові [45].

Відомо, що механізм ГЛВ має саморегуляторний характер. Під впливом гіпоксії в ізольованих ГМК легневих артерій підвищується внутрішньоклітинна концентрація  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), що призводить до їх скорочення. По суті, вони являють собою як сенсорні, так і ефекторні клітини при відповіді судинного русла на гіпоксію [44, 70, 79]. У разі тривалої гіпоксії до них приєднуються й ендотеліальні клітини [5].

Розглядається декілька теорій стосовно того, яким чином клітини «відчувають» зниження парціального тиску кисню. Одна з найпоширеніших з них пов'язана зі змінами у метаболізмі ГМК легневих артерій під час гіпоксії. Багатьом дослідникам видається досить закономірним, що зміни енергетичного статусу та метаболізму клітини за умов дефіциту кисню можуть бути сигналом для розвитку ГЛВ. Такими сигналами теоретично можуть бути

зміни концентрації аденозинтрифосфату (АТФ), окисно-відновний потенціал цитоплазми, співвідношення окиснених і відновлених форм деяких коферментів (наприклад НАД<sup>+</sup>/НАДН) або зміни в утворенні реактивних форм кисню (РФК) [38]. Отже, можливо припустити, що сенсорами зниження парціального тиску кисню є мітохондрії [71].

Існує два основних аргументи на користь теорії про участь мітохондрій у реакціях клітини на зміни напруження кисню: по-перше, інгібітори електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій специфічно пригнічують ГЛВ [44, 76]; по-друге, ГМК легневих артерій без функціонуючого дихального ланцюга не демонструють відповідей на гіпоксію [75]. Водночас не має єдиної думки стосовно того, яким саме чином цей сигнал від мітохондрій викликає підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ .

Вивчаючи механізми розвитку ГЛВ, багато дослідників останнім часом сконцентрували свою увагу навколо ролі РФК. Насамперед це супероксид-аніон і перекис водню, які можуть виступати сигнальними молекулами [24]. Відомо, що в ЕТЛ-перехід електронів з комплексів I та III на молекулярний кисень призводить до утворення супероксидних радикалів ( $O_2^-$ ) [69]. Останні перетворюються супероксиддисмутазою на перекис водню ( $H_2O_2$ ) і можуть дифундувати крізь мембрану мітохондрії до цитозолю. Супероксидний радикал також може пройти крізь аніонний канал і потрапити в екстрамітохондріальний простір [76].

Окисно-відновна теорія Арчера [8] оснований на ідеї, що в умовах нормоксії конститутивне утворення РФК у комплексах I та III ЕТЛ мітохондрій підтримує кальцієві канали в окисненому, тобто активному стані. Він вважає, що під час гіпоксії транспорт електронів по ЕТЛ погіршується, і через це суттєво зменшується утворення РФК, що в свою чергу відновлює елементи калієвих каналів і

спричинює пригнічення їхньої активності, деполаризацію мембрани та вхід  $\text{Ca}^{2+}$  до клітини через канали L-типу. Таким чином, проксимальні інгібітори ЕТЛ повинні імітувати гіпоксію, спричинювати підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та, у зв'язку з цим, вазоконстрикцію. Добре відомо, що такі проксимальні інгібітори, як ротенон, і справді викликають вазоконстрикцію на тлі нормоксії у перфузованих легенях та ізольованих судинах [7, 8, 76]. Ця відповідь є транзиторною та меншою за ту, що викликається гіпоксією. Водночас є відомості і про відсутність вазоконстрикції або підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на тлі вищезгаданих блокаторів [39].

Свідчення, що підтримують альтернативну гіпотезу, здаються більш ґрунтовними. Вона полягає в тому, що гіпоксія, очевидно, спричинює парадоксальне підвищення утворення РФК у комплексі III, ініціюючи підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [24, 39, 75, 76]. Відповідно, антиоксиданти та каталаза повинні пригнічувати ГЛВ та/або підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  без імітації гіпоксії, і це було показано багатьма авторами [75, 76]. Крім того, інгібітори, що діють проксимальніше убісеміхінону в комплексі III також пригнічують і розвиток ГЛВ [39, 76]. Центральна роль цього комплексу та убісеміхінону підтверджується і даними про те що, інгібітори ЕТЛ, які діють дистально, такі, як ціанід (впливав на термінальну цитохромоксидазу в комплексі IV) та антимицин А (впливає на цитохром b562 дистальніше убісеміхінону в комплексі III) нездатні попередити ГЛВ, і навіть можуть стимулювати її розвиток та/або підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [7, 39, 75, 76]. Але є свідчення того, що антимицин пригнічує утворення РФК [7, 44].

Між двома вищезгаданими гіпотезами, як ми бачимо, існує очевидне протиріччя. Разом з тим деякі факти вказують, на наш погляд, що підвищення РФК при гіпоксії є більш імовірним, ніж зниження. По-перше, окисно-відновна теорія передбачає імітацію відповіді на гіпоксію легеневи артерій під

впливом антиоксидантів і каталази, в той час як було показане тільки пригнічення ГЛВ [75, 76], а це є закономірним, якщо утворення РФК при гіпоксії насправді підвищується. По-друге, дослідження показали, що сукцинат, забезпечуючи електронами комплекс III, досить швидко відновлює ГЛВ за наявності ротенону, що передбачалося теорією підвищення вмісту РФК [39]. І, по-третє, донор супероксид-аніона LY83583 викликає скорочення легеневи артерій водночас індукує дилатацію системних судин [36]. Слід зазначити, що дані стосовно впливу антиоксидантів на розвиток ГЛВ дещо суперечливі. У деяких випадках вони або пригнічують, або не впливають на перебіг легеневої вазоконстрикції [9, 20, 31].

Отже, були зроблені спроби застосувати антиоксиданти для терапії ГЛГ. У дослідженнях на тваринах неодноразово показано, що антиоксиданти (зокрема N-ацетилцистеїн, ердостеїн та алопуринол) пригнічують або попереджують розвиток хронічної ЛГ та гіпертрофію правого шлуночка, викликаних гіпоксією [32, 70]. Також відомо, що в легенях хворих на ЛГ (як первинну, так і вторинну), розвивається окисний стрес [32, 33], але до цього часу практично не досліджували можливості корекції порушень легеневого кровообігу при гіпоксії за допомогою антиоксидантів у людей.

*Іонні процеси у розвитку ГЛГ.* ГЛВ ізольованих судин має двофазний характер і складається з початкової транзиторної констрикторної відповіді – перша фаза, за якою йде повільна тривала констрикція – друга фаза [39, 53, 54, 69]. Транзиторна фаза спостерігається у дослідженнях на ізольованих артеріях малого кола кровообігу (в тому числі деендотелізованих) [81] та навіть *in vivo* [65] і може бути охарактеризована як гостра через те, що розвивається протягом декількох секунд від початку гіпоксії та триває від 2 до 6 хв [54, 65].

Ключовою подією першої фази ГЛВ є

підвищення ( $[Ca^{2+}]_i$ ) у ГМК під впливом гіпоксії. Таке явище було показано як для ізольованих ГМК легеневи судин, так і для інтактних легеневи артерій [18, 71]. Зазвичай спостерігається стрімке транзиторне підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ , [18, 24, 54]. Численні дослідження продемонстрували, що ГЛВ здебільшого залежить від позаклітинного кальцію, і що його усунення або блокада входу в ГМК суттєво пригнічує констрикцію легеневи артерій [18, 40, 54, 71].

