

Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 2 2013

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Кузнецов К.І., Веселовська Н.М., Маслов В.Ю., Федулова С.А., Веселовський М.С.</i> Електричні властивості гангліозних клітин сітківки ока щура при стрептозоциніндукованому діабеті	3
<i>Семенихіна О.М., Струтинська Н.А., Будько А.Ю., Вавілова Г.Л., Сагач В.Ф.</i> Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондій серця щурів	9
<i>Хара М.Р., Павлович С.І., Михайлюк В.М.</i> Статеві відмінності функціональних і структурних порушень у міокарді щурів з гіпотиреозом	18
<i>Співак М.Я., Лазаренко Л.М., Фалалєєва Т.М., Вірченко О.В., Непорада К.С.</i> Профілактична дія пробіотичних штамів <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL і VKB на стресіндуковані ураження в слизовій оболонці шлунка щурів	23
<i>Янчук П.І., Бондзик О.В., Решетнік Є.М., Веселовський С.П.</i> Вплив L-аргініну на показники кисневого балансу печінки та її жовчосекреторну функцію	31
<i>Асанов Е.О., Осьмак Є.Д., Кузьмінська Л.А.</i> Особливості реакції симпатoadренало- вої системи на психоемоційне напруження при гіпоксії у людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням дихальної системи	39
<i>Березовський В.Я., Заморська Т.М., Янко Р.В.</i> Вплив зміненого парціального тиску кисню на остеометричні показники кісткової тканини щурів	47
<i>Гарманчук Л.В., Макаренко О.М., Храновська Н.М., Ніколаєнко Т.В., Нікуліна В.В., Непійвода Х.Д., Остапченко Л.І., Морозов С.Г., Косіцин М.С.</i> Мітокоректин стимулює ангиогенез <i>in vitro</i>	52
<i>Кондро М.М., Галенова Т.І., Кузнецова М.Ю., Савчук О.М.</i> Експресія інсулінового рецептора у субклітинних фракціях м'язової та жирової тканин як фактор розвитку тканинної інсулінорезистентності у щурів за умов висококалорійної дієти	59

<i>Долайчук О.П., Федорук Р.С., Ковальчук І.І.</i> Вплив компонентів натуральної та генетично модифікованої сої на показники імунної і репродуктивної систем у самиць щурів	65
<i>Коряк Ю.А.</i> Изменение сократительных свойств трехглавой мышцы голени и электромеханической задержки под влиянием 120-суточной моделируемой микрогравитации с использованием физической тренировки	71
<i>Сергеева І.Є.</i> Патогенетична зумовленість призначення пептидаз при генералізованому пародонтиті	85
<i>Підручна С.Р.</i> Динаміка вмісту відновленого глутатіону в різних тканинах при тяжкій та комбінованій травмі	92
<i>Лаповець Н.Є.</i> Зміни показників гуморального імунітету при абдомінальному туберкульозі	96
<i>Жуковська А.С., Шиш А.М., Кузьменко М.О.</i> Корекція порушень кардіодинаміки при експериментальному діабеті за допомогою ω -3 поліненасичених жирних кислот	100
ОГЛЯДИ	
<i>Петренко Н.С., Кришталь О.О.</i> Десенситизація P2X3-рецепторів як альтернативний механізм анальгезії	104
<i>Рибачук О.А., Півнева Т.А.</i> Роль нейральних стовбурових клітин в регенерації центральної нервової системи	111
ПАМ'ЯТНІ ДАТИ	
Катерина Олегівна Богомолець	122

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

Електричні властивості гангліозних клітин сітківки ока щура при стрептозотоциніндукованому діабеті

На препараті ізольованої сітківки ока щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом у конфігурації "ціла клітина" досліджено основні електричні властивості гангліозних клітин сітківки (ГКС). Показано, що в ГКС на 8-й тиждень після ін'єкції стрептозотину у порівнянні зі значеннями у нормі зменшується максимальна частота викликаного тонічного імпульсації та збільшується постійна часу спаду кальцієвого сигналу, викликаного високочастотною стимуляцією клітин. Отримані результати свідчать про функціональні зміни у ГКС щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті, обговорюються механізми, що можуть лежати у їх основі.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, стрептозотоциніндукований діабет, потенціалзалежні струми, імпульсна активність, кальцієвий сигнал.

ВСТУП

Діабетична ретинопатія є одним з найпоширеніших ускладнень при діабеті та характеризується численними дегенеративними змінами у сітківці. З досліджень на лабораторних тваринах з використанням моделі стрептозотоциніндукованого діабету відомо, що патологічні зміни в гангліозних клітинах сітківки (ГКС) включають нейродегенерацію [3] та апоптоз [8], підсилення експресії глутаматних рецепторів і кальційзв'язуючих білків [10] тощо. Дисфункція ГКС також виявляється при електрофізіологічних дослідженнях з використанням мультиполярної електроретинографії (ЕРГ) [11]. При цьому дані, отримані на сітківці ока людини, свідчать, що така модель адекватно відображує відповідні процеси у пацієнтів, хворих на діабет [4].

Наші попередні електрофізіологічні дослідження ізольованих ГКС ока щурів дали змогу описати властивості потенціалкеро-ваних іонних каналів, відповідальних за електричну збудливість їх соматичних мембран [1]. Було також показано, що ГКС діляться на дві популяції за типом електричної активності – фазної та тонічної [2].

Оскільки саме ГКС, здатні до тонічної генерації потенціалів дії (ПД) з високою частотою [12], є заключною ланкою при передачі імпульсації від ока в центральну нервову систему, то дослідження електрофізіологічних властивостей мембран цих клітин є важливим для розуміння механізмів передачі зорової інформації у нормі та їх порушень при патології. Характеристики потенціал- та лігандкеро-ваних мембранних струмів ГКС у нормі є достатньо дослідженими [1, 2, 9], проте дані електрофізіологічного відведення від окремих ГКС тварин з діабетом у літературі відсутні. Мета нашої роботи – визначення електричних властивостей окремих ГКС ока щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом.

МЕТОДИКА

У роботі використовували дорослих щурів з хронічною гіперглікемією (вміст глюкози в крові був не менше ніж 30 ммоль/л), яку викликали стрептозотоциніндукованим діабетом за загальноприйнятою схемою [3]. Експерименти виконували через 8 тиж після ін'єкції стрептозотину на ізольованому пре-

параті цілої сітківки, в якому всі гангліозні клітини знаходяться у відповідному шарі і не потребують додаткової ідентифікації [12].

Всі експериментальні процедури було проведено згідно з правилами роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України. Тварин умертвляли за допомогою CO_2 -асфіксії з наступною декапітацією. Очні яблука виділяли та препарували по границі зубчастого краю, відділяли рогівку, видаляли кришталік і склоподібне тіло. Сітківку обережно відлущували від шару пігментного епітелію та робили переріз зорового нерва біля оптичного диска. Відділену сітківку фіксували на дні реєстраційної камери, вкритого біоінертним покриттям "Sylgard", гангліозним шаром догори. Внутрішню обмежувальну мембрану, утворену відростками мюллеровських гліальних клітин, та шар оптичних волокон, утворений аксонами ГКС, видаляли за допомогою кінчика patch-піпетки, як було описано раніше [9, 12], після чого електрофізіологічну реєстрацію здійснювали від ГКС з однорідною, гладенькою поверхнею та негранульованою цитоплазмою.

Препарування та експериментальні дослідження проводили у фізіологічному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 2, HEPES – 10, глюкозу – 12; pH 7,4 (доведений NaOH) при кімнатній температурі (22 °C). Реєстраційну камеру постійно перфузували зовнішньоклітинним розчином зі швидкістю близько 1 мл/хв. Внутрішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): калію глюконат – 100, KCl – 40, MgCl_2 – 5, EGTA – 0,1, HEPES – 20, Na_2ATP – 3, NaADP – 0,5, NaGTP – 0,5; pH 7,4 (доведений KOH) з додаванням кальційчутливого барвника Indo-1 у концентрації 0,1 ммоль/л.

Реєстрації відбувалися при підтримуваному потенціалі -70 мВ, для чого через клітину пропускали струм відповідної амплітуди. Пасивні електричні характеристики мембрани ГКС (вхідний опір, стала часу та ємність клітини) вимірювали в режимі фіксації струму за усередненим електротонічним потенціалом, викликаним гіперполярую-

чим імпульсом струму амплітудою -10 пА та тривалістю 500 мс. Тонічну генерацію ПД у ГКС викликали деполяризуючими прямокутними імпульсами тривалістю 500 мс та інкрементом амплітуди 5-10 пА, також серії ПД імітували в режимі фіксації потенціалу прикладанням короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від -70 до +10 мВ) з частотою 50 c^{-1} . Для визначення параметрів окремого ПД (амплітуда, поріг, ширина на половині висоти, амплітуда гіперполяризації) аналізували імпульси, викликані мінімальним надпороговим стимулом.

Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію реєстрували з використанням флуоресцентного кальційчутливого барвника Indo-1 за допомогою спектрофотометричної установки (Carin Research Ltd, Велика Британія). У режимі епіфлуоресценції світло від ксенонової лампи пропускали через фільтр (360 нм), флуоресцентний сигнал за допомогою системи дихроїчних дзеркал та оптичних фільтрів (408 нм та 480 нм) розділявся на два окремі потоки та реєструвався двома фотоелектронними помножувачами, відношення інтенсивності яких (R) відповідає певній концентрації іонів кальцію [7]. Відповідність значень цього відношення та концентрацій кальцію було визначено експериментально у окремій серії калібрувальних дослідів. Значення R , які відповідають мінімальній (R_{\min}) та максимальній (R_{\max}) внутрішньоклітинним концентраціям кальцію, а також ефективне значення константи дисоціації барвника (K_d) становили 0,58 (R_{\min}), 4,4 (R_{\max}) та 1,44 мкмоль/л (K_d) відповідно. З отриманих у досліді значень R внутрішньоклітинну концентрацію кальцію визначали за наступною формулою: $[\text{Ca}] = K_d \cdot (R_{\min} - R) / (R - R_{\max})$ [7].

Параметри ПД та характеристики імпульсної активності ГКС, потенціалзалежних струмів та кальцієвих сигналів визначали та аналізували за допомогою програмного пакету Clampfit 9.2. Експериментальні результати представлені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього. Для їх статистичного

аналізу використовували критерій t Стьюдента. Різницю середніх вважали статистично достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Значення пасивних електричних характеристик мембрани ГКС щурів зі стрептозотозиндукованим діабетом становили ($n=4$): потенціал спокою $-58 \text{ мВ} \pm 8 \text{ мВ}$, вхідний опір $0,54 \text{ ГОм} \pm 0,05 \text{ ГОм}$, стала часу мембрани $21 \text{ мс} \pm 6 \text{ мс}$, ємність $62 \text{ пФ} \pm 23 \text{ пФ}$.

Активацію інтегральних струмів (рис. 1, а) в ГКС дослідних щурів проводили деполяризуючими прямокутними командними потенціалами тривалістю 200 мс від потенціалу спокою (-70 мВ) до рівня $+40 \text{ мВ}$ з інкрементом 5-10 мВ. Амплітуда натрієвого компонента інтегрального струму (рис. 1,а) сягала свого максимуму при командному потенціалі -30 мВ і становила $3,15 \text{ нА} \pm 0,41 \text{ нА}$. Середнє значення максимального калієвого компонента при $+40 \text{ мВ}$ було $1,25 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$.

У всіх досліджених ГКС зберігалася спонтанна активність (див. рис. 1,в), у відповідь на деполяризуючий імпульс струму тривалістю 500 мс клітини проявляли тонічний характер імпульсної активності (див. рис. 1,б), частота якої залежала від амплітуди стимулу. Для кожної стимуляції визначали

середню частоту генерації ПД, максимальне значення якої було обрано як характеристика цієї клітини. Значення максимальної частоти тонічної імпульсації становило $28 \text{ с}^{-1} \pm 9 \text{ с}^{-1}$.

Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію викликали прикладанням у режимі фіксації потенціалу короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від -70 до $+10 \text{ мВ}$) з частотою 50 с^{-1} . Це призводило до збільшення значення цього показника, яке починало монотонно зменшуватись одразу ж після припинення стимуляції. На рис. 2 представлено кальцієвий сигнал, викликаний високочастотною стимуляцією тривалістю 10 с. Значення постійної часу спаду кальцієвого сигналу становило $14,1 \text{ с} \pm 1,9 \text{ с}$.

ОБГОВОРЕННЯ

Електрофізіологічне дослідження окремих ГКС на ізольованому препараті сітківки ока щурів через 8 тиж після ін'єкції стрептозотозину не виявило достовірних змін пасивних мембранних характеристик, параметрів інтегрального потенціалозалежного струму та окремого ПД у порівнянні з нашими даними, отриманими на ГКС тварин у нормі [9]. Статистично достовірним було зменшення вдвічі максимальної частоти тонічної імпульсації, викликаній прикладанням деполяризуючого

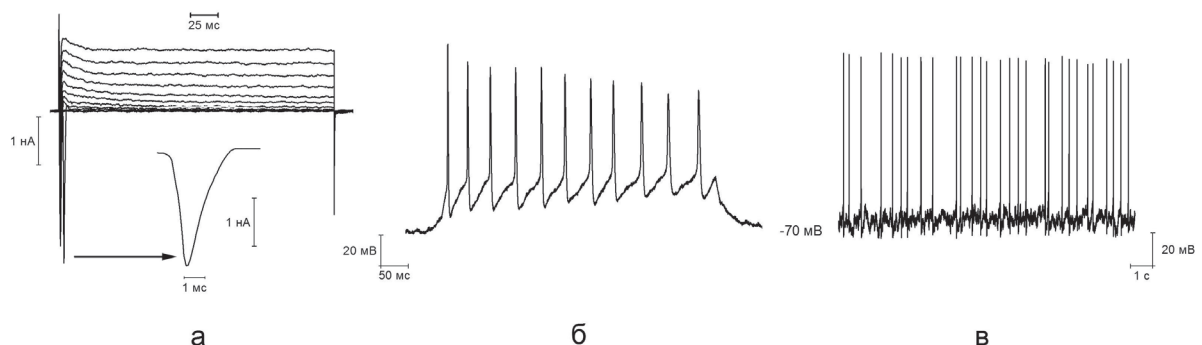


Рис. 1. Електрофізіологічні властивості гангліозних клітин сітківки ока щура при стрептозотозиндукованому діабеті. На а: інтегральні потенціалозалежні струми, викликані деполяризуючими командними потенціалами тривалістю 200 мс від спокою (-70) до $+40 \text{ мВ}$ з інкрементом 10 мВ. На вставці – натрієвий струм у збільшеному часовому масштабі. На б: тонічна генерація потенціалів дії у відповідь на деполяризуючий струм тривалістю 500 мс та амплітудою 50 пА. На в: реєстрація спонтанної імпульсної активності. Реєстрації, представлені на а–в отримані від однієї клітини, підтримуваній потенціал -70 мВ

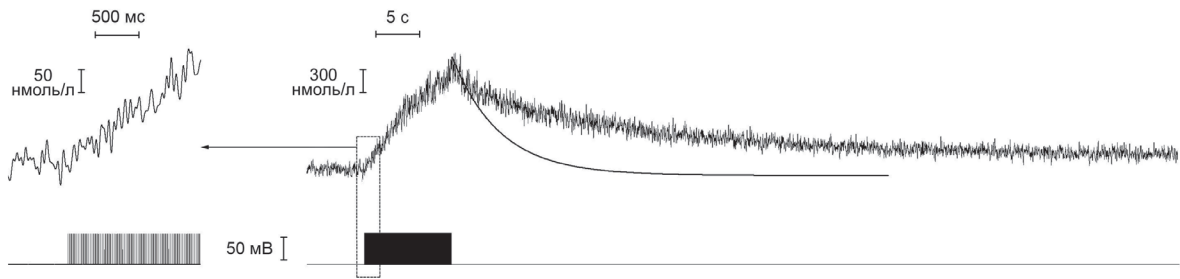


Рис. 2. Кальцієвий сигнал, викликаний високочастотною стимуляцією гангліозної клітини сітківки ока щура при стрептозотозиндукованому діабеті. Клітину в режимі фіксації потенціалу стимулювали протягом 10 с серією короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від -70 до $+10$ мВ) з частотою 50 с^{-1} , що імітують високочастотну генерацію ПД. Ліворуч показано лінійну фазу зростання сигналу у збільшеному часовому масштабі. Стимуляцію схематично зображено під відповідними сигналами. Підтримуваний потенціал -70 мВ. Суцільна лінія – експоненційна функція нормована на амплітуду сигналу з постійною часу $5,5$ с, що відповідає середньому значенню у нормі

струму, середнє значення якої у ГКС нормальних тварин становило 60 с^{-1} [9]. Також слід відзначити зменшення (хоча і статистично недостовірне) калієвого компонента інтегрального потенціалзалежного струму та, вірогідно, відповідного зростання тривалості окремого ПД (середні значення були $1,7$ мс при діабеті та $1,5$ мс у нормі).

Зменшення частоти викликаної тонічної імпульсації ГКС, що спостерігалось у нашій роботі, узгоджується з даними ЕРГ-дослідження, в якому було зареєстровано зменшення скотопічної порогової відповіді (переважно залежить від імпульсної активності гангліозних та меншою мірою від такої амакринових клітин) у щурів зі стрептозотозиндукованим діабетом у порівнянні з контролем [13]. Подібні зміни частоти та тривалості окремого ПД були зареєстровані нами при блокуванні потенціалкероаних калієвих каналів типу $Kv3.1/Kv3.2$ [9], при цьому зменшення відповідного струму на 25% призводило до 50% -го зниження частоти генерації ПД. Слід відзначити, що амплітуда калієвого компонента інтегрального потенціалзалежного струму ($1,25$ нА) була нижчою (хоча і статистично недостовірно) за середню амплітуду калієвого струму ГКС щурів у нормі ($1,61$ нА). Тому можна припустити, що в ГКС саме $Kv3.1/Kv3.2$ -канали першими зазнають пошкодження при розвитку стреп-

тозотозиндукованого діабету. В літературі відсутні дані про калієві струми ГКС у тварин з діабетом, проте зменшення активності Kv -каналів при діабетичній нейропатії було показано на первинних сенсорних нейронах [5]. Таким чином, для підтвердження цієї гіпотези необхідні подальші дослідження з використанням електрофізіологічних і фармакологічних методів розділення потенціалзалежних мембранних струмів ГКС тварин з діабетом.

У нашій попередній роботі в ГКС ока щура в нормі було зареєстровано кальцієві сигнали, викликані високочастотною тонічною імпульсацією [9]. Для порівняння з отриманими раніше даними кальцієві сигнали ГКС щурів з діабетом активували прикладанням у режимі фіксації потенціалу короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від -70 до $+10$ мВ) з частотою 50 с^{-1} , що імітувало високочастотну генерацію ПД. Стимуляція ГКС призводила до зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, початкова фаза якої достатньо добре апроксимувалася лінійною функцією (рис. 2). Відповідний коефіцієнт пропорційності надає можливість оцінити амплітуду кальцієвого сигналу, викликаного окремим стимулом (у цьому разі – $2,7$ нмоль/л на один імпульс). Це значення більше ніж удвічі нижче за оцінку амплітуди кальцієвого сигналу, викликаного

одним ПД у ГКС тварин у нормі, визначеного нами раніше (7,3 нмоль/л), близьке співвідношення спостерігалось і для постійної часу спаду сигналу, середнє значення якої становило 5,5 с [9]. Такі зміни у характеристиках кальцієвих сигналів узгоджуються з літературними даними про підвищення експресії кальційзв'язуючих білків у ГКС щурів при викликаній діабетичній ретинопатії [10]: підвищення зв'язування іонів кальцію призводить до зменшення амплітуди сигналу, викликаного стимулом, а їх вивільнення у цитоплазму після припинення стимуляції – до зростання постійної часу спаду кальцієвого сигналу [6]. Слід також зазначити, що на зміни характеристик кальцієвих сигналів при діабеті впливатимуть і цілком вірогідні зміни швидкості АТФ-залежної екструзії, адже в літературі є дані про позитивну кореляцію між швидкістю екструзії та кальцієвою буферною ємністю ГКС [6]. Механізми регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу ГКС при діабетичній ретинопатії потребують подальших досліджень, необхідність яких зумовлена надзвичайно важливою роллю, яку відіграють іони кальцію у регуляції клітинних функцій.

Таким чином, основні електричні властивості та спонтанна активність ГКС ока щура зберігаються через 8 тиж після ін'єкції стрептозотозину, проте зменшується здатність цих клітин до високочастотної тонічної генерації ПД та уповільнюється спад кальцієвого сигналу, викликаного їх високочастотною стимуляцією.

Ця робота є частиною проекту “Ідентифікація молекулярних структур, які забезпечують фонову активність гангліозних клітин сітківки” (№ держ. реєстрації 0106U010932).

Результати, які представлені в роботі були отримані при частковому фінансуванні за проектом “Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов” та сумісним російсько-українським проектом “З'ясування природи нейротропних ефектів пептидів групи гліпролінів у нормі та на моделях пошкодження нейронів”.

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

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫСЫ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНИНДУЦИРОВАННОМ ДИАБЕТЕ

На изолированном препарате сетчатки глаза крыс со стрептозотозининдуцированным диабетом в конфигурации “целая клетка” исследованы основные электрические свойства ганглиозных клеток сетчатки (ГКС). Показано, что в ГКС на 8-й неделе после инъекции стрептозотозина по сравнению со значениями в норме, уменьшается максимальная частота вызванной тонической импульсации и увеличивается постоянная времени спада кальциевого сигнала, вызванного высокочастотной стимуляцией клеток. Полученные результаты свидетельствуют о функциональных изменениях в ГКС крысы при стрептозотозининдуцированном диабете, обсуждаются механизмы, которые могут лежать в основе таких изменений.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, стрептозотозининдуцированный диабет, потенциалзависимые токи, импульсная активность, кальциевый сигнал.

K.I. Kuznetsov, N.N. Veselovskaya, V.Y. Maslov, S.A. Fedulova, M.S. Veselovsky

ELECTRICAL PROPERTIES OF RETINAL GANGLIONIC CELLS OF THE RATS WITH STREPTOZOTOCINE-INDUCED DIABETES

On isolated retinal preparation from STZ-induced diabetic rats in whole-cell configuration the basic electrical properties of retinal ganglion cells (RGC) were studied. It was shown that on 8th week after STZ maximal depolarization-induced firing frequency is reduced and decay time constant of high-frequency stimulation-induced calcium signals is increased as compared to controls. The data obtained suggest functional changes in RGC of STZ-induced diabetic rats, possible mechanisms of such changes are discussed.

Key words: retinal ganglion cells, STZ-induced diabetes, voltage-dependent currents, firing activity, calcium signal.

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

International Center of Molecular Physiology National Academy of Science of, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веселовська Н.М., Веселовський М.С. Іонні струми, що забезпечують електричну збудливість ізольованих гангліозних клітин сітківки ока щурів // Фізіол. журн. – 2001. – 47, № 2. – С. 32–40.
2. Колодин Ю.А., Веселовский Н.С., Веселовская Н.Н.,

- Федулова С.А. Электрическая активность ганглиозных клеток сетчатки глаза крысы // Нейрофизиология. – 2007. – **39**, № 4/5. – С. 382–384.
3. Barber A. J., Lieth E., Khin S. A. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin // J. Clin. Invest. – 1998. – **102**, № 4. – P. 783–791.
 4. Barber A.J., Gardner T.W., Abcouwer S.F. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy // Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – **52**, №2. – P. 1156–1163.
 5. Cao X.H., Byun H.S., Chen S.R., Cai Y.Q., Pan H.L. Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor // J Neurochem. – 2010. – **114**, №5. – P. 1460–1475.
 6. Gartland A.J., Detwiler P.B. Correlated variations in the parameters that regulate dendritic calcium signaling in mouse retinal ganglion cells // J. Neurosci. – 2011. – **31**, №50. – P. 18353–18363.
 7. Grienkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // J.Biol.Chemistry. – 2005. – **260**, №6. – P. 3440–3450.
 8. Hammes H.P., Federoff H.J., Brownlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes // Mol. Med. – 1995. – **1**, №5. – P. 527–534.
 9. Kuznetsov K.I., Grygorov O.O., Maslov V.Y., Veselovsky N.S., Fedulova S.A. Kv3 channels modulate calcium signals induced by fast firing patterns in the rat retinal ganglion cells // Cell Calcium. – 2012. – **52**, №5. – P. 405–411.
 10. Ng Y.K., Zeng X.X., Ling E.A. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats // Brain Res. – 2004. – **1018**, №1. – P. 66–72.
 11. Ng J.S., Bearnse M.A. Jr, Schneck M.E., Barez S., Adams A.J. Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – **49**, №4. – P. 1622–1628.
 12. O'Brien B.J., Isayama T., Richardson R., Berson, D.M. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells // J.Physiol. – 2002. – **538**, № 3. – P. 787–802.
 13. Wong V.H., Vingrys A.J., Bui B.V. // Glial and neuronal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats // J. Ocul. Biol. Dis. Infor. – 2011. – **4**, №1–2. – P. 42–50.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 05.03.2013*

О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів

У досліджах на мітохондріях, ізольованих із тканин серця дорослих щурів, досліджували вплив донора сірководню NaHS на стан дихального ланцюга. Виявлено, що у концентраціях 10^{-9} – 10^{-6} моль/л він спричиняв дозозалежне зменшення швидкості споживання кисню за наявності сукцинату натрію та АДФ (стан 3 за Чансом), а також за умов відсутності останнього (стан 4). Водночас зменшення швидкості споживання кисню за концентрації NaHS 10^{-9} та 10^{-8} моль/л супроводжувалося підвищенням спряженості процесів окиснення та фосфорилування, про що свідчить збільшення дихального контролю; ефективність окисного фосфорилування (АДФ/О) при цьому не змінювалась. Отримані результати говорять про захисний вплив донора сірководню на функціональний стан мітохондрій. Для з'ясування інших механізмів протекторної дії H_2S також досліджували дію його донора на набухання мітохондрій. Встановлена концентраційна залежність між впливом NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) і рівнем набухання мітохондрій серця щурів. Показано, що вони помірно набухали за умов дії донора сірководню у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л при концентрації Ca^{2+} 1 нмоль/мг білка. При дії NaHS у концентрації 10^{-9} моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна рівня якого становила 11 %. Блокатор мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) 5-гідроксидеканоат (10^{-4} моль/л) частково зменшував набухання мітохондрій за наявності NaHS (10^{-9} моль/л), що може свідчити про активацію донором H_2S K_{ATP} -каналів. Зроблено висновок щодо можливого залучення K_{ATP} -каналів до механізмів дії сірководню на мітохондріальні функції. Ключові слова: мітохондрії, сірководень, дихання, мітохондріальна пора, мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали.

ВСТУП

Сірководень (H_2S) – біологічно активний газовий трансмітер, що ендогенно синтезується в організмі людини та тварин і бере участь у регуляції функцій різних органів і систем. Його дослідження, як важливої сигнальної молекули, почалося близько 15 років тому, і нині його відносять до родини газових медіаторів, яка також включає оксид азоту (NO) та монооксид вуглецю (CO). Відомо, що сірководень здатний вільно проникати через плазматичні мембрани клітин і брати участь у великій кількості процесів, серед яких інгібування аденілатциклази [17], транспорт цистеїну, відновлення глутатіону (GSH) і – SH-груп білків, реакції з активними формами кисню та азоту (O_2^- , H_2O_2 ,

ONOO $^-$, NO) [25], регуляція індубельної NO-синтази [6], зниження внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} , активація K_{ATP} -каналів тощо [13]. У біологічних рідинах тільки 15 % сірководню знаходиться у газоподібному стані, тоді як у вигляді гідросульфід-іона (HS^-) – близько 85 %, а сульфід-іон (S^{2-}) існує лише в залишковій кількості [22].

Внутрішньоклітинний синтез сірководню забезпечується трьома піридоксаль-5-фосфатзалежними ферментами: цистатіонін- β -синтазою (CBS), цистатіонін- γ -ліазою (CSE) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою у головному мозку, серцево-судинній системі, печінці, нирках та інших органах [15]. У серцево-судинній системі вирішальну роль у утворенні сірководню відіграє фермент CSE [9], хоча останнім часом все більше з'явля-

© О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

ється даних щодо активності 3-меркаптопірватсульфуртрансферази [8].

До основних біологічних ефектів H_2S належать регуляція судинного тонуусу [29], скоротливої активності міокарда [11], участь у довготривалому синаптичному потенціюванні, про- та антизапальних реакціях [27], регуляція секреції інсуліну [16] тощо. Показано, що H_2S притаманні також антиоксидантні та антиапоптогенні властивості [26].

Встановлено, що однією з причин серцево-судинних захворювань є мітохондріальна дисфункція. Мітохондрії – це важливі внутрішньоклітинні органели, які окрім окисного фосфорилування регулюють залежні від кальцію процеси, опосередковані дією вільних радикалів, а також загибель клітин серця при фізіологічних і патологічних станах організму [21]. Так, ушкодження мембран органел призводить до мітохондріальної дисфункції, зменшення синтезу аденозинтрифосфату (АТФ), скоротливої активності та функціональних резервів серця і, як наслідок, зниження його насосної функції. Мітохондрії займають близько 30 % об'єму кардіоміоцитів і забезпечують синтез більше ніж 90 % АТФ, що потрібний для фізіологічної діяльності серця.

Показано, що сірководень має різноманітні властивості, які забезпечують його кардіопротекторну дію. В попередніх наших дослідженнях в умовах перфузії ізольованих сердець за методом Лангендорфа було виявлено збільшення функціональних резервів міокарда під час навантаження об'ємом у тварин, яким вводили NaHS у концентрації 10^{-4} моль/кг. Також було показано протекторний його вплив на розвиток постішемічно-реперфузійних пошкоджень функції серця, а саме ступінь відновлення показників кардіодинаміки та скоротливої функції міокарда були значно вищими порівнянно з контролем [5]. Отримані дані щодо протекторного впливу сірководню корелюють з такими, які продемонстровано на різних моделях оксидативного стресу, а також ішемічно-реперфузійних

пошкодженнях печінки та нирок [14].

Наслідки ішемічно-реперфузійних пошкоджень насамперед проявляються у зміні проникності мітохондріальних мембран клітин міокарда, що пов'язано з формуванням неселективної кальційзалежної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), виникнення якої призводить до індукції апоптозу [21]. Грунтуючись на отриманих нами даних щодо кардіопротекторного впливу сірководню на серце під час ішемічно-реперфузійних пошкоджень [5], ми досліджували вплив різних його концентрацій на кальційіндуковане відкривання МП. Раніше нами було встановлено протекторний вплив NaHS у концентраціях, близьких до фізіологічних. У експериментах *in vivo* при одноразовому введенні щурам NaHS у концентрації 10^{-4} моль/кг, було показано зменшення чутливості МП до індуктора Ca^{2+} у серці [3].

Відомо також, що зменшення наслідків ішемічно-реперфузійних пошкоджень залежить не тільки від стану проникності мітохондріальних мембран, а також і від рівня енергетичного метаболізму кардіоміоцитів, який насамперед залежить від стану дихального ланцюга мітохондрій.

Відомості про дію сірководню на стан дихального ланцюга є досить суперечливими. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив різних концентрацій NaHS на показники функціонального стану дихального ланцюга мітохондрій серця щурів та на МП, а також з'ясувати можливі механізми цього впливу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на дорослих (6 міс, 220–250 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин.