Відома значна кількість механізмів, які потенційно могли би бути залученими до входу кальцію до ГМК під час гіпоксії. Насамперед слід відмітити потенціалзалежні кальцієві канали, головним чином L-типу. Їх блокатор верапаміл пригнічує розвиток ГЛВ у дослідженнях на ізольованих легенях і легеневи судинах [35, 40, 71]. Типовим механізмом активації потенціалзалежних кальцієвих каналів є деполяризація. Post та співавт. [48] показали, що гіпоксія спричинює деполяризацію в легеневи ГМК також пригніченням калієвих каналів. Це відкриття призвело до появи гіпотези про ключову їх роль у розвитку ГЛВ [78], яка з часом отримала широке розповсюдження. Доведено, що пригнічення різних типів калієвих каналів посилює відповідь судин на гіпоксію [43]. Але численні спостереження, накопичені за останній час, свідчать, що потенціалзалежний вхід  $Ca^{2+}$  до ГМК не є головним фактором у розвитку ГЛВ [46, 57, 72, 77]. Також деякі дослідники вважають пригнічення калієвих каналів є лише допоміжним механізмом вазоконстрикції [26]. Незважаючи на це, на початку 80-х років, коли з'ясувалося, що блокатор кальцієвих каналів L-типу ніфедипін значно активніше знижує загальний легеневи опір, ніж системний, почалося впровадження антагоністів кальцію у медикаментозному лікуванні пацієнтів з ЛГ. Слід зазначити, що найбільш поширені з них (ніфедипін, амлодипін, дилтіазем) у високих дозах ефективно знижують тиск лише приблизно у 50 %

хворих. У ще меншій частині вони здатні викликати регресію дилатації та гіпертрофії правого шлуночка. При цьому існують значні обмеження у використанні антагоністів кальцію у зв'язку з їх впливом на центральну гемодинаміку та роботу серця. Досить часто розвиток системної гіпотонії та тахікардії перешкоджає призначенню цих препаратів у адекватних дозах. У значній кількості хворих спостерігається поступове зниження ефективності антагоністів кальцію. Їхній негативний інотропний ефект є особливо несприятливим при порушенні функції правого шлуночка та може призвести до суттєвого посилення симптомів і навіть смерті хворих на ЛГ. Також дилтіазем і ніфедипін при вираженій дисфункції лівого шлуночка погіршують перебіг серцевої недостатності та збільшують смертність [1].

Якою б не була роль кальцієвих каналів L-типу, зрозуміло, що сам по собі вхід кальцію до ГМК є важливим для ГЛВ. У дослідженнях з видаленням позаклітинного  $Ca^{2+}$  або додаванням неселективного блокатора кальцієвих каналів ГЛВ суттєво пригнічувалася [54]. Насправді в гладеньких м'язах експресується велика кількість каналів, що не залежать від мембранного потенціалу та є проникними для кальцію та інших іонів, зокрема  $Na^+$ . Такі неселективні катіонні канали пов'язані з рецепторзалежними кальцієвими каналами та механізмами ємнісного входу кальцію, що активуються при спустошенні внутрішньоклітинних депо. Нещодавно було показано, що ємнісний вхід кальцію відіграє надзвичайно важливу роль у констрикції невеликих легеневи артерій, і, як мінімум, транзиторна фаза ГЛВ (і підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ , та наступне скорочення) практично повністю залежить від нього [71]. У системних артеріях подібного не спостерігається [54, 61]. Водночас  $[Ca^{2+}]_i$  під час тривалої фази ГЛВ тільки частково зменшується під впливом  $La^{3+}$ , який здатен повністю блокувати

емнісний вхід кальцію [54]. Отже, під час тривалої фази ГЛВ активується додатковий потенціалнезалежний механізм входу  $\text{Ca}^{2+}$  до клітини, пов'язаний з неселективними катіонними каналами, але він залишається невідомим.

*Ендотеліязалежні механізми ГЛГ.* Тривала фаза гіпоксичної легеневої вазоконстрикції починається через декілька хвилин після початку гіпоксії і може тривати години і навіть доби за умов хронічної гіпоксії. Вважається, що друга фаза є фізіологічно більш важливою ніж транзиторна, завдяки їй зміни кровотоку у відповідь на зниження парціального тиску кисню підтримуються протягом усього періоду гіпоксії, призводячи врешті-решт до гіпертрофії правого шлуночка та серцевої недостатності [1, 40].

Тоді як у першій фазі ГЛВ підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  іде паралельно із наростанням тонузу легеневи артерій, під час другої концентрація кальцію залишається стабільною, але тонус судин підвищується [51, 54]. Показано, що відсутність кореляції між тонусом ГМК і  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  під час тривалої фази ГЛВ є наслідком підвищення їх кальцієвої чутливості [52]. Видалення ендотелію попереджає розвиток тривалої ГЛВ незалежно від  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у ГМК легеневи артерій [52], і констрикція у такому разі змінюється дилатацією. Таким чином, саме вплив ендотелію на ГМК легеневи судин зумовлює підвищення кальцієвої чутливості їх скоротливого апарату та викликає тривале скорочення [52]. У зв'язку з цим зміни функціональної активності легеневого ендотелію розглядаються багатьма дослідниками як головний фактор патогенезу ЛГ.

Відомо, що розвиток ендотеліальної дисфункції в умовах гіпоксії насамперед пов'язаний із порушенням структури плазматичних мембран ендотелію. Ультраструктурні дослідження демонструють ушкодження плазмолем ендотеліоцитів легеневи капілярів у тварин, які піддавалися гострій чи хронічній гіпоксії. Остання також

значно змінювала ліпідний склад мембран. Головні з них полягають у зменшенні вмісту фосфатидилхоліну та деяких інших фосфоліпідів, змінах структури та збільшенні індексу ненасиченості їх жирних кислот [63]. Усе це суттєво порушує функції плазматичної мембрани та клітинного метаболізму в цілому і може бути причиною ендотеліальної дисфункції при гіпоксії.

До порушення ліпідного складу мембран ендотеліоцитів, на наш погляд, можуть бути залучені декілька механізмів. По-перше, деградація фосфоліпідів у плазмолемі можлива внаслідок окисного стресу, викликаного гіпоксією. Вже на 10-ту хвилину гіпоксії вміст дисульфиду глутатіону в плазмі крові у щурів значно вище від норми, що вказує на активацію процесів перекисного окиснення [14]. На користь останнього також свідчить підвищення вмісту первинних і вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у клітинах легеневого ендотелію [63]. Разом з цим було виявлено і значне підвищення вмісту гідропероксиду фосфатидилхоліну [32], що, ймовірно, є наслідком активної деградації фосфатидилхоліну у плазматичних мембранах ендотеліальних клітин.

По-друге, під впливом гіпоксії пригнічується синтез фосфатидилхоліну – одного з найважливіших фосфоліпідів мембрани. У тканинах (за винятком печінки) цей фосфоліпід утворюється по шляху Кеннеді на основі наявного холіну [6]. Ключовою реакцією цього шляху є приєднання цитидину до фосфохоліну за допомогою цитидинтрифосфат-фосфохолін цитидилтрансферази, у результаті якої утворюється цитидин-5'-дифосфохолін. Важливість цієї реакції полягає в тому, що саме її швидкість є обмежувальним фактором синтезу фосфатидилхоліну. Було показано, що активність цитидилтрансферази пригнічується як при зменшенні доступності АТФ та ацидозі, які, безумовно, супроводжують гіпоксією, так і безпосередньо при зниженні парціального

тиску кисню [10, 56].