Виділення мітохондрій з тканин серця здійснювали методом диференційного уль-

трацентрифугування [1]. Серця ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2–4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g 8 хв (4°C), а супернатант повторно при 11000 g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН 7,2–7,4, і одразу використовували в дослідах. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [18].

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього нативні мітохондрії вміщували в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120; K_2HPO_4 – 3; тріс-НСl – 25; сукцинат Na – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження їх оптичної густини при $\lambda=520$ нм протягом 15 хв при концентрації Ca^{2+} 1 нмоль/мг білка. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю (Δ) у відсотках між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Преінкубацію мітохондрій з 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) і циклоспорином А (10^{-5} моль/л) здійснювали протягом 5 хв до внесення в інкубаційне середовище NaHS. Зміну світлопоглинання за 15 хв у контролі приймали за 100 %.

Мітохондріальне дихання досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за допомогою приладу “Oxygraph” («Hansatech instruments», Великобританія). Показники функціонального стану мітохондрій визначали за методом Чанса та Вільямса [10]. Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120; K_2HPO_4 – 3; тріс-НСl – 25; рН 7,2. Як субстрат окиснення використовували сукцинат натрію (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням до суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л АДФ.

За одержаними полярограмами розраховували: швидкість АДФ – стимульованого дихання (метаболічний стан 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (метаболічний стан 4, V_4 , за відсутності АДФ) дихання мітохондрій за Чансом, дихальний контроль (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності окисного фосфорилування.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003 та Origin 6.0. Достовірність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Однією з головних характеристик функціонування мітохондрій є робота дихального ланцюга, яку можна оцінити через спряження окиснення субстрату та фосфорилування АДФ з утворенням АТФ. Дихальний ланцюг являє собою мультикомпонентну структуру з п'яти комплексів, що локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій: НАДН-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс I), сукцинат-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс II), СоQ-цитохром с-оксидоредуктаза (комплекс III), цитохром с-оксидаза (комплекс IV) і АТФ-синтаза. Безпосередній синтез АТФ здійснює АТФ-синтаза, що локалізована у внутрішній мембрані мітохондрій біля електронно-транспортного ланцюга.

На першому етапі нашої роботи ми досліджували вплив NaHS у межах концентрацій 10^{-4} – 10^{-9} моль/л. Було показано дозозалежне зниження швидкості споживання кисню за наявності сукцинату Na як субстрату окиснення та АДФ (функціональний стан 3 за Чансом) порівняно з контролем при дії донора сірководню у концентраціях 10^{-8} , 10^{-7} та 10^{-6} моль/л, на 17, 47 і 71 % відповідно (рис. 1,а). Швидкість поглинання кисню мітохондріями у стані 4, у вищезгаданих концентраціях, за умов відсутності АДФ також зменшувалася на 26, 68 і 81 % відповідно (див. рис. 1,б). Вплив донора сірководню у концентрації 10^{-9} моль/л спричиняв незначне

зменшення швидкості поглинання кисню в функціональних станах 3 і 4 порівняно з контролем. Для додаткового аналізу впливу NaHS використовували роз'єднувач окисного фосфорилування 2,4-динітрофенол. За умов використання останнього при дії NaHS у концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} моль/л показано достовірне збільшення швидкості поглинання кисню на 52 і 43 % відповідно.

Вищі концентрації донора сірководню в межах 10^{-7} – 10^{-4} моль/л за умов введення 2,4-динітрофенолу не призводили до збільшення швидкості поглинання кисню, що свідчить про повне інгібування функціонування дихального ланцюга за цих концентрацій.

Зменшення швидкості поглинання кисню за концентрації NaHS 10^{-8} моль/л супроводжувалося збільшенням спряженості процесів окиснення і фосфорилування, про що говорить достовірне підвищення показників

дихального контролю на 21 % порівняно з контролем (рис. 2). При концентрації NaHS 10^{-9} моль/л спостерігали тенденцію до збільшення дихального контролю.

Невелике підвищення дихального контролю, при зниженні швидкості V_3 , говорить про збільшення ефективності роботи дихального ланцюга на тлі зниження електронно-транспортної функції, що може свідчити про економізацію процесів енергоутворення у міокарді. Також слід відмітити, що ефективність синтезу АТФ, на що вказує значення коефіцієнта АДФ/О, не змінювалося за цих концентрацій (рис. 3).

Отже, результати наших досліджень показують протекторний вплив донора сірководню на функціональний стан дихального ланцюга й окисного фосфорилування мітохондрій. Зниження швидкості споживання кисню у функціональних станах 3 і 4 внаслідок депо-

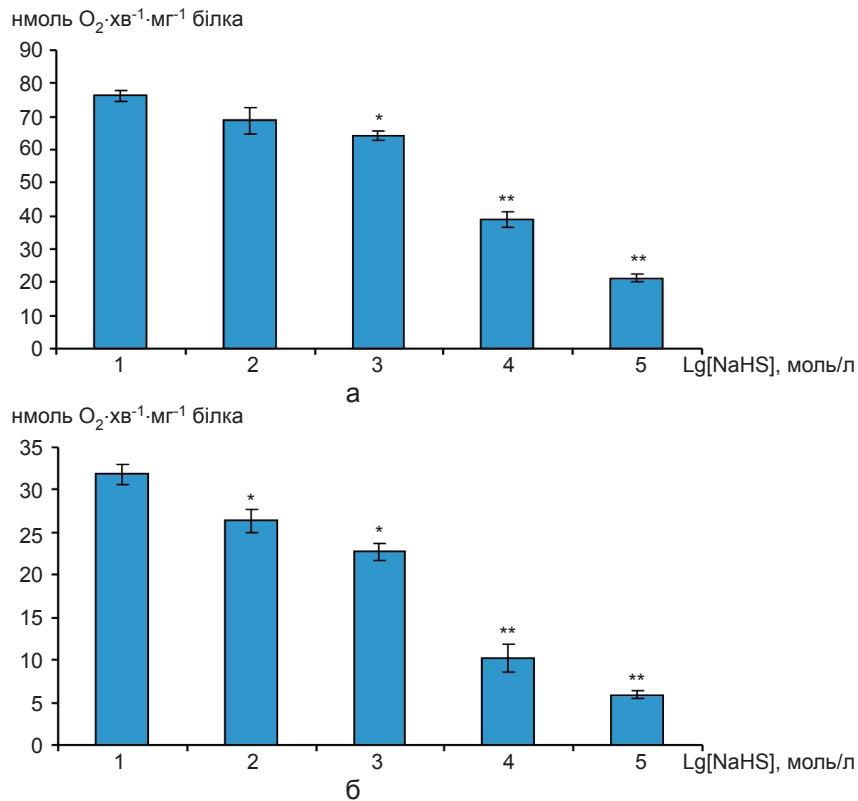


Рис. 1. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця у стані 3 (а) та 4 (б) за Чансом за дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} моль/л відповідно). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю

ляризації та блокування транспорту електронів, відсутність впливу на дихальний контроль, і навіть невелике його збільшення сприяють зменшенню утворення активних форм кисню, що спричинюють кардіопротекцію.

Як раніше повідомлялося, зменшення ішемічно-реперфузійних пошкоджень залежить не тільки від енергетичного метаболізму кардіоміоцитів, який зумовлений станом дихального ланцюга мітохондрій, а й від ступеня проникності мітохондріальних мембран. Участь газових медіаторів у сигнальних механізмах, що пов'язані з регуляцією відкриття МП, є актуальним питанням, оскільки зменшення чутливості її до індукторів, лежить в основі кардіопротекторних механізмів.

Тому на наступному етапі нашої роботи ми досліджували набухання ізольованих мітохондрій серця шурів в умовах дії NaHS у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-4} моль/л при 1 нмоль/мг білка Ca^{2+} . Було показано, що донор сірководню за концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л спричиняв помірне набухання мітохондрій серця. При дії NaHS у концентрації 10^{-10} моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна його рівня становила 11 % (рис. 4).

Відомо, що однією з основних молекулярних мішеней дії сірководню є активація

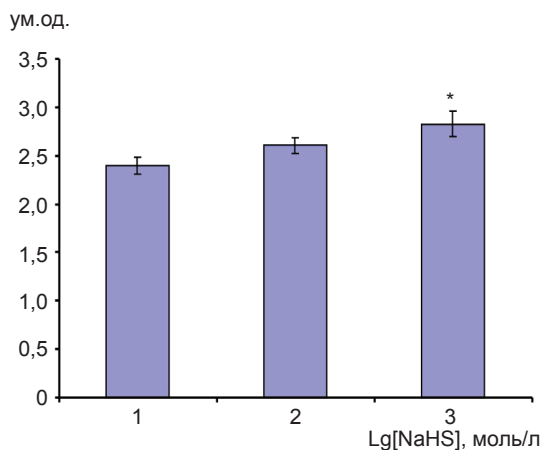


Рис. 2. Дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) в мітохондріях серця шурів при дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} моль/л відповідно). * $P < 0,05$ відносно контролю

$\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів [13]. Так, показано, що H_2S -індуковане розслаблення судин опосередковується в основному через відкриття останніх у гладеньких м'язів судин [29]. Ці канали знаходяться на поверхні клітинних мембран і у внутрішній мембрані мітохондрій багатьох різних типів клітин, в тому числі підшлункових β -клітин, нейронів, кардіоміоцитів, клітин печінки та скелетних і гладеньких м'язових клітин [7]. Також існує багато даних стосовно того, що активація $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів сприяє захисту міокарда під час ішемії–реперфузії. Однак досі залишається не зрозумілим, які саме – сарколемальні чи мітохондріальні $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канали відіграють провідну роль у кардіопротекції, що спричиняється дією донора сірководню.

Відомо, що активація мітохондріальних $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів спричиняє надходження K^+ до матриксу мітохондрій, що може спричинити незначне їх набухання і тим самим відігравати суттєву роль у кардіопротекції, оскільки це сприяє збереженню контактних сайтів між внутрішньою та зовнішньою мембранами, а також оптимальній орієнтації для входу АДФ у матрикс мітохондрій. Це має особливе значення при ішемії, яка призводить до порушення зв'язків між цими компонентами, і до зниження енергозабезпечення клітини. Також одним з основних механізмів кардіопротекції, яка пов'язана з активацією мітохондріальних

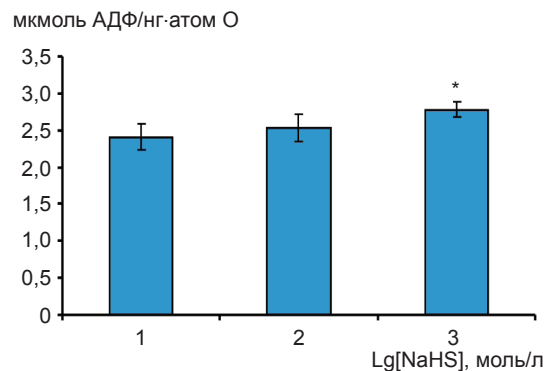


Рис. 3. Коефіцієнт ефективності фосфорилування у мітохондріях серця шурів при дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} моль/л відповідно). * $P < 0,05$ відносно контролю

K_{ATP} -каналів, є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій кальцієм.

Ми припустили участь мітохондріальних K_{ATP} -каналів у H_2S -індукованому набуханні мітохондрій. Для цього використали специфічний їх блокатор 5-гідроксидеканоат (10^{-4} моль/л). Було показано, що він частково зменшує набухання мітохондрій серця шурів (рис. 5). Але молекулярні механізми, що лежать в основі впливу сірководню на K_{ATP} -канали, все ще залишаються нез'ясованими. Відомо, що один з основних механізмів дії сірководню – модифікація білків. Це відбувається за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків ($S=S$) або при приєднанні атома сірки до тіолової групи, – SH , в результаті чого вона перетворюється на гідроперсульфідний залишок, – SSH . Обидві модифікації призводять до зміни конформації та функціональної активності білка. Також є дані про можливий вплив H_2S через активування протеїнкінази C [27].

Крім того, нами проведена серія експериментів з використанням інгібітора МП циклоспорину А. Було показано, що сумісна дія 5-гідроксидеканоату та останнього спри-

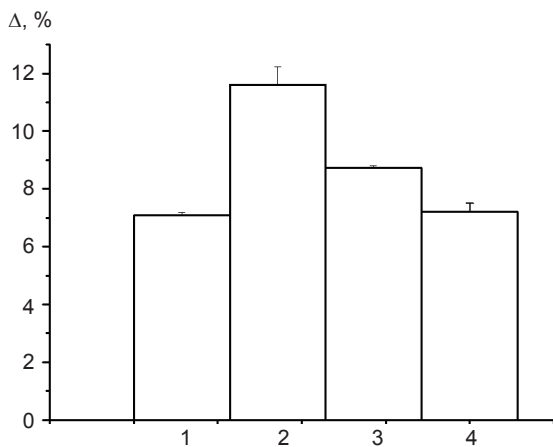


Рис. 4. Вплив інгібітора мітохондріальних K_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоату та інгібітора мітохондріальної пори циклоспорину А на набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль; 2 – дія NaHS (10^{-9} моль/л); 3 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л), дія NaHS; 4 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом і циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія NaHS. * $P < 0,05$ відносно контролю

чиняла зменшення набухання мітохондрій до контрольних значень. У попередніх дослідженнях доведено, що як 5-гідроксидеканоат, так і циклоспорин А не впливали на цей показник.

МП є мультибілковим комплексом, що пронизує подвійну мембрану мітохондрій і може утворюватись як за фізіологічних, так і патологічних умов. За допомогою методу patch-clamp показано, що *in vitro* та *in situ* МП “пульсує”, і це дало змогу припустити, що в інтактних органелах існує низькопровідна “мерехтлива” пора, яка необхідна для підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу [12]. За фізіологічних умов МП існує у стані низької провідності (low-conductance state), що створює у цитоплазмі клітин підвищення концентрації кальцію, близьке до механізму кальційіндукованого вивільнення цього іона, що вперше було виявлено в ендоплазматичному ретикулумі [12].

Отже, можна зробити висновок, що донор сірководню у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л проявляв подвійні ефекти, які пов'язані з активуванням мітохондріальних K_{ATP} -каналів, а також безпосереднім впливом на МП, спричиняючи її функціонування у режимі низької провідності що в ці-

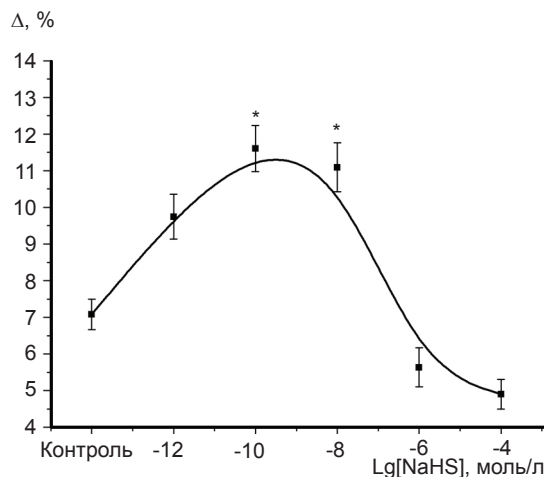


Рис. 5. Концентраційна залежність впливу донора сірководню NaHS на набухання мітохондрій серця при концентрації кальцію 1 нмоль/мг білка. Δ, % – різниця між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. * $P < 0,05$ відносно контролю

лому сприяє вивільненню кальцію з матриксу мітохондрій.

У початкові періоди ішемії клітина прагне знизити вхід кальцію, що лавиноподібно підвищується за впливу катехоламінів, та знизити чутливість м'язового скоротливого апарату до них. Відомий ефект зниження кальцієвого навантаження – робота неселективних мітохондріальних пор. Але надлишок кальцію не може бути повністю відкачаним з мітохондрій через нестачу АТФ, яка в свою чергу утворюється в обмеженій кількості внаслідок роз'єднання процесів дихання і окисного фосфорилування, що створює надлишок цих катіонів. Саме механізми економного використання кисню, індуковані дією сірководню, є одним із шляхів зниження негативних наслідків ішемії. Крім того, важливу роль за цих умов відіграє зв'язування сірководнем вільнорадикальних форм, що також зменшує негативні наслідки стресового ушкодження мембран, зокрема кардіоміоцитів.

ВИСНОВКИ

1. Показано дозозалежне зниження швидкостей поглинання кисню за наявності сукцинату Na та АДФ (стан 3 за Чансом), а також за відсутності останнього (стан 4), при дії NaHS у межах концентрацій 10^{-9} – 10^{-6} моль/л.

2. Зменшення швидкості споживання кисню мітохондріями супроводжувалося збільшенням спряженості процесів окиснення та фосфорилування, про що свідчить збільшення дихального контролю. Ефективність окисного фосфорилування (АДФ/О) достовірно підвищувалася.

3. Виявлено достовірне збільшення швидкості роз'єданого дихання за використання 2,4-динітрофенолу при дії NaHS у концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} моль/л. Більш високі його концентрації (10^{-7} – 10^{-6} моль/л) за введення цього роз'єднувача не спричиняли збільшення швидкості поглинання кисню, що свідчить про повне інгібування дихального ланцюга.

4. Донор сірководню у межах концен-

трацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л викликав помірне набухання мітохондрій серця.

5. Преінкубація ізольованих мітохондрій з блокатором мітохондріальних $K_{\text{АТФ}}$ -каналів 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) частково зменшувала рівень набухання органів серця щурів, що спричинялося дією донора сірководню у концентрації 10^{-9} моль/л. Це свідчить про можливу активацію цих каналів.

6. Сумісна дія 5-гідроксидеканоату та інгібітора МП циклоспорину А зменшувала набухання мітохондрій до контрольних значень.

**Е.Н. Семенихіна, Н.А. Струтинская,
А.Ю. Будько, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач**

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА NaHS НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫС

В опытах на митохондриях, изолированных из тканей сердца взрослых крыс, исследовали влияние донора сероводорода – NaHS на состояние дыхательной цепи. Выявлено, что донор сероводорода в концентрациях 10^{-9} – 10^{-6} моль/л, вызывал дозозависимое уменьшение скорости потребления кислорода при наличии сукцината натрия и АДФ (состояние 3 по Чансу), а также при отсутствии последнего (состояние 4). При этом уменьшение скорости потребления кислорода при концентрации NaHS 10^{-9} моль/л и 10^{-8} моль/л сопровождалось повышением сопряженности процессов окисления и фосфорилирования, о чем свидетельствует увеличение показателя дыхательного контроля; эффективность окислительного фосфорилирования (АДФ/О) при этом не менялась. Полученные результаты свидетельствуют о защитном влиянии донора сероводорода на функциональное состояние митохондрий. Для выяснения других механизмов протекторного действия H_2S также исследовали влияние донора сероводорода на набухание митохондрий. Установлена концентрационная зависимость между влиянием NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) и уровнем набухания митохондрий сердца крыс. Показано, что при концентрации Ca^{2+} 1 нмоль/мг белка в инкубационной среде, в условиях действия донора сероводорода в пределах концентраций 10^{-12} – 10^{-8} моль/л, происходило умеренное набухание митохондрий сердца крыс. При действии NaHS в концентрации 10^{-9} моль/л наблюдали набухание митохондрий, максимальное изменение уровня которого составляло 11 %. Блокатор митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов ($K_{\text{АТФ}}$ -каналов) 5-гидроксидеканоат (10^{-4} моль/л) частично уменьшал набухание митохондрий при наличии NaHS (10^{-9} моль/л), что может свидетельствовать об активации донором сероводорода $K_{\text{АТФ}}$ -каналов. Сделан вывод относительно

возможного участія мітохондріальних K_{ATP} -каналів в механізмах реалізації сероводорода.

Ключевые слова: мітохондрії, сероводород, дихання, мітохондріальна пора, мітохондріальні АТФ-зависимые калієві канали.

O.M. Semenykhina, N.A. Strutynska, A.Yu. Budko, G.L. Vavilova, V.F. Sagach

EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE DONOR NaHS ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE RESPIRATORY CHAIN OF RAT HEART MITOCHONDRIA

In experiments on mitochondria isolated from the heart tissue of adult rats we studied the effects of a donor of hydrogen sulfide, NaHS, on the respiratory chain of the organelles. We found that NaHS (10^{-9} - 10^{-6} mol/l) caused a dose-dependent decrease in the rate of oxygen consumption in the presence of succinate and ADP (state 3 to Chance), and in the absence of ADP (state 4). The decrease in the rate of oxygen consumption in a concentration NaHS 10^{-9} mol/l and 10^{-8} mol/l associated with an increased conjugation of oxidation and phosphorylation, as evidenced by the increase in the respiratory control, the efficiency of oxidative phosphorylation (ADP/O) is not changed. Our studies suggest a protective effect of hydrogen sulfide donor on the functional state of the mitochondria. To elucidate of other the mechanisms of the protective action H_2S we also investigated the effect of hydrogen sulfide donor on the mitochondrial swelling. It was found that NaHS in the range of concentration 10^{-12} – 10^{-4} mol/l influences the level of mitochondria swelling of the rats heart in the dose-dependent manner. It was also shown that when the concentration of Ca^{2+} 1 nmol/mg protein in the medium, under the action of hydrogen sulfide in the donor concentration range 10^{-12} - 10^{-8} mol/l, there was a moderate swelling of rats heart mitochondria. Under the action of NaHS at a concentration of 10^{-9} mol/l it was observed swelling of the mitochondria, the maximum change in the level of which was 11%. Inhibitor of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels) 5-hydroxydecanoate (10^{-4} mol/l) partially reduced the mitochondrial swelling in the presence of NaHS (10^{-9} mol/l), which may indicate the activation of K_{ATP} channels. Our studies point for possible involvement of mitochondrial K_{ATP} channels in implementation of the mechanisms of H_2S .

Key words: mitochondrial permeability transition pore (MPTP), hydrogen sulfide, respiration.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого

контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С.1350–1361.

2. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008.
3. Струтинська Н.А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці дорослих і старих шурів // Фізіол. журн. – 2011. – 57, №6. – С.3–15.
4. Ткаченко Г.М., Кургалюк Н.М., Вовкович Л.С. Вплив активатора K_{ATP} -каналів – пінацидиту на функціонування мітохондрій печінки шурів із різною резистентністю до гіпоксії за стресу // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №1. – С.56–64.
5. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Вплив сірководню на реакції ізольованого серця шурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №6. – С.57–66.
6. Ali M.Y., Ping C.Y., Mok Y.Y., Ling L., Whiteman M., Bhatia M., Moore P.K. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? // Brit. J. Pharmacol. – 2006. – №149. – P. 625–634.
7. Baukowitz T. Fakler B. KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids // Eur. J Biochem. – 2000. – №267. – P. 5842–5848.
8. Billaut-Laden I., Rat E., Allorge D., Crunelle-Thibaut A., Cauffiez C., Chevalier D., Lo-Guidice J.M., Broly F. Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme // Toxicol. Lett. – 2006. – №165. –P.101–111.
9. Bian J.S., Yong Q.C., Pan T.T., Feng Z.N., Ali M.Y., Zhou S., Moore P.K. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes // J. Pharmacol Exp. Therap. – 2006. – №316.– P. 670–678.
10. Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxydative phosphorylation // Adv.Enzymol. – 1956. –17. – P. 65–134.
11. Elrod J.W., Calvert J.W., Morrison J., Doeller J.E., Kraus D.W., Tao L., Jiao X., Scalia R., Kiss L., Szabo C., Kimura H., Chow C.W., Lefter D.J. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function // Proc. Natl. Acad. Sci USA – 2007. – №104. – P. 15560–15565.
12. Ichas F., Jonaville L.S., Mazat J.P Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals // Cell. – 1997. – №89. – P.1145–1153.
13. Johansen D., Ytrehus K., Baxter G.F. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—evidence for a role of K ATP channels // Basic. Res. Cardiol. – 2006. – №101. – P. 53–60.
14. Jha S., Calvert J.W. Duranski MR. Ramachandran A. Lefter DJ. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-

- reperfusion injury: Role of antioxidant and antiapoptotic signaling // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2008. – №295. – P. 801–806.
15. Kabil O., Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide // J. Biol. Chem. – 2010. – №285. – P. 21903–21907.
 16. Li L., Bhatia M., Moore P.K. Hydrogen sulphide—a novel mediator of inflammation? // Curr. Opin. Pharmacol. – 2006. – №6. – P. 125–129.
 17. Lim J.J., Liu Y.H., Khin E.S., Bian J.S. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – №29. – P. 1261–1270.
 18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – №1. – P.265–275.
 19. Ming Fua, Weihua Zhangb, Lingyun Wub, Guangdong Yangd, Hongzhu Lia, Rui Wanga. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production // PNAS. – 2012. – № 8. – P. 2943–2947.
 20. Pan T.T., Neo K.L., Hu L.F., Yong Q.C., Bian J.S. H₂S preconditioning- induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – №294. – P. 169–177.
 21. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis // Cell Calcium. – 2011. – №50. – P.222–233.
 22. Reiffenstein R.J., Hulbert W.C., Roth S.H. Toxicology of hydrogen sulfide // Pharmacol. and Toxicol. – 1992. – №32. – P.109–134.
 23. Shibuya N., Mikami Y., Kimura Y., Nagahara N., Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide // J. Biochem. – 2009. – №146. – P. 623–626.
 24. Shibuya N., Tanaka M., Yoshida M., Ogasawara Y., Togawa T., Ishii K., Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – №11. – P. 703–714.
 25. Sojitra B., Bulani Y., Putcha U.K., Kanwal A., Gupta P., Kuncha M., Banerjee S.K. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice // Mol. Cell Biochem. – 2012. – №360. – P. 61–69.
 26. Sodha N.R., Clements R.T., Feng J., Liu Y., Bianchi C., Horvath E.M., Szabo C., Sellke F.W. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to injury. ischemiareperfusion // Eur. J. Cardiothorac. Surg – 2008. – №33. – P. 906–913.
 27. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide // Antioxid. Redox. Signal. – 2003. – №5. – P. 493–501.
 28. Zhao X., Zhang L.K., Zhang C.Y., Zeng X.J., Yan H., Jin Tang C.S., Du JB. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats // Hypertens Res. – 2008. – №31. – P. 1619–1630.
 29. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener // EMBO J. – 2001. – №20. – P. 6008–6016.

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

Матеріал надійшов до редакції 24.12.2012

М.Р. Хара, С.І. Павлович, В.М. Михайлюк

Статеві відмінності функціональних і структурних порушень у міокарді щурів з гіпотиреозом

В експериментах на статевозрілих щурах було вивчено особливості холінергічної регуляції серця та ступінь структурного його пошкодження при гіпотиреозі залежно від статі та гормонотропної активності гонад. Гіпотиреоз у статевозрілих самців і самиць моделювали введенням щоденно протягом 15 діб мерказолілу (75 мг/кг; внутрішньошлунково). У тварин досліджували інтенсивність брадикардії, яка виникала у відповідь на електричну стимуляцію блукаючого нерва та внутрішньовенне введення ацетилхоліну. Ступінь структурних порушень у серці оцінювали за відсотком некротизованих кардіоміоцитів у шлуночках. Було встановлено, що одним із механізмів зменшення частоти серцевих скорочень при розвитку мерказолілового гіпотиреозу є зростання чутливості холінергичних рецепторів синусового вузла та вивільнення більшої кількості квантів ацетилхоліну з пресинаптичного відділу. Видалення гонад поглиблювало розлади серцевого ритму при гіпотиреозі. Частота серцевих скорочень при цьому зменшувалася більшою мірою, ніж в особин зі збереженими гонадами. Підґрунтям для розвитку брадикардії в самців після гонадектомії з гіпотиреозом було вивільнення більшої кількості ацетилхоліну із закінчень блукаючого нерва, а в самиць – зростання чутливості холінергичних рецепторів синусового вузла. При розвитку мерказолілового гіпотиреозу збільшувався відсоток пошкоджених кардіоміоцитів. Незалежно від гормонотропної активності гонад, цей процес був інтенсивнішим у самиць.

Ключові слова: гіпотиреоз, стать, серце, холінергічна регуляція.

ВСТУП

Гіпотиреоз у кожній розвиненій країні світу – предмет особливої уваги, адже тиреоїдні гормони беруть активну участь у розвитку людини і є визначальним фактором інтелектуального становлення. Загальна поширеність гіпотиреозу в людській популяції за різними даними становить до 10 % [4, 9]. Незалежно від віку, жінки частіше за чоловіків страждають на це захворювання [13]. Важливо контролювати проходження як маніфестного, так і субклінічного гіпотиреозу через імовірні ускладнення з боку серцево-судинної системи [11]. Це лягло в основу практики обстеження таких хворих, що передбачає визначення тиреоїдного статусу з огляду на те, що гіпофункція щитоподібної залози може стати самостійним фактором ризику інфаркту міо-

карда [2, 11]. Серед розладів серцевого ритму, які супроводжують гіпотиреоз, важливе місце посідають брадикардія, атріовентрикулярна блокада, ступінь важкості яких зростає з віком пацієнта та швидкістю прогресування тиреоїдної гіпофункції [5, 12]. У патогенезі синусової брадикардії, як базового порушення серцевого ритму при гіпотиреозі та маркера його важкості, значне місце займає автономна дисфункція [10]. В експериментах на тваринах доведено, що у разі гіпотиреозу суттєво порушуються як адренергічна, так і холінергічна регуляція діяльності серця [8].

Наявність гендерної складової у зазначеній проблемі доводить необхідність подальшого вивчення патогенезу гіпотиреозу, зокрема статевих відмінностей серцевої дисфункції за таких умов, що дасть змогу диференційовано підходити до оцінки стану

пацієнтів та сформувавши адекватні методи профілактики ускладнень.

Мета нашого дослідження – встановити в умовах експерименту характер порушень холінергічної регуляції серця та ступінь структурного його пошкодження в динаміці розвитку мерказолілового гіпотиреозу залежно від статі.

МЕТОДИКА

Експерименти провели на білих лабораторних статевозрілих самцях і самицях щурів (0,17–0,22 кг), гіпофункцію щитоподібної залози в яких моделювали щоденним згодовуванням мерказолілу (75 мг/кг) протягом 15 діб. Усіх тварин поділили на 4 групи. Перша група включала контрольних тварин, друга – щурів з мерказоліловим гіпотиреозом, третя – тварин з видаленими гонадами, четверта – особин, гіпотиреоз в яких виникав на тлі дефіциту статевих гормонів, спричиненого видаленням гонад. Через 5, 10 та 15 діб від початку експерименту вивчали стан холінергічного контролю діяльності серця за показником інтенсивності брадикардії, яка виникала при електричній стимуляції блукаючого нерва та внутрішньовенному введенні ацетилхоліну. У першому випадку це дає змогу оцінювати запаси ацетилхоліну в пресинаптичному відділі п. Vagus, а в другому – чутливість постсинаптичних холінорецепторів. Інтенсивність брадикардії визначали за формулою $R-R_{\max}/R-R_0$, де $R-R_0$ – середнє значення кардіоінтервалів (секунди), реєстрованих на електрокардіограмі до електричного подразнення блукаючого нерва чи внутрішньовенне введення ацетилхоліну, а $R-R_{\max}$ – максимальне значення кардіоінтервалу (секунди), що реєструвалося після зазначених вище функціональних впливів [6]. Для підтвердження розвитку гіпотиреоїдної кардіоміопатії досліджували ступінь структурних змін у міокарді шлуночків. На мікротомі виготовляли поперечні зрізи (товщина 5–6 мкм) на рівні папілярних

м'язів, що відповідає ділянці найбільшої активності скоротливих клітинних елементів, і фарбували за Гейденгайном. У них визначали об'ємний відсоток пошкоджених кардіоміоцитів, які фарбувалися в чорний колір [1]. Всі експерименти та евтаназію тварин здійснювали згідно з положеннями “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986), і „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень було встановлено, що зі збільшенням тривалості дії мерказолілу як у самців, так і в самиць ступінь пригнічення активності синусового вузла зростає. Зменшення частоти серцевих скорочень через 15 діб від початку відтворення гіпотиреозу в самців становило 52 %, а в самиць – 63 %, що засвідчило різницю між тваринами. Інтенсивність брадикардії, якою реагувало серце на стимуляцію блукаючого нерва, через 15 діб експерименту в самиць зросла в 2,1 раза, а в самців – в 1,4 раза (таблиця). Такі зміни, з одного боку, свідчили про збільшення квантів ацетилхоліну, які виділялися в синаптичну щілину при стимуляції блукаючого нерва, з іншого – визначаються чутливістю постсинаптичних холінорецепторів. Останнє оцінювали за інтенсивністю брадикардії, яка виникала у відповідь на внутрішньовенне введення ацетилхоліну. Через 15 діб спостереження за розвитком гіпотиреозу в самиць цей показник зріс у 3,3 раза, а в самців – в 1,7 раза, що підтверджувало збільшення чутливості постсинаптичних холінорецепторів. Як і в першому дослідженні було виявлено різницю між тваринами різної статі.