В умовах розвитку ендотеліальної дисфункції, яка супроводжується порушенням структури плазматичних мембран клітин і втратою фосфоліпідів, ефективним може виявитися застосування малих моноламельарних незавантажених фосфатидилхолінових ліпосом. Відомо, що останні відновлюють ендотелійзалежну компоненту вазодилатації при артеріальній гіпертензії у щурів зі спонтанною гіпертензією та при гіпертензії, викликаній іонізуючим  $\gamma$ -опроміненням [2]. Крім того, фосфатидилхолінові ліпосоми здатні відновлювати нормальний тонус резистивних судин великого кола кровообігу в умовах гіпоксії [4]. Імовірним механізмом здійснення ефекту ліпосом може бути взаємодія з клітинними мембранами, що нормалізує функціональний стан ендотелію [62].

Нещодавно у дослідженнях *in vivo* було продемонстровано, що фосфатидилхолінові ліпосоми на 58 % пригнічують транзиторну та повністю усувають ендотелійзалежну фазу гіпоксичної легеневої вазоконстрикції і, таким чином, запобігають розвитку ЛГ [3]. Отже, вони можуть стати новим ефективним засобом для фармакологічної корекції ГЛГ. Слід також відзначити невелику кількість побічних ефектів, які виникають при застосуванні фосфатидилхолінових ліпосом у клініці.

Результати досліджень підтверджують, що під впливом гіпоксії ендотеліоцитами вивільняється деяка вазоконстрикторна субстанція, але встановити її природу поки що не вдалося [23, 53, 68]. Першим потенційним кандидатом на роль такої субстанції став ендотелін-1. Припускалося, що він може відігравати ключову роль у констрикції легеневої артерії при гіпоксії [59]. Проте антагоністи ендотелінових рецепторів найчастіше нездатні заблокувати розвиток ГЛВ [42, 59]. Крім того, екзогенні ендотелін-1 та ендотелін-3 пригнічують ГЛВ, якщо аплікація відбува-

лася під час гострої гіпоксії [19, 29]. Незважаючи на це, застосування блокаторів ендотелінових рецепторів є одним з сучасних напрямків розвитку фармакологічної корекції ЛГ. Одним з перших препаратів такого типу став бозентан – непептидний антагоніст  $ET_A$ - та  $ET_B$ -рецепторів. Його вплив полягає у зниженні опору легневих судин, пригніченні запальних реакцій, що попереджає збільшення проникності судин і розвиток фіброзу. Водночас антагоністи ендотелінових рецепторів спричинюють важкі побічні впливи. Насамперед це – гепатотоксичність. Зокрема, селективний блокатор  $ET_A$ -рецепторів ситаксентан, який виявився досить ефективним при фармакологічній корекції ЛГ, був заборонений у країнах Євросоюзу, Канаді та Австралії після того як спричинив декілька летальних випадків. Прийом препаратів цієї групи повинен відбуватися під постійним контролем функції печінки. Також у блокаторів ендотеліну виявлені і тератогенні властивості [1, 30]. Ще однією мішенню для фармакологічного впливу, пов'язаною з ендотелієм, стала система оксиду азоту. Дані стосовно ролі оксиду азоту в регуляції тону судин малого кола кровообігу в нормі та при ЛГ суперечливі [28], але результати досліджень, зокрема потенціалія ГЛВ інгібіторами NO-синтази, дають змогу припустити, що синтез оксиду азоту не змінюється або підвищується під час гіпоксії [28]. Так, блокада NO-синтази за допомогою L-NAME не впливає на зміни тиску у правому шлуночку серця щура під час гіпоксії [65]. Показано пригнічення ГЛВ під впливом блокаторів цГМФ-фосфодіестерази у дослідженнях на ізольованих легенях щура. При цьому блокатори не впливали на перфузійний тиск в умовах нормоксії [16]. Враховуючи те, що цГМФ-фосфодіестераза інактивує вторинний посередник при синтезі NO – цГМФ, такі результати добре узгоджуються з теорією компенсаторного підвищення вмісту NO

при розвитку ГЛВ. Треба зазначити, що на вміст цГМФ у ГМК можуть впливати і інші фактори.

У клінічній практиці було показано, що опір легеневих судин зменшується при призначенні інгаляцій оксиду азоту [22]. Крім того, як показано у більшості досліджень, вони суттєво не впливають на системний артеріальний тиск [28, 50, 55]. Показана низька кореляція між змінами тиску у легеневій артерії та оксигенації, у зв'язку з чим припускається, що позитивний вплив оксиду азоту скоріше пов'язаний із ефектом перерозподілення кровотоку, ніж з його збільшенням [12]. Реакція на інгаляції NO у пацієнтів буває не завжди [12] і, ймовірно, залежить від етіології ЛГ. Одним з головних недоліків оксиду азоту як терапевтичного засобу є так званий «синдром відміни», що полягає у значному посиленні ЛГ та розвитку гіпоксемії при припиненні інгаляцій [11]. Імовірно він пов'язаний із пригніченням продукції ендогенного NO під впливом його штучного введення. Токсичність цього газу залишається предметом досліджень. Він реагує з киснем з утворенням активних оксидантів, вплив яких на клітинний метаболізм в таких умовах з'ясовано не повністю [12]. Відомо, що одним з таких продуктів взаємодії є діоксид азоту (NO<sub>2</sub>), який є токсичною сполукою і може викликати набряк легень. Також високі концентрації оксиду азоту спричинюють метгемоглобінемію і можуть призвести до летальних випадків [15].

На відміну від екзогенного оксиду азоту блокатори цГМФ-фосфодіестерази типу 5, насамперед сілденафіл (віагра, реватіо), нині досить успішно використовуються в клініці для фармакологічної корекції ЛГ, хоча мають характерні побічні ефекти [30].

В той час як природа ендотеліозалежного вазоконстрикторного фактора, відповідального за розвиток тривалої фази ГЛВ невідома, існує більша ясність у питанні

механізму його впливу на ГМК легеневих артерій.

При дослідженні феномена кальцієвої сенситизації скоротливого апарату ГМК легеневих артерій була висунута теорія, згідно з якою потенційним медіатором сенситизації могла бути протеїнкіназа С (ПКС). Остання залучена до відповіді ГМК на велику кількість скоротливих факторів. Серед них адреналін, ендотелін-1, ангіотензин-II, серотонін, тромбоксан A<sub>2</sub>, простагландин F<sub>2α</sub> [74]. Крім того, ПКС у ГМК легеневих артерій може бути чутлива до гіпоксії. Так, у легеневих артеріях овець активність ПКС зростала на фоні гострої гіпоксії [47]. У дослідженнях на багатьох моделях було підтверджено, що ПКС модулює тонус судин малого кола кровообігу під час гіпоксії і, таким чином, бере участь у розвитку ГЛГ [51]. Так, блокада ПКС за допомогою хелеретрину повністю усуває першу фазу ГЛГ та пригнічує другу на 36 % [65]. Вагомі докази причетності ПКС до розвитку вазонстрикторної відповіді на гіпоксію були отримані у дослідженнях на мишах з генетично зумовленою відсутністю експресії ПКС-ε при незмінній експресії інших її ізоформ [41]. В ізольованих легенях ГЛВ була на 50 % менше вираженою, ніж у нормальних мишей. Різниця у відповідь на дію ангіотензину-II і гіперкалієвий розчин не спостерігалася.

Незважаючи на факти, які підтверджують важливу роль ПКС у розвитку ЛГ, блокатори цього ферменту в клініці не використовуються. Головним чином це пов'язано із низькою вибірковістю та досить високою токсичністю наявних інгібіторів ПКС.

У дослідженнях *in vitro* й *in vivo* було продемонстровано, що активація ПКС у судинах малого кола кровообігу під час гіпоксії може відбуватися під впливом фосфатидилхолінспецифічної фосфоліпази С (ФХ-ФЛС). Пригнічення останньої за допомогою блокатора D609 попереджує

розвиток ЛГ у експериментальних тварин і не впливає на системний артеріальний тиск при гіпоксичній гіпоксії, а також не викликає суттєвих змін у гемодинаміці в умовах нормоксії [65]. Є підстави припускати, що активація ФХ-ФЛС може призводити до підвищення кальцієвої чутливості ГМК легеневих судин також і незалежно від ПКС. Слід зазначити, що блокатор ФХ-ФЛС D609 є низькотоксичною сполукою, яка має також антиоксидантні властивості, але на цей час клінічні випробування її ефективності для корекції ГЛГ ще не проводилися.

*Альтернативні засоби фармакологічної корекції.* Дослідження, спрямовані на пошук нових засобів терапії ЛГ, тривають. Нині розробляється та випробується низки нових препаратів. Зокрема, вивчається можливість використання статинів у зв'язку з їх протизапальною та антипроліферативною дією. Ефективність застосування статинів при ЛГ була показана у дослідках на гризунах [34]. Клінічні дослідження у цьому напрямку тільки почалися. Як було показано, естрогени також здатні пригнічувати розвиток ЛГ у тварин, і зараз проходить перша фаза досліджень для з'ясування доцільності їх використання у клініці [49]. Для терапії ЛГ були здійснені спроби застосування антагоніста рецепторів тромбоксану  $A_2$ , тербогрелу, але рандомізовані клінічні випробування були передчасно припинені у зв'язку з виникненням значних побічних ефектів [37]. Крім того, дослідження не виявили суттєвого внеску тромбоксану  $A_2$  у розвиток ГЛВ [17]. У зв'язку з тим, що серотонін потенціює проліферацію гладеньких м'язів, а структурні зміни його переносника супроводжують розвиток ЛГ, пов'язаної із хронічною обструктивною хворобою легень, блокатори рецепторів серотоніну також розглядаються як потенційні ліки для терапії легеневої гіпертензії [21]. Використання таких засобів генної терапії, як

трансфекція генів синтази оксиду азоту або простагліцину, вважається можливим, але придатні для цієї мети вектори ще не створені [30].

Гіпотетичною мішенню при ГЛГ для майбутніх фармакологічних препаратів може стати фактор, індукований гіпоксією (від англ. hypoxia induced factor, HIF), який для адаптації клітин до низького парціального тиску кисню посилює експресію відповідних генів (еритропоетину, ендотеліального фактора росту, гліколітичних пептидів тощо) [80]. За деякими даними недостатність гена HIF у мишей попереджує пригнічення калієвих струмів у ГМК легеневих артерій і гіпертрофію правого шлуночка при гіпоксії [58]. Також розглядається можливість застосування активаторів проліл-гідроксилаз, які ініціюють деградацію HIF [60], але на сьогодні засобів, які могли би впливати на активність цього фактора та були б придатними для застосування, немає.

Отже, в результаті огляду наявних засобів корекції ГЛГ ми бачимо, що дія жодного з розглянутих препаратів фактично не спрямована на нейтралізацію первинного механізму підвищення тону легеневих судин в умовах гіпоксії, а лише компенсує його за рахунок деяких механізмів вазодилатації. У зв'язку з цим більшість препаратів характеризуються недостатньою та/або вибірковою ефективністю та значними побічними ефектами. Головним чином це є наслідком неповного розуміння патогенетичних механізмів ГЛГ. Крім того, більшість засобів, які застосовуються нині, мають недостатню селективну дію відносно судин малого кола кровообігу. Серед наявних фармакологічних препаратів практично всі тією чи іншою мірою сприяють розвитку небажаної системної гіпотонії.

Таким чином, ключові механізми виникнення та перебігу ГЛГ ідентифіковані ще не повністю, що перешкоджає розвитку адекватних засобів її корекції. Створення



нових ефективних фармакологічних препаратів значною мірою залежить від успіху подальших досліджень у цій галузі.

**Є.В. Стрелков, С.Б. Французова, А.С. Хромов**

**ГИПОКСИЧЕСКАЯ ЛЕГОЧНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА ПАТОГЕНЕЗ И ПУТИ ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ**

В статье проанализированы современные подходы к фармакологической коррекции гипоксической легочной гипертензии во взаимосвязи с механизмами ее развития, а также рассмотрены перспективные направления исследований для создания новых фармакологических препаратов в этой области.

Ключевые слова: гипоксическая легочная гипертензия, гипоксия, эндотелий, реактивные формы кислорода, липосомы.

**Іє.V. Strilekov, S.B. Frantsuzova, O.S. Khromov**

**HYPOXIC PULMONARY HYPERTENSION: MODERN VIEWS ON PATHOGENESIS AND OPTIONS FOR RATIONAL PHARMACOLOGICAL CORRECTION**

In the article, an analysis of the modern approaches to pharmacological correction of hypoxic pulmonary hypertension in conjunction with its development mechanisms has been performed. Promising research trends for the creation of new drugs in this field have also been reviewed.

Key words: hypoxic pulmonary hypertension, hypoxia, endothelium, reactive oxygen species, liposomes.

*State Institution "Institute of pharmacology and toxicology of the NAMS of Ukraine"*

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Мартынюк Т.В., Коносова И. Д., Чазова И.Е. Современные подходы к медикаментозному лечению легочной гипертензии // *Consilium Med.* – 2003. – №5. – С. 83–86.
2. Соловйов А.І., Тишкін С.М., Хромов О.С., Стефанов О.В. Скорочувальна функція судин при артеріальній гіпертензії різного генезу та її корекція за допомогою фосфатидилхолінових ліпосом // *Фізіол. журн.* – 2002. – 48. – № 6. – С. 11–17.
3. Стрелков Є.В., Хромов О.С. Механізм розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії та її фармакологічна корекція // *Фармакологія та лікар.*