Достовірні зміни інтенсивності брадикардії, отриманої в досліді з електричною стимуляцією блукаючого нерва та при введенні

Інтенсивність брадикардії (абсолютне число), що виникала при електричній стимуляції блукаючого нерва та внутрішньовенному введенні ацетилхоліну (M±m, n=6)

Інтенсивність брадикардії	Стать	Гіпотиреоз			
		Контроль	5 діб	10 діб	15 діб
Тварини зі збереженими гонадами					
Електрична стимуляція блукаючого нерва	Самці	8,81±0,09**	7,90±0,16*,**	9,10±0,10**	12,54±0,15*,**
	Самиці	7,78±0,08	8,98±0,11*	10,20±0,14*	16,20±0,13*
Введення ацетилхоліну	Самці	4,59±0,14	4,66±0,11**	7,62±0,13*,**	7,90±0,16*,**
	Самиці	4,27±0,16	6,12±0,09*	8,21±0,14*	14,20±0,18*
Тварини з видаленими гонадами					
Електрична стимуляція блукаючого нерва	Самці	5,11±0,12**,***	8,31±0,23*,**	15,33±0,64*,**,***	20,09±0,86*,**,***
	Самиці	3,61±0,14***	3,88±0,10***	3,99±0,09***	5,03±0,18*,***
Введення ацетилхоліну	Самці	4,03±0,06**,***	3,03±0,16*,***	2,09±0,09*,**,***	1,17±0,01*,**,***
	Самиці	3,09±0,10***	3,47±0,13*,***	10,49±0,24*,***	21,81±1,14*,***

* достовірна відмінність ($P < 0,05$) відносно контролю, ** достовірна відмінність між тваринами різної статі, *** достовірна відмінність відносно показника тварин зі збереженими гонадами.

ацетилхоліну, підтвердили вагому роль обох складових, які визначали холінореактивність пейсмейкерів синусового вузла тварин. Щоправда, домінуючим при цьому було підвищення чутливості постсинаптичних холінорецепторів. Варто зазначити, що реакція холінергічних структур серця самиць на функціональні впливи в умовах гіпотиреозу була достовірно вищою. Це пояснює більш суттєве зменшення частоти серцевих скорочень у них при розвитку гіпотиреозу.

Для встановлення ролі статевих гормонів у функціональній перебудові серця при розвитку гіпотиреозу наступні дослідження було проведено на щурах з видаленими гонадами. Реакція серця самців з гіпотиреозом після гонадектомії на стимуляцію блукаючого нерва на 15-ту добу спостереження була в 1,6 раза більшою, ніж у тварин зі збереженими гонадами. При введенні ацетилхоліну в яремну вену серце цих тварин реагувало брадикардією, інтенсивність якої була в 6,8 раза меншою, ніж в особин зі збереженими гонадами. Сукупний аналіз отриманих результатів показав, що дефіцит андрогенів сприяв значному в умовах гіпотиреозу накопиченню ацетилхоліну в пресинаптичному відділі блукаючого

нерва і це слід вважати головним механізмом розвитку брадикардії. А менш суттєві, ніж у самиць, зміни ритму серця найімовірніше були результатом зменшення чутливості холінорецепторів синусового вузла, що варто оцінити як прояв компенсації.

У самиць з видаленими гонадами, на відміну від самців, зменшення частоти серцевих скорочень, як головний прояв тиреоїдної гіпофункції, було наслідком зростання чутливості постсинаптичних холінорецепторів. Адже інтенсивність брадикардії, яка виникала при введенні ацетилхоліну у них, була в 1,5 раза більшою, ніж в особин зі збереженими гонадами, а при електричній стимуляції блукаючого нерва – в 3,2 раза меншою. Варто зазначити, що зменшення частоти серцевих скорочень у самиць, гіпотиреоз в яких виникав на тлі гонадектомії, було більш суттєвим, ніж у самців з видаленими гонадами. Така особливість реакції серця самиць на холінергічні впливи, зважаючи на те, що передача сигналів через M2-холінорецептори відбувається за участю G-білків і вторинного месенджера – цГМФ, може свідчити про синергічність ефектів естрогенів і тиреоїдних гормонів на рівні холінорецепторів кардіоміоцитів [7, 10].

В умовах гіпотиреозу виникали структурні зміни в серці, ступінь яких також залежав від статі та гормонопродукуючої активності гонад.

Морфометричний аналіз показав, що об'ємний відсоток пошкоджених кардіоміоцитів, які при забарвленні за Гейденгайном фарбувалися в чорний колір, у самців зі збереженими гонадами через 15 діб від початку розвитку гіпотиреозу зріс в 3,4 раза, а в самиць – в 4,9 раза. У тварин з видаленими гонадами дефіцит тиреоїдної активності викликав суттєвіші структурні зміни в шлуночках. Кількість пошкоджених кардіоміоцитів у таких самців була більшою, ніж в особин зі збереженими гонадами, в 1,7 раза, а в самиць – в 2,1 раза. Як за збереженої, так і відсутньої гормонопродукуючої активності гонад ступінь структурних змін, викликаних дефіцитом тиреоїдних гормонів, був більший у самиць щурів. Про це свідчив більший об'ємний відсоток пошкоджених кардіоміоцитів на 57 та 95 % відповідно.

Наведені результати показали статеву відмінність не лише в порушенні функціонування серця, зокрема характеру холінергічної регуляції, але й у ступені пошкодження міокарда, що демонструє важчий перебіг тиреоїдопатії в особин жіночої статі, незалежно від активності гонад.

ВИСНОВКИ

1. Мерказоліловий гіпотиреоз характеризується зростанням реакції серця на холінергічні впливи. Такі зміни є інтенсивнішими в самиць щурів.

2. Домінуючим механізмом розвитку гіпотиреоїдної брадикардії в самців з видаленими гонадами є накопичення ацетилхоліну в пресинаптичному відділі блукаючого нерва, а в самиць – зростання чутливості постсинаптичних холінергічних рецепторів.

3. Мерказоліловий гіпотиреоз викликає структурне пошкодження міокарда шлуночків, що за збережених та видалених гонад є суттєвішим у самиць.

М.Р. Хара, С.І. Павлович, В.Н. Михайлюк

ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СТРУКТУРНЫХ НАРУШЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРЫС С ГИПОТИРЕОЗОМ

В экспериментах на половозрелых крысах были изучены особенности холинергической регуляции сердца и степень структурного его повреждения при гипотиреозе в зависимости от пола и активности половых желез. Гипотиреоз у половозрелых самцов и самок моделировали введением мерказолила (75 мг/кг; внутривентрикулярно) ежедневно в течение 15 сут. У животных исследовали интенсивность брадикардии, которая возникала в ответ на электрическую стимуляцию блуждающего нерва и внутривенное введение ацетилхолина. Степень структурного повреждения сердца оценивали по проценту поврежденных кардиомиоцитов в миокарде желудочков. Было установлено, что одним из механизмов уменьшения частоты сердечных сокращений при развитии мерказолилового гипотиреоза является повышение чувствительности холинорецепторов синусового узла и выделение большего количества квантов ацетилхолина из окончаний блуждающего нерва, особенно у самок. При развитии гипотиреоза на фоне гонадэктомии брадикардия была более существенной, чем у особей с сохраненными половыми железами. Ее возникновению у самцов способствовало высвобождение большего количества ацетилхолина из окончаний блуждающего нерва, а у самок – увеличение чувствительности холинорецепторов синусового узла. Независимо от гормонопродуцирующей активности гонад, структурное повреждение миокарда самок крыс при мерказолиловом гипотиреозе было существеннее, чем у самцов.

Ключевые слова: гипотиреоз, пол, сердце, холинергическая регуляция

M.R. Khara, S.I. Pavlovych, V.M. Mykhailiuk

SEX DIFFERENCE OF FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ALTERATIONS IN RAT MYOCARDIUM UNDER HYPOTHYROIDISM

In experiments on sexually mature rats we studied specific cholinergic regulations of the heart and the degree of its structural damage in hypothyroidism, depending on gender and hormone-productive activity of the gonads. Hypothyroidism in sexually mature males and females was modelled with mercazolil intragastric administration (75 mg/kg) daily during 15 days. We also studied the intensity of bradycardia, which occurred in response to electrical stimulation of vagus nerve and intravenous acetylcholine administration. The degree of structural heart damage was assessed by the percentage of damaged cardiomyocytes in the ventricles of myocardium. It was found that one of the mechanisms of bradycardia in mercazolil-induced hypothyroidism is an increase of the sensitivity of sinus node cholinergic receptors and release of more quanta of acetylcholine from stimulated nerves vagus

endings, what was more intense in females. The intensity of bradycardia in hypothyroidism was more significant in *gonadectomized animals* than in individuals with preserved gonads. The mechanisms of its occurrence in males consist of release of greater amount of acetylcholine from the endings of the nerves vagus, and in females it was the result of significant increase of the sensitivity of sinus node cholinergic receptors. Regardless of the gonads activity, structural damage of the myocardium in merkazolil-induced hypothyroidism was more intense in female rats.

Key words: hypothyroidism, sex, heart, cholinergic regulation.

*V. Hnatyuk Ternopil National Pedagogical University;
O.O. Bogomolets Physiology Institute of National Academy
of Sciences of Ukraine;*

I. Ya. Horbachevski Ternopil State Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 383 с.
2. Будневский А.В., Бурлачук В.Т., Грекова Т.И. Гипотиреоз и сердечнососудистая патология // Клиническая тиреоидология. – 2004. – 2, № 2. – С. 7–14.
3. Доскина Е.В. Гипотиреоз у пожилых больных // Рос. мед. журн. – 2007. – 15, № 27. – С. 2103–2107.
4. Огнева Н.А., Трошина Е.А. Тактика лечения впервые выявленного гипотиреоза // Там же. – 2009. – 17, № 10. – С. 684–686.
5. Ткаченко В.И. Гипотиреоз: патогенетические основы клинических проявлений // Семейная медицина. – 2008. – № 1. – С. 15–19.
6. Хара М.Р. Особливості холінергічної регуляції серця інтактних і кастрованих самців та самок щурів // Буков. мед. вісн. – 2004. – 8, № 1. – С. 153–155.
7. Ampong B., Honda H., Kogo H. Effect of hypothyroidism on beta-adrenoreceptor-mediated relaxation in the rat thoracic aorta. A time-dependent study // *Vascul. Pharmacol.* – 2002. – 38, № 3. – P. 149–155.
8. Cacciatori V., Gemma M.L., Bellavere F., Castello R., De Gregori M.E., Zoppini G., Thomaseth K., Moghetti P., Muggeo M. Power spectral analysis of heart rate in hypothyroidism // *Eur. J. Endocrinol.* – 2000. – 143, № 3. – P. 327–333.
9. Canaris G.J., Manowitz N.R., Mayor G., Ridgway E.C. The Colorado thyroid disease prevalence study // *Arch. Intern. Med.* – 2000. – 60. – P. 526–534.
10. Guasti L., Marino F., Cosentino M., Cimpanelli M., Piantanida E., Mainardi L.T., Vanoli P., De Palma D., Bombelli R., Ferrari M., Crespi C., Simoni C., Klersy C., Gaudio G., Maroni L., Grandi A.M., Tanda M., Bartalena L., Cerutti S., Lecchini S., Venco A. Changes in autonomic modulation to the heart and intracellular catecholamines. A longitudinal study in differentiated thyroid carcinoma during short-term hypothyroidism and thyroid hormone replacement // *Horm. Res.* – 2007. – 67, № 4. – P. 171–178.
11. Hak A.E., Pols H.A., Visser T.J., Drexhage H.A., Hofman A., Witteman J.C. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study // *Ann. Intern. Med.* – 2000. – 132, № 4. – P. 270–278.
12. Ozcan K.S., Osmonov D., Erdinler I., Altay S., Yildirim E., Turkkan C., Hasdemir H., Cakmak N., Alper A.T., Satilmis S., Gurkan K. Atrioventricular block in patients with thyroid dysfunction: prognosis after treatment with hormone supplementation or antithyroid medication // *J. Cardiol.* – 2012. – 60, № 4. – P. 327–332.
13. Tseng F.Y., Lin W.Y., Lin C.C., Lee L.T., Li T.C., Sung P.K., Huang K.C. Subclinical hypothyroidism is associated with increased risk for all-cause and cardiovascular mortality in adults // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2012. – 60, № 8. – P. 730–737.

*Терноп. нац. пед. ун-т ім. В. Гнатюка;
Ін-т фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Терноп. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського
E-mail: khara_m@list.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 06.12.2012*

М.Я. Співак, Л.М. Лазаренко, Т.М. Фалалєєва, О.В. Вірченко, К.С. Непорада

Профілактична дія пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB на стресіндуковані ураження в слизовій оболонці шлунка щурів

*Вивчали вплив пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та їхньої суміші на ерозивно-виразкові ураження слизової оболонки шлунка щурів (СОШ), викликані водно-імобілізаційним стресом. Встановлено, що окреме профілактичне введення впродовж 14 діб штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB не впливало на ураженість СОШ, викликану стресом. Проте профілактичне введення їхньої суміші було ефективним у захисті СОШ від уражень. Одним з механізмів гастропротекторної дії пробіотичних бактерій *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB є попередження деградації слизового бар'єру шлунка, що виявлялося у зменшенні вмісту вільних фукози та гексуронових кислот у СОШ. Отримані результати є експериментальним підтвердженням доцільності застосування пробіотиків для профілактики стресіндукованих уражень СОШ.*

Ключові слова: нормофлора, пробіотики, виразкова хвороба шлунка.

ВСТУП

У функціонуванні та підтриманні гомеостазу шлунково-кишкового тракту важлива нормофлора. Більшість повідомлень стосуються мікробіоценозів товстого кишечника, який є основним резервуаром симбіотичних бактерій людини вцілому і травного тракту зокрема [18]. Симбіотична мікрофлора товстокишкового біотопу переважно представлена грамположитивними та грамнегативними анаеробними сахаролітичними бактеріями (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*) [11]. Що стосується мікробіоценозу шлунка, то тривалий час вважалося, що в нормі він повинен бути стерильним, беручи до уваги високу концентрацію соляної кислоти та протеолітичних ферментів. І тільки після відкриття *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) питанням мікробної екології верхніх відділів травного тракту стали приділяти більшу увагу.