- токсикологія. – 2009. – 11. – № 4. – С. 20–25.
4. Хромов О.С., Соловйов А.І. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом в медицині // *Там само.* – 2008. – № 4–5. – С. 88–98.
5. Aaronson P.I., Robertson T.P., Ward J.P. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – 132. – P. 107–120.
6. Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. Cytidine-52-diphosphocholine (CDP-choline) affects CTP: phosphocholine cytidyltransferase and lysophosphatidylcholine after transient brain ischemia // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – 76. – P. 390–396.
7. Archer S.L., J. Huang, Henry T., Peterson D., Weir E.K. A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature // *Circulat. Res.* – 1993. – 73. – P. 1100–1112.
8. Archer S., Michelakis E. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O<sub>2</sub> sensors, and controversies // *News Physiol. Sci.* – 2002. – 17. – P. 131–137.
9. Baillie J.K., Thompson A.A.R., Irving J.B., Bates M.G.D., Sutherland A.I., MacNee W., Maxwell S.R.J., Webb D.J. Oral antioxidant supplementation does not prevent acute mountain sickness: double blind, randomized placebo-controlled trial // *Q.J.M.* – 2009. – 102. – P. 341–348.
10. Bhat G.B., Block E.R. Effect of hypoxia on phospholipid metabolism in porcine pulmonary artery endothelial cells // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 1992 – 262. – P. L606–L613.
11. Bigatello L.M., Hurford W.E., Kacmarek R.M., Roberts J.D., Zapol W.M. Prolonged inhalation of nitric oxide in patients with severe adult respiratory distress syndrome // *Anesthesiology.* – 1994. – 80. – P. 761–770.
12. Blythe D., van Heerden P.V. The pulmonary circulation and selective pulmonary vasodilators [Електронний ресурс] // *Anaesthetist.* – 1999.
13. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – 88. – P. 1880–1889.
14. Chang S.W., Stelzner T.J., Weil J.V., Voelkel N.F. Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats // *Lung.* – 1989. – 167. – № 5. – P. 269–276.
15. Clutton-Brock J. Two cases of poisoning by contamination of nitrous oxide with the higher oxides of nitrogen during anaesthesia // *Brit. J. Anaesth.* – 1967. – 39. – P. 388–392.
16. Cohen A. H., Hanson K., Morris K., Fouty B., McMurty I. F., Clarke W., Rodman D.M. Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats // *J. Clin. Invest.* – 1996. – 97. – P. 172–179.

17. Conzen P., Goetz A., Oettinger W., Brendel W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and endogenous prostaglandin and thromboxane release in anesthetized pigs // *Biomed Biochim Acta.* – 1984. – **43.** – P. S265–S268.
18. Cornfield D.N., Stevens T., McMurtry I.F., Abman S.H., Rodman D.M. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265.** – P. L53–L56.
19. Deleuze P.H., Adnot S., Shiiya N., Thoraval R.F., Eddahibi S., Braquet P., Chabrier P.E., Loisan D.Y. Endothelin dilates bovine pulmonary circulation and reverses hypoxic pulmonary vasoconstriction // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1992. – **19.** – P. 354–360.
20. Du W., Frazier M., McMahon T.J., Eu J.P. Redox Activation of Intracellular Calcium Release Channels (Ryanodine Receptors) in the Sustained Phase of Hypoxia-Induced Pulmonary Vasoconstriction // *Chest.* – 2005. – **128.** – P. 556S–558S.
21. Eddahibi S., Hanoun N., Lanfumey L., Lesch K.P., Raffestin B., Hamon M., Adnot S. Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene // *J. Clin. Invest.* – 2000. – **105.** – P. 1555–1562.
22. Edwards A. D. The pharmacology of inhaled nitric oxide // *Arch. Dis. Child.* – 1995. – **72.** – P. F127–F130.
23. Gainé S.P., Hales A., Flavahan N.A. Hypoxic pulmonary endothelial cells release a diffusible contractile factor distinct from endothelin // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 1998. – **274.** – P. L657–L664.
24. Gonzalez C., Sanz-Alfayate G., Agapito M. T., Gomez-Nino A., Rocher A., Obeso A. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – **132.** – P. 17–41.
25. Greenberg B., Kishiyama S. Endothelium-dependent and -independent responses to severe hypoxia in rat pulmonary artery // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1993. – **265.** – P. H1712–H1720.
26. Gurney A. M. Multiple sites of oxygen sensing and their contributions to hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – **132.** – P. 43–53.
27. Hampl V., Tristani-Firouzi M., Nelson D.P., Archer S.L. Chronic infusion of nitric oxide in experimental pulmonary hypertension: pulmonary pressure-flow analysis // *European Respiratory Journal.* 1996. – **9.** – P. 1475–1481.
28. Hampl V., Herget J. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension // *Physiol. Rev.* – 2000. – **80.** – P. 1337–1372.
29. Hasunuma K., Rodman D. M., O'Brien R. F., McMurtry I. F. Endothelin 1 causes pulmonary vasodilation in rats // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1990. – **259.** – P. H48–H54.
30. Hill N. Therapeutic options for the treatment of pulmonary hypertension [Електронний ресурс] // *Medscape Pulmonary Medicine.* – 2005. – **9.** – №2.
31. Hodyc D., Snorek M., Brtnicky T., Herget J. Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production // *Exp. Physiol.* – 2007. – **92.** – P. 945–951.
32. Hoshikawa Y., Ono S., Suzuki S., Tanita T., Chida M., Song C., Noda M., Tabata T., Voelkel N.F., Fujimura S. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – **90.** – P. 1299–1306.
33. Jorra P., Petrbљовб D., Staniбк B., Dorkovб Z., Tkбиовб R. Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension // *Wiener Klinische Wochenschrift.* – 2007. – **119.** – P. 428–434.
34. Kao P.N. Simvastatin treatment of pulmonary hypertension: an observational case series // *Chest.* – 2005. – **127.** – P. 1446–1452.
35. Kato M., Staub N.C. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia // *Circ. Res.* – 1966. – **19.** – P. 426–440.
36. Knock G.A., Snetkov V.A., Shaifita Y., Connolly M., Drndarski S., Noah A., Pourmahram G.E., Becker, S. Aaronson P.I., Ward J.P. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – **46.** – P. 633–642.
37. Langleben D., Christman B.W., Barst R.J. Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension // *Amer. Heart J.* – 2000. – **143.** – P. E4.
38. Leach R. M., Hill H.S., Snetkov V.A., Ward J.P. Hypoxia, energy state and pulmonary vasomotor tone, *Respir // Physiol. Neurobiol.* – 2002. – **132.** – P. 55–67.
39. Leach R.M., Hill H.S., Snetkov V.A., Robertson T.P., Ward J.P.T. Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor // *J. Physiol.* – 2001. – **536.** – P. 211–224.
40. Leach R.M., Robertson T.P., Twort C.H.C. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 1994. – **266.** – P. L223–L231.
41. Littler C.M., Morris K.G., Fagan K.A., McMurtry I.F., Messing R.O., Dempsey E.C. Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – **284.** – P. H1321–H1331.
42. Liu J.Q., Sham J.S., Shimoda L.A., Kuppusamy P., Sylvester J.T. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* –

2001. – **280**. – P. 856–865.
43. Lopez-Barneo J., Pardal R., Ortega-Saenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – **63**. – P. 259–287.
  44. Michelakis E.D., Hampl V., Nsair A., Wu X., Harry G., Haromy A. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing // *Circulat. Res.* – 2002. – **90**. – P. 1307–1315.
  45. Moudgil R., Michelakis E.D., Archer S.L. Hypoxic pulmonary vasoconstriction // *J. Appl. Physiol.* – 2005. – **98**. – P. 390–403.
  46. Osipenko O.N., Evans A.M., Gurney A.M. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O<sub>2</sub>-sensing potassium current // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – **120**. – P. 1461–1470.
  47. Plevin R., Kellock N.A., Wakelam M.J., Wadsworth R. Regulation by hypoxia of endothelin-1-stimulated phospholipase D activity in sheep pulmonary artery cultured smooth muscle cells // *Ibid.* – 1994. – **112**. – P. 311–315.
  48. Post J.M., Hume J.R., Archer S.L., Weir E.K. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Amer. J. Physiol.* – 1992. – **262**. – P. C882–C890.
  49. Resta T.C., Kanagy N.L., Walker B.R. Estradiol-induced attenuation of pulmonary hypertension is not associated with altered eNOS expression // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2001. – **280**. – P. L88–L97.
  50. Roberts J.D., Polaner D.M., Zapol W.M., Lang P. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn // *The Lancet.* – 1992. – **340**. – P. 818–819.
  51. Robertson T., Hashmi-Hill M., Vandenplas M.L., Lewis S.J. Endothelium-dependent activation of Rho-kinase during hypoxic pulmonary vasoconstriction in rat intrapulmonary arteries // *FASEB J.* – 2005. – **19**. – P. A1277.
  52. Robertson T.P., Aaronson P.I., Ward Ca<sup>2+</sup>-sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction J. P. T. is endothelium dependent // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. L1121–L1126.
  53. Robertson T.P., Ward J.P., Aaronson P.I. Hypoxia induces the release of a pulmonary-selective, Ca<sup>2+</sup>-sensitising, vasoconstrictor from the perfused rat lung // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – **50**. – P. 145–150.
  54. Robertson T.P., Hague D., Aaronson P.I., Ward J.P. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat // *J. Physiol.* – 2000. – **525**. – P. 669–680.
  55. Romand J.A., Pinsky M.R., Firestone L., Zar H.A., Lancaster J.R. Inhaled nitric oxide partially reverses hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog // *J. Appl. Physiol.* – 1994. – **76**. – P.1350–1355.
  56. Sarri E., Garcia-Dorado D., Abellan A., Soler-Soler J. Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption // *Biochem. J.* – 2006. – **394**. – P. 325–334.
  57. Sham J.S., Crenshaw Jr.B.R., Deng L.H., Shimoda L.A., Sylvester J.T. Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K<sup>+</sup> channel and endothelin-1 // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – **279**. – P. L262–L272.
  58. Shimoda L.A., Manalo D.J., Sham S.K., Semenza G.L., Sylvester J.T. Partial HIF-1 $\alpha$  deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia // *AJP – Lung Physiol.* – 2001. – **281**. – №1. – P. L202–L208.
  59. Shimoda L., Sham J.S., Liu Q., Sylvester J.T.A. Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – **132**. – P. 93–106.
  60. Smith T.G., Talbot N.P. Prolyl hydroxylases and therapeutics // *Antioxidants and redox signalling.* – 2010. – **12**. – P. 431–433.
  61. Snetkov V.A., Aaronson P.I., Ward J.P., Knock G.A., Robertson T.P. Capacitative calcium entry as a pulmonary specific vasoconstrictor mechanism in small muscular arteries of the rat // *Brit. J. Pharmacol.* – 2003. – **140**. – P. 97–106.
  62. Soloviev A.I., Stefanov A.V., Bazilyuk O.V., Sagach V.F. Phospholipid vesicle (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats // *J. Hypertension.* – 1993. – **11**. – P. 623–627.
  63. Stenmark K.R., Fagan K.A., Frid M.G. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling: Cellular and Molecular Mechanisms // *Circulat. Res.* – 2006. – **99**. – P. 675–691.
  64. Stenmark K.R., Abman S.H. Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – **67**. – P. 623–661.
  65. Strielkov I.V., Khromov A.S. Hypoxic pulmonary hypertension: the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C // *Int. J. Phys. Pathophys.* – 2010. – №2. – P. 119–124.
  66. Sylvester J.T., Gottlieb J.E., Rock P., Wetzel. R.C. Abnormal pulmonary circulation – New York: Churchill-Livingstone, 1986. – P. 127–165.
  67. Sylvester J.T., Harabin A.L., Peake M.D., Frank R.S. Vasodilator and constrictor responses to hypoxia in isolated pig lungs // *J. Appl. Physiol.* – 1980. – **49**. – P. 820–825.
  68. Talbot N.P., Robbins P.A., Dorrington K.L. Release by hypoxia of a soluble vasoconstrictor from rabbit small pulmonary arteries // *Brit. J. Anaesth.* – 2003. – **91**. – P. 592–594.
  69. Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. Ubisemi-

- quinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. – 1985. – **237**. – P. 408–414.
70. Uzuna Ц., Balbayb Ц., Зомуноглук Н. Б., Yavuzd Ц., Annakkayab A.N., Gьlerd S., Silana C., Erbaee M., Arbak P. Hypobaric-hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine // Acta Histochemica. – 2006. – **108**. – P. 59–68.
71. Vadula M.S., Kleinman J.G., Madden J.A. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in pulmonary and cerebral arterial myocytes // Amer. J. Physiol. – 1993. – **265**. – P. L591–L597.
72. Wadsworth R.M. Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia // Trends Pharmacol. Sci. – 1994. – **15**. – P. 47–53.
73. Ward J.P.T., Snetkov V.A., Aaronson P.I. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation // Cell Calcium. – 2004. – **36**. – P. 209–220.
74. Ward J.P.T., Knock G.A., Snetkov V.A., Aaronson P.I. Protein kinases in vascular smooth muscle tone – role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction // Pharmacol. and Therap. – 2004. – **104**. – P. 207–231.
75. Waypa G.B., Marks J.D., Mack M.M., Boriboun C., Mungai P.T., Schumacker P.T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes // Circulat. Res. – 2002. – **91**. – P. 719–726.
76. Waypa G.B., Chandel N.S., Schumacker P.T. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing // Ibid. – 2001. – **88**. – P. 1259–1266.
77. Weir E.K., Hong Z., Porter V.A., Reeve H.L. Redox signaling in oxygen sensing by vessels // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2002. – **132**. – P. 121–130.
78. Weir E.K., Archer S.L. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels // FASEB J. – 1995. – **9**. – P. 183–189.
79. Weissmann N., Sommer N., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction // Cardiovascular Res. – 2006. – **71**. – №4. – P. 620–629.
80. Yuan J. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: cellular and molecular mechanisms – Springer, 2004. – P. 268–269.
81. Zhang F., Carson R.C., Zhang H., Gibson G., Thomas H.M. Pulmonary artery smooth muscle cell [Ca<sup>2+</sup>] and contraction: responses to diphenyleneiodonium<sup>1</sup> and hypoxia // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 1997. – **273**. – P. L603–L611.

ДУ «Ін-т фармакології та токсикології АМН України», Київ;  
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: strelkov@yahoo.com

Матеріал надійшов до  
редакції 11.01. 2011

В.В. Марлинский

## Илья Фаддеевич Цион – пионер вестибулярной физиологии

Сто лет тому назад ушел из жизни выдающийся физиолог Илья Фаддеевич Цион. В первую очередь он известен как исследователь нервной регуляции сердечно-сосудистой системы [1, 2]. Помимо этого, Цион был одним из пионеров зарождавшейся физиологии вестибулярной системы. Результаты своих работ, посвященных функции вестибулярного лабиринта, Цион обобщил в монографии «Вестибулярный лабиринт как орган математического восприятия пространства и времени» [11]. Основополагающая концепция его теории о непосредственном восприятии лабиринтом трехмерной структуры пространства не нашла подтверждения, и с течением времени интерес к этой части научного наследия Циона угас. Тем не менее, результаты его настойчивых попыток выяснить неврологические основы пространственного восприятия заслуживают внимания, в особенности в этом году.