H.pylori є головною причиною хронічного гастриту, фактором ризику розвитку

пептичної виразки і раку шлунка [16]. Нині для їхньої ерадикації застосовують антибіотикотерапію, яка порушує нормофлору шлунково-кишкового тракту, для відновлення якої застосовують пробіотики. Останні являють собою препарати на основі живих клітин симбіотичної мікрофлори. Пробіотичні бактерії не лише відновлюють мікробіоценоз травного тракту, а і проявляють антагоністичні взаємодії з бактеріями *H.pylori*. З використанням гістологічних і мікробіологічних методів показано, що за умов норми в слизовій оболонці шлунка (СОШ) здатні колонізуватися до 30 видів мікроорганізмів, серед яких домінуючими є кислоторезистентні штами *Lactobacillus*. Було виявлено їхню здатність пригнічувати уреазну активність, ріст бактерій *H.pylori* та знижувати запалення в СОШ, викликане ними. Хоча введення лише пробіотиків самостійно не призводило до ерадикації *H.pylori*, в літературі є дані, що при включенні їх у схему лікування інфекції *H.pylori* (антибіотики разом з інгібіторами

© М.Я. Співак, Л.М. Лазаренко, Т.М. Фалалєєва, О.В. Вірченко, К.С. Непорада

протонної помпи) був отриманий кращий терапевтичний ефект [15, 26]. Плацебо-контрольоване, подвійне сліпе рандомізоване дослідження показало, що включення пробіотиків *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bb99 and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS не вплинуло на частоту появи нових чи посилення наявних симптомів під час ерадикації *H. pylori*, проте значущо зменшило загальну оцінку негативних симптомів, викликаних цими бактеріями [12].

Сучасні наукові дослідження встановили гастропротекторні властивості пробіотиків при експериментальному виразкоутворенні [12–14, 21]. Хоча на сьогодні антисекреторні препарати залишаються золотим стандартом у профілактиці та лікуванні виразки шлунка, проте частина пацієнтів нечутлива до них або страждає від рецидивів та ускладнень навіть після повного виліковування [25]. Тому дійсно пошук нетоксичних препаратів природного походження, які мають антивиразкову активність, а також виявлення механізмів їхньої дії є надзвичайно актуальними.

У механізмах підтримання гомеостазу СОШ важливу роль відіграє збереження структури колагенових і неколагенових білків слизу. Біохімічною основою слизового бар'єру шлунка є протективні білки: нейтральні та кислі глікопротеїни, глікозаміноглікани, колагенові білки. За умов дії стресу руйнується слизовий бар'єр, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну, фукози, гексуранових кислот [10, 22].

Дослідженнями різних авторів показано, що пробіотики здатні підтримувати сталість слизового бар'єру. Caballero-Franco і співавт. [8] встановили, що пробіотична суміш VSL#3 посилює експресію білків слизу в товстому кишечнику, особливо це стосується білка MUC 2. Otte і співавт. [18] показали зростання експресії білків MUC2, MUC3 та MUC5AC при інкубації епітеліальних клітин з пробіотичною сумішшю VSL#3 та *Escherichia coli* штаму Nissle. На лініях епітеліальних клітин

Streptococcus thermophilus і *Lactobacillus acidophilus* виявилися ефективними у захисті структур цитоскелета та щільних контактів через підтримання експресії актину та білка щільних контактів ZO-1 та посилення експресії білків актиніну та оклюдину [17]. Інші автори повідомляють про відновлення структури епітеліально-слизового бар'єру при введенні мультипробіотика «Симбітер ацидофільний концентрований» за умов гіпоацидності шлункового соку у тканині пародонта [2] та СОШ [1]. Ці дані стосуються дії пробіотиків на епітеліальні клітини товстого кишечника та слизово-епітеліальний бар'єр шлунка за умов гіпоацидності, тому нами був оцінений вплив пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та їхньої суміші на стан слизового бар'єру шлунка після нанесення стресу за вмістом вільних оксипроліну, фукози та гексуранових кислот у СОШ.

Враховуючи вищенаведене, метою нашої роботи було оцінити характер ерозивно-виразкових уражень СОШ щурів, а також стан слизового бар'єру за умов нанесення стресу та 14-добового профілактичного введення пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та їхньої суміші.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 28 білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [19]. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні. Всі тварини, відібрані для експерименту, були піддані ветеринарному огляду, акліматизації протягом 5 днів, після чого розділені методом рандомізації на групи, пронумеровані і відповідним чином позначені.

Для вивчення профілактичної дії пробіотиків на стресіндуковане виразкоутворення

тварини були поділені на 5 груп по 7 щурів в кожній. Щури 1-ї групи були інтактними. Щурам 2-ї групи (стрес-контроль) один раз на добу інтрагастрально вводили водопровідну дехлоровану воду (плацебо) об'ємом 0,25 мл/100 г маси щура впродовж 14 діб. Щури 3-, 4- та 5-ї груп отримували впродовж 14 діб пробіотичні штами роду *Bifidobacterium*: 3-тя і 4-та групи – водний розчин *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г відповідно), 5-та – водний розчин їх суміші (1:1) в такій самій концентрації. Ліофілізовані пробіотики були розведені у воді з розрахунку 0,25 мл/100 г. Через 14 діб після закінчення введення пробіотичних штамів за добу до нанесення стресу щурів 2–5-ї груп не годували (харчова депривація), але вони мали вільний доступ до води. Щоб отримати ерозивно-виразкові ураження СОШ у щурів цих груп застосовували модель 3-годинного водно-імобілізаційного стресу [23, 24]. Для

імобілізації щурів поміщали в металеві перфоровані камери, які опускали вертикально у воду на 3 год так, щоб рівень води сягав яремної ямки щура. Температура води становила 22–23°C. Після стресу тварин виводили з експерименту за допомогою цервікальної дислокації. З черевної порожнини діставали шлунок, розрізали його по малій кривизні, вивертали слизовою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином. Після чого досліджували стан СОШ за допомогою гастроскопа і оцінювали характер гострих уражень: обраховували площу та кількість ерозивно-виразкових уражень та інтенсивність крововиливів у балах (0 – відсутні крововиливи, 1 – 1-2 точкових крововиливи, 2 – 3,4 точкових крововиливи, 3 – понад 4 точкових крововиливів, 4 – 1-2 масивних крововиливи, 5 – більше ніж 2 масивні крововиливи), а також розраховували середній розмір одного ураження за формулою:

$$\text{Середня площа одного ураження} = \frac{\text{Сумарна площа уражень в шлунку щура}}{\text{Кількість уражень в шлунку щура}}$$

У гомогенаті СОШ визначали вміст (у мікромолях на 1 г) вільних оксипроліну [3], фукози [5] і гекууронових кислот [4].

Статистичну обробку результатів здійснювали у пакеті програм “Statistica 8.0”. Для аналізу виду їхнього розподілу був використаний W критерій Шапіро-Уїлка. Оскільки частина отриманих значень була розподілена за нормальним законом, а частина – ні, то були використані як параметричні, так і непараметричні методи порівняння вибірок. Для статистичної обробки параметричних результатів був використаний критерій Левана для оцінки рівності дисперсій і критерій t Стьюдента для незалежних вибірок. Порівняння непараметричних результатів проводили за допомогою U -критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), стандартну похибку середнього (m) і стандартне квадратичне відхилення (SD) для значень, розподілених за нормальним законом, а медіану (Me) і нижній та верхній

квартилі для непараметричних. Значущими вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після нанесення 3-годинного ВІС у СОШ щурів контрольної групи з'явилися численні ерозивно-виразкові ураження сумарною площею 16[14,5; 18,9] мм² на один шлунок (рис. 1,а). Кількість уражень становила 25[17; 34] на один шлунок (див. рис. 1,б), середня площа одного ураження – 0,69[0,56; 0,8] мм², інтенсивність крововиливів у шлунку – 4[4;5] бали (рис. 2).

Встановлено, що введення штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB впродовж 14 діб до нанесення стресу не призводило до статистично значущих змін у розмірах ерозивно-виразкових уражень, їх кількості та інтенсивності крововиливів (див. рис. 1, рис. 2). При цьому суміш двох штамів (1:1) виявила гастропротекторні властивості. Так, значно зменшилася сумарна площа уражень

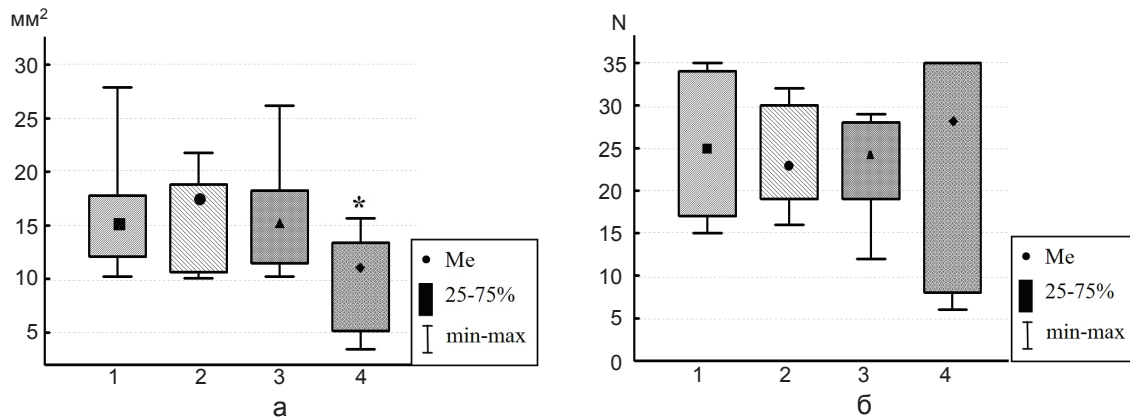


Рис. 1. Вплив профілактичного введення впродовж 14 діб пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г), ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г) та їхньої суміші (1:1) ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г) на площу (а) та кількість (б) ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлука щурів, викликаних водно-імобілізаційним стресом (n=7): 1 – плацебо; 2 – *Bifidobacterium animalis* VKL; 3 – *Bifidobacterium animalis* VKB; 4 – суміш штамів. *P<0,05 порівняно з контрольною групою

на 27 % (P<0,05) порівняно з контрольною групою тварин (див. рис. 1,а). Пробиотична суміш *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB не вплинула на кількість ерозивно-виразкових уражень у СОШ щурів (див. рис. 1,б), при цьому середній розмір одного ураження істотно зменшився під впливом цієї комбінації пробіотичних штамів на 30 % (P<0,05) порівняно з контролем. Також був виявлений профілактичний ефект суміші пробіотиків на утворення крововиливів у СОШ, інтенсивність яких знижувалася під впливом пробіотичних бактерій на 50 % (P<0,05; див. рис. 2). Отримані результати свідчать про те, що сумарна площа уражень у СОШ знижується під впливом цих штамів не за рахунок зменшення їх кількості, а через зменшення площі кожного окремого ураження.

Таким чином, профілактичне введення впродовж 14 діб суміші двох пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB певною мірою захищає СОШ від ерозивно-виразкових уражень та зменшує інтенсивність крововиливів, зумовлених дією стресу.

Гастропротекторна дія пробіотиків може здійснюватися через різні механізми. За даними Konturek і співавт. [12] позитивний їх вплив (*Escherichia coli* штаму Nissle, *Lactobacillus acidophilus* R0052 і *Lactobacillus rhamnosus* R0011)) на гоєння

уражень СОШ реалізується завдяки протизапальним, антиапоптотичним і вазодилаторним властивостям. Автори зазначають, що введення пробіотиків стимулює синтез простагландину E_2 , який забезпечує захист від уражень СОШ, а також пригнічує експресію прозапального фактора некрозу пухлин α [12]. В іншій роботі Konturek і співавт. [13] показали, що пробіотична бактерія *Escherichia coli* штаму Nissle 1917 чинить гастропротектор-

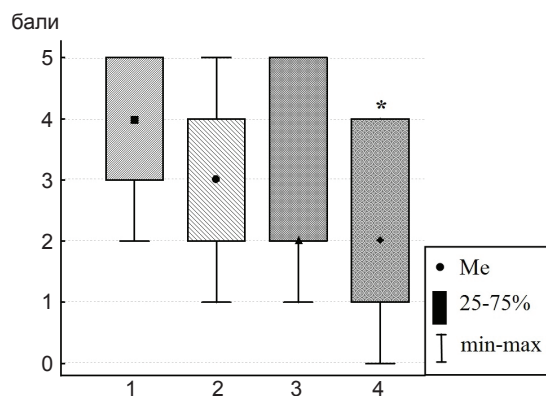


Рис. 2. Інтенсивність крововиливів, викликаних водно-імобілізаційним стресом, в слизовій оболонці шлука щурів при профілактичному введенні впродовж 14 діб пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г), ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г) та їхньої суміші (1:1) ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г), (n=7): 1 – плацебо; 2 – *Bifidobacterium animalis* VKL; 3 – *Bifidobacterium animalis* VKB; 4 – суміш штамів. *P<0,05 порівняно з контрольною групою

ний вплив, і виявили залучення у механізми гастропротекції простагландинів, оксиду азоту, капсаїцин-чутливих сенсорних волокон. Також було показано зростання після стресу у тварин, яким вводили пробіотик, експресії білка теплового шоку HSP70 і греліну, які виявляють гастропротекторні властивості, і зниження експресії IL-1 β , порівняно з тваринами, яким вводили фізіологічний розчин. В роботі Lam і співавт. [14] було встановлено, що введення *Lactobacillus rhamnosus* стимулює експресію фактора росту ендотелію судин (VEGF) і посилює рівень фосфорилування епідермального фактора росту (EGF). Крім цього спостерігалася підвищена експресія орнітин-декарбоксилази і антиапоптичного білка Bcl-2. Отже, *L. rhamnosus* покращує лікування виразкових уражень СОШ через зменшення апоптозу клітин відносно проліферації і через стимуляцію ангиогенезу в стінці шлунка [14]. Senol і співавт. [21] показали, що пробіотична суміш із 13 штамів бактерій здійснює профілактичний вплив на ерозивно-виразкові ураження в СОШ щурів, викликані введенням аспірину. Дослідники виявили зростання під впливом пробіотиків концентрації секреторного імуноглобуліну А в СОШ щурів та зниження концентрації продукту перекисного окислення ліпідів – малонового діальдегіду.

Також слід відзначити важливість прямого імуномодулювального впливу пробіотичних бактерій. Гіперактивація імунної системи під час дії надмірного стресу призводить до посилення викиду кортикостероїдів, які збільшують ураження в СОШ [6, 7, 20]. Пробиотичні бактерії стимулюють утворення антизапальних цитокінів (інтерлейкіну 10, фактора росту пухлин β), що забезпечує зменшення активації імунної системи і попереджує розвиток ерозивно-виразкових уражень у СОШ [9].

Нами був досліджений як можливий механізм захисної дії пробіотичних штамів у шлунку їхній вплив на стан слизово-епітеліального бар'єру. Показано, що після дії стресу в тканині СОШ вміст вільного окси-

проліну зростав на 49,2% ($P < 0,001$) порівняно з інтактним контролем, що свідчить про активацію колагенолітичних процесів у СОШ (рис. 3,а). При введенні пробіотичних штамів та їхньої суміші вміст вільного оксипроліну у СОШ значно не змінювалася порівняно зі стрес-контролем.

Стрес приводив до збільшення вмісту вільної фукози в слизовому бар'єрі на 33,1 % ($P < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 3,б). При введенні окремих пробіотичних штамів концентрація вільної фукози значущо не відрізнялася від значення показника у групі, що отримувала плацебо. Введення суміші *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB призводило до статистично значущого зменшення вмісту вільної фукози в пристінковому слизі на 10% ($P < 0,05$) порівняно з групою стрес-контролю (див. рис. 3,б). Отже, пробіотична суміш запобігає деградації фукопротеїнів сполучної тканини слизово-епітеліального бар'єру шлунку за умов нанесення стресу.

Після дії стресу вміст вільних гексуронових кислот у пристінковому слизі шлунка зростав на 61 % ($P < 0,001$) порівняно з інтактним контролем (див. рис. 3,в). При профілактичному введенні пробіотичних штамів цей показник значно зменшувався порівняно з щурами, яким вводили плацебо, на 20 % ($P < 0,01$), 22,1 % ($P < 0,001$) та 22,5 % ($P < 0,01$) відповідно при введенні *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та їхньої суміші (див. рис. 3,в). Ці результати свідчать, що окремі штами бактерій так само ефективно захищали СОШ від деградації глікозаміногліканів, як і їхня суміш. Таким чином, пробіотичні бактерії *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB здійснювали найбільш істотний профілактичний вплив на вміст гексуронових кислот в слизовому бар'єрі порівняно з впливом на вміст вільних оксипроліну та фукози.