И.Ф. Цион родился 13/25 марта 1843 г. в литовском городе Паневежис. В возрасте пятнадцати лет начал изучать медицину в Медико-хирургической академии в Варшаве, затем с 1859 по 1862 год был студентом Медицинского факультета Киевского университета, после чего в 1862–1864 гг. учился в Берлинском университете, по окончании которого стал дипломированным врачом, и годом спустя подтвердил врачебный диплом в Петербургском университете. Подающий большие надежды молодой специалист получил стипендию для

© В.В. Марлинский

повышения квалификации за рубежом. Время этой научной командировки Цион плодотворно использовал, работая в лабораториях ведущих физиологов Франции и Германии. Эксперименты на изолированном сердце лягушки, выполненные им в лаборатории Карла Людвиг в Лейпциге,



Илья Фаддеевич Цион (1843–1912)

привели к открытию вазомоторного депрессорного нерва [8]. Эта работа была отмечена престижной Монтионовской премией Парижской академии наук.

После возвращения в Россию Цион работает в Петербургском университете. В 1872 г. ученый назначается ординарным профессором Военно-медицинской академии на место, освободившееся после отставки Ивана Михайловича Сеченова. Несмотря на поддержку Сеченова, который считал Циона наилучшим кандидатом на занятие кафедры, это назначение вызвало неудовольствие в либерально настроенной Академии, не приветствовавшей нового профессора, известного своими консервативными политическими взглядами. Руководство кафедрой оказалось непродолжительным. Открытая антидемократическая позиция Циона вызвала студенческие волнения, в результате которых в 1877 г. он был вынужден уйти в отставку. В том же году он принял приглашение Клода Бернара, возглавлявшего медицинскую школу Сорбонны, и переехал во Францию. Впоследствии Цион принял французское гражданство и никогда более не жил в России. Илья Цион умер 23 октября 1912 г. в Париже, где был захоронен на кладбище Пер Лашез.

Те несколько лет, в течение которых Цион работал в Петербурге, были насыщены научно-исследовательской и преподавательской работой высочайшего уровня. Он опубликовал монографию «Принципы электротерапии» [9], двухтомный «Курс физиологии» [3], «Методы физиологических исследований» [10], ставшими одними из лучших руководств по экспериментальной физиологии в XIX веке. Он был блестящим лектором и преподавателем, под его руководством свою первую научную работу выполнил студент Петербургского университета, будущий лауреат Нобелевской премии Иван Петрович Павлов.

Интерес к вестибулярному лабиринту появился у Циона благодаря известному

французскому неврологу Альфреду Вульпиану. Вульпиан познакомил Илью Федеевича с работами своего наставника Пьера Флуренса, который обнаружил, что разрушения полукружных каналов вестибулярного лабиринта у голубей сопровождаются нарушениями позы животных [12]. Анатомическая структура лабиринта произвела неизгладимое впечатление на Циона. Он сразу увидел соответствие ортогонально расположенных полукружных каналов трем кардинальным осям пространства. В его телеологически организованном сознании не было сомнений в том, что эти каналы созданы для восприятия пространственных координат. Свою дальнейшую исследовательскую работу Цион посвятил вестибулярному лабиринту, который он определял как орган восприятия пространства и времени, и считал себя открывателем шестого чувства – чувства восприятия трехмерного пространства.

Искусный экспериментатор, Цион селективно разрушал полукружные каналы и тщательно регистрировал движения глаз и изменения позы, которые возникали после таких разрушений у лягушек, голубей и кроликов. Анализируя полученные данные, он заключил, что возбуждение нервных окончаний в ампулах полукружных каналов обеспечивает восприятие направлений трех осей пространства. Это восприятие лежит в основе нервных процессов, которые контролируют мышечную активность, отвечающую за движения глаз, головы и туловища в направлениях соответствующим осям трехмерного пространства. Результаты этих опытов совпадали с аналогичными исследованиями, выполненными в то же время Гольцем, Бреером, Эвальдом и др. [5, 11, 13]. В дополнение к этим экспериментам, Цион, вместо разрушения каналов, аккуратно удалял из них эндолимфу и перилимфу, что устраняло давление жидкости в каналах, либо замещал перилимфу желатином, который затвердевал и создавал

препятствия для движения жидкости в каналах. Манипуляции с лимфой в каналах не приводили к двигательным расстройствам, которые возникали после их разрушения. С точки зрения Циона это противоречило концепции Бреера–Маха–Крум Брауна [5, 7, 17], в соответствии с которой возбуждение вестибулярных чувствительных органов возникает благодаря инерционному движению отолитов макул и лимфы каналов. Вместо этой концепции он выдвинул гипотезу о том, что нервные окончания в ампулах полукружных каналов отвечают на стимулы, непосредственно связанные с пространством. Изначально в качестве таких стимулов он рассматривал акустические волны с частотами, лежащими за пределами слухового восприятия. Впоследствии он засомневался в существовании волн, специфически связанных с осями трехмерного пространства, и только выразил надежду на то, что природа стимулов, связанных с пространственными координатами, будет выяснена в дальнейшем. Тем не менее, для Циона это было лишь незначительным препятствием, которое не могло изменить его уверенность в правоте собственной гипотезы и остановить настойчивые усилия, направленные на ее подтверждение.

Внимательный наблюдатель, И.Ф. Цион заметил, что у лошадей, скачущих на манеже или цирковой арене, изменение положения головы предшествует изменению траектории движущегося тела. Он увидел в этом иллюстрацию несостоятельности идеи Бреера о том, что изменение положения головы, возникающее при вращательном движении всего тела, является вторичной рефлекторной реакцией, и рассматривал это наблюдение как подтверждение восприятия полукружными каналами пространственного направления, которое и определяет положение головы. В настоящее время общепринято представление о том, что изменение положения

головы является ведущим элементом координированной скелетомоторной активности при целенаправленном изменении траектории движения тела. При этом считается, что сигналы возникающие в вестибулярном аппарате при движении головы облегчают перераспределение активности скелетных мышц, в результате которого происходит поворот тела [6].

Ученый понимал различия в реакциях на вестибулярные раздражения, которые возникают во время произвольных и непроизвольных движений головы, и указывал на необоснованность заключений, сделанных на основе смешивания данных, полученных в разных экспериментальных условиях. Несколько десятилетий спустя теоретический анализ активности нервных центров, регулирующих произвольное поддержание позы, которое сопровождается подавлением вестибулярных рефлексов, привели фон Хольста и Миттельштадта [15] к формулировке концептуального представления об эфферентной копии произвольной двигательной команды, которая модифицирует проприоцептивную афферентацию, возникающую при выполнении произвольно вызванного движения.

Цион исследовал субъективное восприятие пространства у людей. Он обнаружил, что при наклонах обследуемые ошибочно оценивали свое пространственное положение, вместе с тем их ощущение ортогональности осей трехмерного пространства оставалось неизменным. Он считал это наблюдение свидетельством существования субъективной пространственной схемы, координаты которой определяются полукружными каналами. Илья Фаддеевич рассматривал такую субъективную схему как основу человеческого представления о трехмерном пространстве, на которое проецируются зрительные, слуховые и тактильные пространственные ощущения. Цион считал, что у животных, имеющих только два полукружных канала,

например у миноги, пространственное восприятие редуцировано до двухмерного и в соответствии с этим подобные животные могут ориентироваться только в двух плоскостях.