Отже, профілактичне введення *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB впродовж 14 діб попереджувало деполімеризацію фукопротеїнів сполучної тканини та протективних

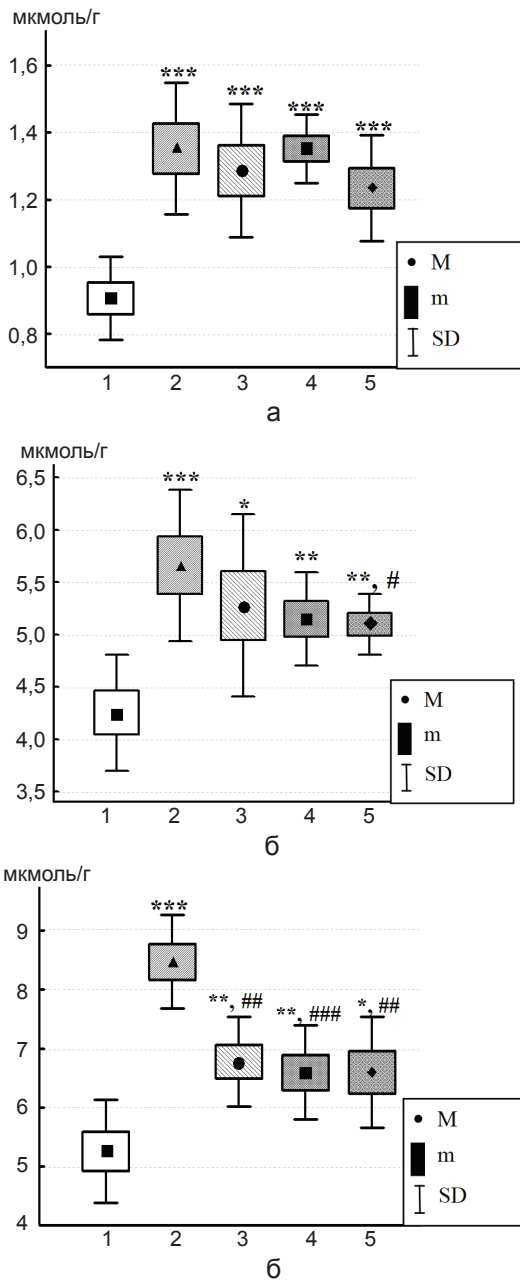


Рис. 3. Вплив вільних оксипроліну (а), фукози (б) і гексуронової кислоти (в) у пристінковому слизі шлунку після водно-імобілізаційного стресу за умов профілактичного введення впродовж 14 діб пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г), ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г) та їхньої суміші (1:1) ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/100 г), (n=7): 1 – інтактний контроль; 2 – плацебо; 3 – *Bifidobacterium animalis* VKL; 4 – *Bifidobacterium animalis* VKB; 5 – суміш штамів. *, **, *** P<0,05, P<0,01, P<0,001 відповідно відносно інтактного контролю, #, ##, ### P<0,05, P<0,01, P<0,001 відповідно відносно групи щурів, яким вводили плацебо

білків пристінкового слизу, свідченням чого є зменшення концентрації вільної фукози та гексуронової кислоти відповідно. При цьому слизовий бар'єр не був відновлений до показників інтактного контролю, що узгоджується з даними макроскопічного аналізу СОШ. При оцінці характеру уражень значущий гастропротекторний вплив був виявлений у групі щурів, яким вводили суміш *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB. Біохімічний аналіз СОШ показав також найбільш ефективний гастропротекторний вплив суміші пробіотиків, при цьому також виявив профілактичну дію окремих штамів.

Таким чином, отримані результати свідчать, що одним з механізмів гастропротекторної дії пробіотичних бактерій *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB є їхній вплив на слизовий бар'єр у шлунку.

ВИСНОВОК

1. Профілактичне введення впродовж 14 діб суміші двох пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB захищає СОШ від ерозивно-виразкових уражень і зменшує інтенсивність крововиливів, зумовлених дією стресу, а також попереджує деполімеризацію фукопротеїнів сполучної тканини та протективних білків пристінкового слизу, свідченням чого є зменшення відповідно концентрації вільної фукози та гексуронової кислоти.

2. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням можливості застосування пробіотикотерапії для профілактики стресіндукованих уражень СОШ.

Н.Я. Спивак, Л.М. Лазаренко, Т.М. Фалалеева, А.В. Вирченко, К.С. Непорада

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* VKL И VKB НА СТРЕССИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС

Изучали влияние пробиотических штаммов *Bifidobacterium animalis* VKL и VKB и ихней смеси на эрозивно-язвенные

поражения слизистой оболочки желудка крыс (СОЖ), вызванные водно-иммобилизационным стрессом. Установлено, что отдельное профилактическое введение в течение 14 сут штаммов *Bifidobacterium animalis* VKL и VKB не влияло на поражения СОЖ, вызванные стрессом. Тем не менее профилактическое введение их смеси было эффективным в защите СОЖ от поражений. Одним из механизмов гастропротекторного действия пробиотических бактерий является предотвращение деградации слизистого барьера желудка, что проявлялось в уменьшении содержания свободных фукозы и гексуроновых кислот в СОЖ. Полученные результаты есть экспериментальным подтверждением целесообразности применения пробиотиков для профилактики стрессиндуцированных поражений СОЖ. Ключевые слова: нормофлора, пробиотики, язвенная болезнь желудка.

M. Ya. Spivak, L.M. Lazarenko, T.M. Falalyeyeva, O.V. Virchenko, K.S. Neporada

PROPHYLACTIC INFLUENCE OF PROBIOTIC STRAINS BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS VKL AND VKB ON STRESS-INDUCED LESIONS IN THE GASTRIC MUCOSA OF RATS

It was investigated the effect of probiotic strains *Bifidobacterium animalis* VKL and VKB and their mixture on erosive and ulcerative lesions in the gastric mucosa (GM) of rats induced by water immersion restraint stress. It was found that separate prophylactic introduction for 14 days of *Bifidobacterium animalis* VKL or *Bifidobacterium animalis* VKB didn't protect the GM from erosive and ulcerative lesions induced by stress. Contrary prophylactic introduction of *Bifidobacterium animalis* VKL and VKB mixture has been effective in protecting the GM from the lesions. One of the mechanisms of the gastroprotection of these probiotic strains is prevention of mucus barrier from degradation, which was evident in decrease of free fucose and hexuronic acids content. These results confirm the expediency of probiotics use for the prevention of stress-induced lesions in the GM.

Key words: normal flora, probiotics, gastric ulcer.

*D.K.Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;*

Kyiv Taras Shevchenko National University;

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абдулахад К., Фалалєєва Т., Кухарський В., Прибійтько І., Толстаново Г., Берегова Т. Вплив тривалої гіпоацидності шлункового соку на морфофункціональний стан органів травлення та його корекція мультипробіотиками групи «Симбітер» // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних

функцій. – 2012. – № 15. – С.4–8.

2. Манько А.М., Берегова Т.В., Непорада К.С. Вплив мультипробіотика Симбітеру ацидофільного на патологічні зміни у кістковій тканині пародонта при гіпоацидності // Фізіол. журн. – 2011. – 57, № 6. – С.80–84.
3. Тетянець С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1985. – №1 – С.61–62.
4. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях // Там же. – 1987. – № 5 – С.530–532.
5. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р. Метод определения фукозы, не связанной с белками // Клини. лаб. диагностика. – 1997. – №4 – С.17–18.
6. Berkenbosch F., van Oers J., del Rey A., Tilders F., Besedovsky H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1 // Science. – 1987. – 238, № 4826. – P.524–526.
7. Bernton E.W., Beach J.E., Holaday J.W., Smallridge R.C., Fein H.G. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells // Ibid. – P.519–521.
8. Caballero-Franco C., Keller K., De Simone C., Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2007. – 292, № 1. – P.G315–322.
9. Chen L.L., Wang X.H., Cui Y., Zhang J., Ouyang C.H., Lu F.G. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice // World J. Gastroenterol. – 2009. – 15, № 3. – P.321–327.
10. Hasebe T. Collagen and collagenase in ulcer tissue-2. Restraint and water immersion induced gastric lesions and effects of cimetidine and misoprostol // Tokai. J. Exp. Clin. Med. – 1987. – 12, № 3. – P.181–190.
11. Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane G.T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles // Gut. – 2001. – 48, № 2. – P.198–205.
12. Konturek P.C., Brzozowski T., Loffler K., Burnat G., Konturek S.J. Gastroprotective effects of probiotics: myth or reality? // Fiziol. Zh. – 5th international symposium on cell/tissue injury and cytoprotection/organoprotection (Yalta, Ukraine, September 17–19 2008). – 2009 – 55, №1. – P.85.
13. Konturek P.C., Sliwowski Z., Koziel J. Ptak-Belowska A., Burnat G., Brzozowski T., Konturek S.J. Probiotic bacteria *Escherichia coli* strain Nissle 1917 attenuates acute gastric lesions induced by stress // J. Physiol. Pharmacol. – 2009. – 60, Suppl 6. – P.41–48.
14. Lam E.K., Yu L., Wong H.P., Wu W.K., Shin V.Y., Tai E.K., So W.H., Woo P.C., Cho C.H. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats // Eur. J. Pharmacol. – 2007. – 565, № 1–3. – P.171–179.
15. Lesbros-Pantoflickova D., Corthesy-Theulaz I., Blum A.L. *Helicobacter pylori* and probiotics // J. Nutr. – 2007. – 137, № 3, Suppl 2. – P.812S–818S.

16. Myllyluoma E., Veijola L., Ahlroos T., Tynkkynen S., Kankuri E., Vapaatalo H., Rautelin H., Korpela R. Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy—a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2005. – **21**, № 10. – P.1263–1272.
17. Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2009. – **15**, № 2. – P.300–310.
18. Otte J.M., Podolsky D.K. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2004. – **286**, № 4. – P.G613–626.
19. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act // *Vet. Q.* – 1986. – **8**, № 4. – P.346–349.
20. Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Plotsky P., Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor // *Science.* – 1987. – **238**, № 4826. – P.522–524.
21. Senol A., Isler M., Karahan A.G., Kilic G.B., Kuleasan H., Goren I., Saritas U., Kaya S., Ciris M., Akturk O., Aridogan B.C., Demirin H., Cakmakci L.M. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions // *Turk. J. Gastroenterol.* – 2011 – **22**, № 1. – P.18–26.
22. Skrypnyk I.M. Biochemical mechanism of ulcer development under stressful conditions // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2001. – **73**, № 1. – P.110–114.
23. Takagi K., Kasuya Y., Watanabe K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* – 1964. – **12**, № – P.465–472.
24. Takeuchi K., Okabe S., Takagi K. A new model of stress ulcer in the rat with pylorus ligation and its pathogenesis // *Amer. J. Dig. Dis.* – 1976. – **21**, № 9. – P.782–788.
25. Young Oh T., Ok Ahn B., Jung Jang E., Sang Park J., John Park S., Wook Baik H., Hahm K.B. Accelerated Ulcer Healing and Resistance to Ulcer Recurrence with Gastroprotectants in Rat Model of Acetic Acid-induced Gastric Ulcer // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2008. – **42**, № 3. – P.204–214.
26. Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – **57**, Suppl 3, № . – P.123–141.

*Ин-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, Київ;
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Вищий держ. навч. заклад України «Укр. мед. стомат.
академія», Полтава
Email: spivak@serv.imv.kiev.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 23.11.2012*

П.І. Янчук, О.В. Бондзик, Є.М. Решетнік, С.П. Весельський

Вплив L-аргініну на показники кисневого балансу печінки та її жовчосекреторну функцію

У гострих дослідях на наркотизованих щурах показано, що L-аргінін посилює киснезалежні синтетичні процеси у печінці, зокрема, пов'язані з мітохондріальними поліферментними системами біосинтезу жовчних кислот, з одночасною активацією в гепатоцитах тканинного дихання. Напруження кисню в залозі при цьому не змінюється. Реалізація вказаних ефектів відбувається частково за участі оксиду азоту. Поряд з цим L-аргінін пригнічує холерез без залучення до реакції NO. Дозозалежність ефектів L-аргініну на вміст холатів у жовчі може свідчити про різний вплив амінокислоти на такі метаболічні перетворення жовчних кислот, як гідроксилювання та кон'югація.

Ключові слова: печінка, L-аргінін, L-NAME, кисневий баланс, холерез, жовчні кислоти.

ВСТУП

Печінка – поліфункціональний орган, більшість синтетичних процесів у якому відбувається за підвищення активності тканинного дихання. Його модулятором може бути амінокислота L-аргінін. Надійшовши з їжею, вона всмоктується в тонкому кишечнику і з кров'ю по ворітній вені транспортується до печінки, де основна її частина утилізується в орнітиновому циклі. Частина L-аргініну, що не метаболізувалася в печінці, використовується як субстрат для продукції NO [10], який бере участь у регуляції життєво важливих функцій та діяльності різних органів, у тому числі й печінки [1, 19]. Відомо, що NO є потужним судинорозширювальним фактором, здатним істотно впливати на кровообіг в органах, постачання з кров'ю до них кисню, а, отже, і на їхній кисневий гомеостаз [3, 20, 24]. Основним джерелом ендogenous аргініну є обмін білків в організмі.

Разом з тим така специфічна і важлива функція печінки, як секреція жовчі, що є складним багатоетапним процесом, включає в себе низку переважно киснезалежних процесів [8, 13, 14]. До таких відноситься синтез жовч-

них кислот, які є основними компонентами жовчі [15, 16, 18]. Але у науковій літературі зустрічаються лише поодинокі праці щодо впливу NO та його попередників на кисневий баланс і жовчосекреторну функцію печінки. До того ж, переважна більшість дослідників, вивчаючи вплив L-аргініну на фізіологічні функції, використовують його дози, які в десятки разів перевищують фізіологічні [4, 21, 22]. Тому лишається відкритим питання стосовно того, яким чином ця амінокислота діє на функціонування печінки у дозах, близьких до її фізіологічної концентрації в крові. Метою нашої роботи було дослідити вплив L-аргініну на показники кисневого балансу печінки та її жовчосекреторну функцію.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені in vivo в умовах гострого експерименту на 83 білих лабораторних щурах-самцях масою 250–340 г, наркотизованих тіопенталом натрію (60 мг/кг) або уретаном (1 г/кг). Тиск крові в сонній артерії та ворітній вені реєстрували електроманометром ЕМТ-31. Напруження кисню (P_{O₂}) в печінці щурів вимірювали полярографом LP-9

у хроноамперометричному режимі при фіксованій напрузі – 0,6 В, використовуючи 2–3 покритих склом платинових (індикаторних) електроди, розташованих у різних ділянках печінки. Як індіферентний використовували стандартний каломельний електрод від рН-метра. Калібрували електроди за методикою Березовського [2]. Всі показники записували на реєстраторі Н071.6М.

Інтенсивність поглинання кисню тканиною печінки оцінювали за коефіцієнтом його споживання, розрахованого за швидкістю зниження $Р_{O_2}$ в паренхімі печінки під час півхвилинної оклюзії ворітної вени та печінкової артерії [6].