Исходя из этих рассуждений, исследователь пришел к генерализованному представлению о том, что трехмерное Евклидово пространство является не чисто геометрическим, но также и физиологическим. В соответствии с этим, пространственная направленность геометрических форм является следствием их восприятия сенсорными органами, в первую очередь полукружными каналами вестибулярного лабиринта. Цион понимал философскую неоднозначность этого утверждения и подчеркивал, что благодаря вестибулярному лабиринту субъект ощущает реальное пространство. Он отрицал адекватность субъективного феноменализма Беркли [4] и Кантовского представления о пространстве как об априори существующем феномене [16] для понимания субъективной способности восприятия трехмерной структуры собственного тела и внешнего мира.

Цион рассматривал вестибулярный лабиринт как орган сенсорной системы, чья функциональная роль значительно шире, чем обеспечение рефлекторного поддержания равновесия. В дальнейшем, благодаря результатам многочисленных психофизических экспериментов и исследований нейронной активности в структурах мозга, связанных с восприятием движения, понимание того, что вестибулярная система обеспечивает пространственную ориентацию, стало общепринятым. В то же время, вопрос о том, как сигналы, получаемые периферическими вестибулярными органами, становятся субъективным ощущением перемещения в пространстве остается открытым. Нейронная организация вестибулярной системы существенно отличается от организации других сенсорных систем: в таламусе нет специализирован-

ного релейного ядра, передающего вестибулярные сигналы [18], в коре головного мозга не существует локально ограниченной вестибулярной области [14]. Вестибулярные сигналы представлены практически во всех корковых участках, связанных с восприятием внешнего и субъективного внутреннего пространства, а также в областях, связанных с регуляцией движений. Весьма вероятно, что вестибулярная система обеспечивает связь сигналов, возникающих в других сенсорных органах с вектором гравитационной силы Земли. Первым ученым, который указал на эту функциональную роль вестибулярной системы, был Илья Фаддеевич Цион.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Квасов Д.Г. Памяти Ильи Фаддеевича Циона // Физиол. журн. СССР. – 1962. – 48, № 4. – С. 526-530.
2. Коштоянц Х.С. Очерки по истории физиологии. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1946. – 494 с.
3. Цион И.Ф. Курс физиологии. – Ст. Петербург: Риккер, 1873–1874. – Том 1–2.
4. Berkeley G. A Treatise Concerning the Principles of Human Knowledge. – Dublin: Aaron Rhames, 1710.
5. Breuer J. Über die Funktion der Bogengänge des Ohrlabyrinths // Med. Jahrb. Wien. – 1874. – 4. – P. 72–124.
6. Butler J.S., Smith S.T., Campos J.L., Bütlöff H.H. Bayesian integration of visual and vestibular signals for heading // J. Vis. – 2010. – 10. – P. 1–13.
7. Crum Brown A. On the sense of rotation and the anatomy and physiology of the semicircular canals of the internal ear // J. Anat. Physiol., – 1874. – 8. – P. 327–331.
8. Cyon E., Ludwig C. Die Reflexe eines der sensiblen Nerven des Herzens auf die motorischen der Blutgefäße // Berichte d. Sächs. Gesellsch. d. Wiss. – 1866. – 18. – P. 307–328.
9. Cyon E. Principes d'electrotherapie. – Paris: Bailliere, 1873.
10. Cyon E. Methoden der physiologischen Experimente und Vivisectionen mit Atlas. – Giessen: Carl Ricker, 1876.
11. Cyon E. Das Ohrlabyrinth als Organ der mathematischen Sinne für Raum und Zeit. – Berlin: Springer, 1908.
11. Ewald J.R. Physiologische Untersuchungen über das Endorgan des Nervus octavus. – Wiesbaden: Verlag-Bergmann, 1892.
12. Flourens M.-J.-P. Recherches experimentales sur les



- proprietes et les fonctions du systeme nerveux dans les animaux vertebres. – Paris: Crevot, 1824.
13. Goltz F.L. Über die physiologische Bedeutung der Bogengänge des Ohrlabyrinths // Pflügers Arch. Physiol. – 1870. – **3**. – P. 172–192.
  14. Guldin W.O., Grüsser O.-J. Is there a vestibular cortex? // Trends Neurosci. – 1998. – **21**. – P. 254–259.
  15. von Holst E., Mittelstaedt H. Das Reafferenzprinzip // Die Naturwissenschaften. – 1950. – **37**. – P. 464–476.
  16. Kant I. Kritik der reinen Vernunft. – Königsberg, 1781.
  17. Mach E. Grundlinien der Lehre von den Bewegungsempfindungen. – Leipzig: Engelmann, 1875.
  18. Marlinski V., McCrea R.A. Activity of ventroposterior thalamus neurons during rotation and translation in the horizontal plane in the alert squirrel monkey // J. Neurophysiol. – 2008. – **99**. – P. 2533–2545.

*Неврол. ин-т имени Барроу, Феникс, Аризона, США*  
*E-mail: vladimir.marlinski@chw.edu*

## CONTENTS

O.V. Akopova, Yu.P. Korkach, A.V. Kotsuruba, L.I. Kolchinskaya, V.F. Sagach. Reactive nitrogen and oxygen species metabolism in rat heart mitochondria upon administration of no donor in vivo	3
A.S. Zhukovska, A.M. Shysh, A.A. Moybenko. Study of the impact of omega-3 PUFA on fatty acid composition of heart, breath and swelling of mitochondria of the heart in diabetes	16
O.A. Shepel, V.E. Dosenko, T.Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy. Expression of TNF- $\alpha$ mRNA, but not of TNF- $\alpha$ receptors mRNA, is detected in single murine oocyte and decreases during oocyte meiotic maturation: single-cell RT-PCR data	27
N.L. Kutsenko, L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev. Pioglitazone, an activator of PPAR- $\gamma$ , reduces the expression of kB nuclear factor and inhibits apoptosis in mononuclear cells of peripheral blood in vitro	33
N.M. Zholobak, N.S. Kavok, O.S. Bogorad-Kobelska, I.A. Borovoy, M.Yu. Malyukina, M.Ya. Spivak. Effect of tilorone and its analogs on the change of mitochondrial potential of rat hepatocytes	39
Y. Tkachenko, G. Vorobyova, V. Zhovnir, I.Yemets. The influence of autologous umbilical cord blood and donor blood on cytokine profile of newborns with transposition of great vessels	44
I.G. Litovka, V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska. Normobaric hyperoxia affects osteogenesis in laboratory animals	51
I.V. Leschenko, V.G. Shevchuk, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova. The influence of long-term monosodium glutamate feeding on the structure of rats pancreas	59
Yu.A. Koryak. Contraction properties and musculo-tendinous stiffness of the human triceps surae muscle and their change as a result of a long-term of bed-rest	66
I.V. Redka. Age peculiarities of cerebral hemodynamics in visually impaired children of preschool and primary school age	80

## REVIEWS

Ie.V. Strilekov, S.B. Frantsuzova, O.S. Khromov. Hypoxic pulmonary hypertension: modern views on pathogenesis and options for rational pharmacological correction	89
---	----

## HISTORY OF SCIENCE

V.V. Marlinsky. Ilya Faddeevich Zion - Pioneer vestibular physiology	101
--	-----