Упродовж перших 30 хв визначали вихідний рівень жовчовиділення через забір із жовчної протоки трьох 10-хвилинних порцій жовчі. Після цього шураем у ворітну вену робили ін'єкцію розчину L-аргініну (5 та 10 мг/кг; "Sigma", США). Неселективний блокатор NO-синтаз L-NAME (20 мг/кг; "Sigma", США) вводили внутрішньопортально за 5 хв до інфузії L-аргініну. У зібраних впродовж двох півгодинних проміжків дослідження пробах жовчі визначали вміст жовчних кислот [5]. Цей метод дає змогу виявити такі жовчні кислоти: кон'юговані таурохолеву (ТХК), таурохенодезоксихолеву і тауродезоксихолеву в суміші (ТХДХК і ТДХК), глікохолеву (ГХК), глікохенодезоксихолеву і глікодезоксихолеву в суміші (ГХДХК і ГДХК), а також вільні жовчні кислоти холеву (ХК) та хенодезоксихолеву і дезоксихолеву в суміші (ХДХК і ДХК). Чутливість методу – 1–3 мкг органічного компонента в пробі. Концентрацію кожної з зазначених органічних фракцій у пробах жовчі, отриманих після введення досліджуваних речовин, порівнювали зі значеннями вмісту відповідної органічної фракції у першій півгодинній пробі жовчі, яку вважали вихідним рівнем.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оцінки нормальності розподілу використовували тест Шапіро-Уїл-

ка. Оскільки результати наших досліджень мали нормальний розподіл, то для оцінки вірогідних відмінностей між залежними вибірками використовували критерій t Стюдента. Для вибірок розраховували $M \pm SD$ (середнє значення \pm середньоквадратичне відхилення). Відмінності між групами вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вихідні значення системного артеріального тиску (САТ) становили $(97,9 \pm 8,3)$ мм рт. ст., тиску у ворітній вені (Твв) – $(7,4 \pm 1,5)$ мм рт. ст., $Р_{O_2}$ – $(35,6 \pm 6,8)$ мм рт. ст. Внутрішньопортальне введення L-аргініну у дозах 5 і 10 мг/кг викликало зниження САТ на 14,6 % ($P < 0,05$) і 18,9 % ($P < 0,01$) та Твв – на 8,7 % ($P < 0,05$) і 28,6 % ($P < 0,01$) від вихідного рівня відповідно, а також зумовлювало невелике і статистично невірогідне підвищення рівня $Р_{O_2}$ в печінці. Це свідчить про те, що L-аргінін у вказаних дозах розширює артеріальні і ворітні судини, більш імовірно, за рахунок вазодилататорної дії оксиду азоту, попередником якого він є, та не впливає на $Р_{O_2}$ в залозі. Той факт, що розширення кровоносних судин печінки під впливом цієї амінокислоти, а отже, і зростання її кровопостачання та надходження до неї з кров'ю кисню, не призводить до змін цього показника в органі, може свідчити про активацію споживання кисню в залозі.

І дійсно, наші дослідження засвідчили, що L-аргінін спричиняв вірогідне зростання коефіцієнта швидкості споживання кисню печінкою впродовж усього дослідження. При введенні його в дозі 5 мг/кг найістотніше підвищення цього показника на 56,2 % ($P < 0,01$) відносно вихідного рівня $(2,28 \pm 0,77)$ спостерігалось на 60-й хвилині дослідження (рис. 1). Введення вдвічі вищої дози (10 мг/кг) амінокислоти ще більш суттєво збільшувало коефіцієнт швидкості споживання кисню органом (рис. 1). Максимальне його підвищення на 88,8 % ($P < 0,001$) щодо вихідного рівня $(1,78 \pm 0,72)$ відбувалося на 50-й хвилині експерименту.

Надалі вирішили з'ясувати роль NO у реалізації стимулювальної дії L-аргініну на тканинне дихання печінки. Слід відмітити, що введення блокатора NO-синтази L-NAME пригнічувало максимальні реакції збільшення швидкості споживання кисню печінкою на дію L-аргініну у дозі 5 мг/кг на 41,4 %, а у дозі 10 мг/кг на 67,7 % (див. рис. 1). Причому в останньому випадку блокувальний ефект спостерігався лише після 20 хв реєстрації показника.

Таким чином, результати цієї серії досліджень свідчать про те, що введення L-аргініну в дозі 5 мг/кг, яка збігається з фізіологічною концентрацією амінокислоти в крові [9, 25], посилює споживання кисню печінкою впродовж усього періоду спостережень. Реалізація цієї дії відбувається частково за участі NO, а решта її складової – це, ймовірно, пряма активуюча дія L-аргініну на

процеси мітохондріального дихання в залозі, про що свідчать дані Nisoli [22]. Внаслідок цього, як вказує автор, інтенсифікується утворення активних форм кисню мітохондріальним ферментним комплексом II, що, у свою чергу, стимулює процеси ліпопероксидації. Щодо стимулювального впливу на тканинне дихання в печінці L-аргініну у дозі 10 мг/кг, то спочатку (до 20-ї хвилини) проявляється його пряма дія на мітохондрії гепатоцитів, а потім – опосередкована NO. Відсутність вірогідних змін PO_2 в печінці разом з одночасним збільшенням споживання нею кисню при дії L-аргініну пов'язане, мабуть, зі зростанням надходження кисню до залози з кров'ю внаслідок розширення її кровоносних судин, зумовленого впливом NO.

У зв'язку з тим, що L-аргінін стимулює споживання кисню печінкою, він може віді-

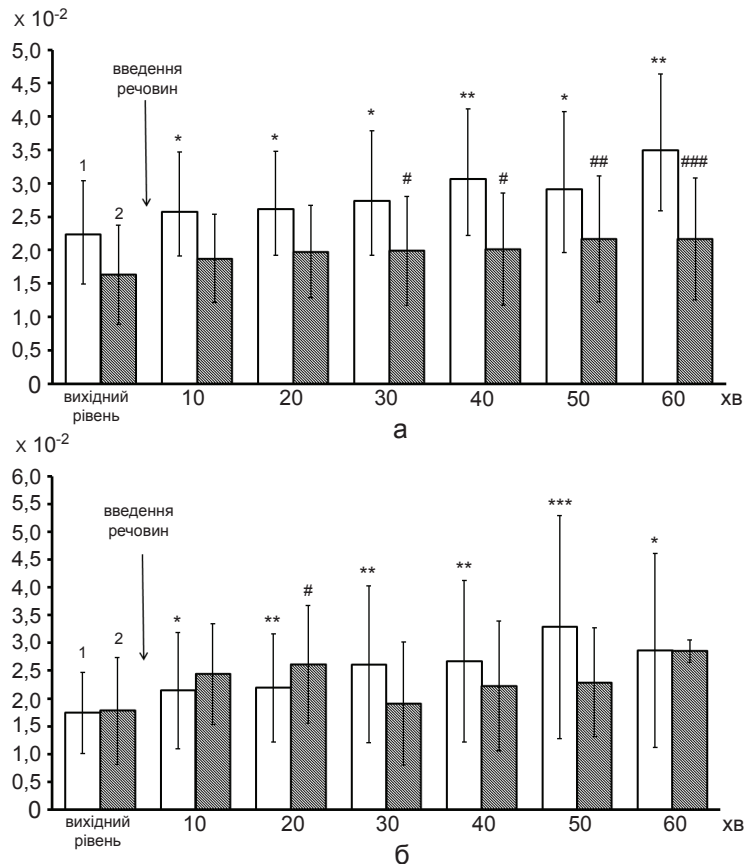


Рис. 1. Зміни коефіцієнта споживання кисню печінкою при внутрішньопортальному введенні L-аргініну в дозах 5 мг/кг (а) і 10 мг/кг (б) до (1) та після (2) блокади NO-синтази L-NAME (20 мг/кг). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 порівняно з вихідним рівнем до блокади; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 порівняно з вихідним рівнем після блокади

гравати роль активатора в ній киснезалежних біосинтетичних процесів, зокрема холесекреції. Вона, як відомо, є результатом інтеграції низки біохімічних реакцій у печінці, чільне місце серед яких посідають аеробні метаболічні процеси, пов'язані з переносом електронів у мітохондріальному та мікросомальному (ендоплазматична сітка) ланцюгах окиснення.

Було проведено серію дослідів з внутрішньопортальним введенням фізіологічного розчину у кількості 1 мл/кг. Виявилось, що швидкість жовчовиділення при цьому коливається в межах $1,27 \pm 0,35 - (1,30 \pm 0,36)$ мкл · г⁻¹ печінки · хв⁻¹. Вірогідних змін відносно вихідного рівня жовчотоку у 10-хвилинних пробах жовчі протягом години дослідів не відбувалось, але спостерігалася тенденція до зниження об'єму печінкового секрету. Це

можна пояснити порушенням ентерогепатичної циркуляції жовчних кислот внаслідок оперативного втручання.

L-аргінін у дозі 5 мг/кг викликав зменшення холерезу порівняно з вихідним рівнем ($0,94 \pm 0,31$) мкл · г⁻¹ печінки · хв⁻¹, максимальні зміни якого на 19,6 % ($P < 0,001$) відбувалися на 60-й хвилині дослідів (рис. 2). Аналогічна ситуація спостерігалася при введенні досліджуваної амінокислоти у дозі 10 мг/кг. Максимальне зменшення об'єму секретованої жовчі на 17,2 % ($P < 0,001$) відносно вихідного рівня ($1,20 \pm 0,18$) мкл · г⁻¹ печінки · хв⁻¹ спостерігалось також на 60-й хвилині дослідів.

Для з'ясування можливої участі NO у механізмі гіпохолеретичної дії L-аргініну ми провели серію дослідів з L-NAME. L-аргінін за умов попереднього введення блокатора NO-синтази пригнічував холерез майже

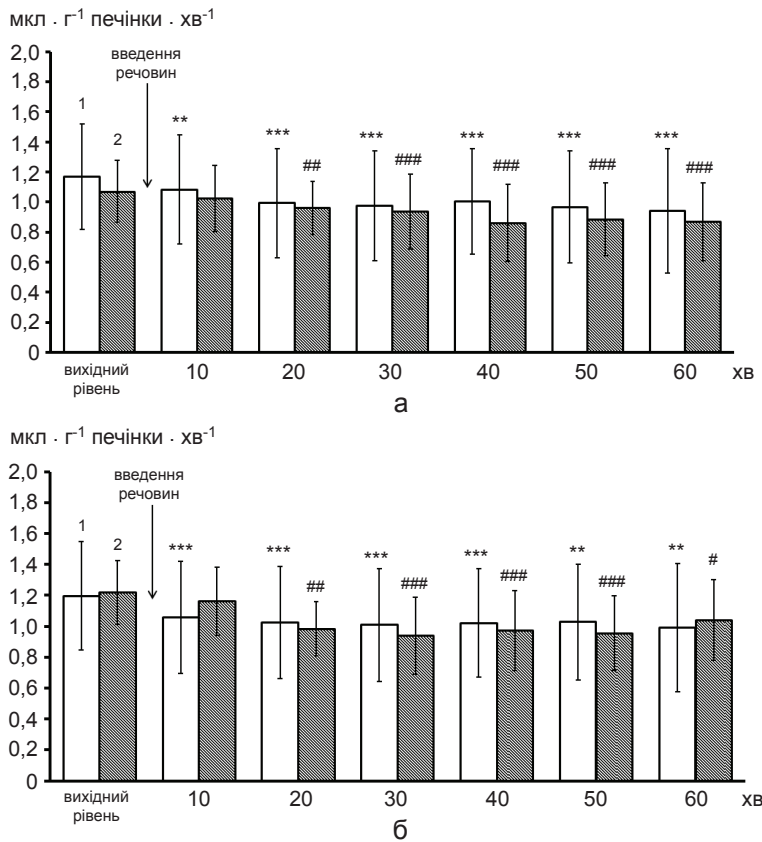


Рис. 2. Об'ємна швидкість секретії жовчі у щурів при внутрішньопортальному введенні L-аргініну в дозах 5 мг/кг (а) і 10 мг/кг (б) до (1) та після (2) блокади NO-синтази L-NAME (20 мг/кг). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ порівняно з вихідним рівнем до блокади; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ порівняно з вихідним рівнем після блокади

так само, як і до блокади (див. рис. 2). Це свідчить про те, що NO до цих впливів не залучений.

Отже, L-аргінін у застосованих нами дозах виявляє гіпохолеретичну дію. Механізми такого впливу можуть бути зумовлені утворенням метаболітів амінокислоти, які виявляють регуляторний вплив на системному рівні, і дією самого L-аргініну на певні ланки процесу холесекреції. Можна припустити, що це стосується перебігу процесів активного вилучення жовчних кислот з синусоїдної крові, їхньої біотрансформації, кон'югації з таурином і гліцином, гідроксилювання, і внутрішньоклітинного транспорту чи активного перенесення через каналікулярну мембрану зі зміною їх концентрації у первинних жовчних протоках, оскільки саме ці процеси складають основу формування жовчі [11, 14]. Отримані результати змін швидкості холерезу під впливом L-аргініну стали підґрунтям для подальших досліджень жовчочислотного складу зібраної впродовж гострих дослі-

дів жовчі. Рушійною силою секреції жовчі є осмотичнозалежне надходження води в жовчні каналікули, що зумовлене активним транспортом осмотично активних речовин, основними з яких є, перш за все, жовчні кислоти [11, 12]. Оскільки внаслідок оперативного втручання порушується ентерогепатична циркуляція жовчних кислот, логічним може бути припущення щодо посилення їх синтезу. Однак наші попередні дослідження не виявили посилення синтезу жовчних кислот впродовж однієї години досліду у щурів, яким внутрішньопортально вводили фізіологічний розчин.

Ін'єкція шурам L-аргініну певним чином модулювала процеси синтезу жовчних кислот. Так, ця амінокислота в дозі 5 мг/кг викликала вірогідне підвищення концентрації в жовчі ТХК на 9,6 % ($P < 0,05$) відносно вихідного рівня у перші 30 хв після його введення (табл. 1). Водночас вміст у жовчі вільної ХК зменшувався на 26,8 % ($P < 0,05$) в другій півгодинній пробі жовчі. Зміни тауро-

Таблиця 1. Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів за умов дії L-аргініну в дозах 5 і 10 мг/кг ($M \pm SD$)

Дози препарату	Проби жовчі	Таурохолева кислота	Таурохенодезоксихолева і Тауродезоксихолева кистоти	Глікохолева кислота	Глікохенодезоксихолева і глікодезоксихолева кистоти	Холева кислота	Хенодезоксихолева і дезоксихолева кистоти
5 мг/кг	1	202,38 ±18,93	125,7 ±16,22	113,25 ±31,18	45,3 ±17,73	24,8 ±5,73	9,58 ±2,73
	2	221,73 ±15,72*	137,47 ±17,6	112,42 ±24,8	44,8 8±14,78	22,43 ±7,61	8,08 ±4,75
	3	208,46 ±21,80	124,8 ±19,58	103,15 ±28,1	41,78 ±16,29	18,15 ±4,43*	8,51 ±4,11
10 мг/кг	1	171,28 ±10,14	96,33 ±15,44	152,78 ±51,92	22,68 ±6,32	19,1 ±8,94	8,83 ±1,51
	2	171,5 ±3,4	105,2 ±20,52	152,93 ±65,69	23,6 ±9,23	21,65 ±15,37	12,08 ±2,93*
	3	167,43 ±6,86	106,05 ±20,46*	134,3 ±64,73*	21,8 ±6,92	21,17 ±11,23	10,38 ±1,93

Примітка. Тут і в табл. 2: 1 – проба жовчі, зібрана впродовж 30 хв до введення досліджуваних речовин (вихідний рівень); 2 і 3 – 30-хвилинні проби жовчі, зібрані після введення досліджуваних речовин. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ порівняно з вихідним рівнем.

кон'югатів і глікохенодезоксихолевої кислоти при цьому були невірогідні. L-аргінін у дозі 10 мг/кг підвищував порівняно з вихідним рівнем концентрації суміші ТХДХК і ТДХК на 10,1 % ($P < 0,05$) та ХДХК і ДХК на 36,8 % ($P < 0,05$) в 2-й півгодинній порції жовчі, водночас знижуючи вказаний параметр для ГХК на 12,1 % ($P < 0,05$). При цьому вміст у жовчі щурів ТХК і суміші ГХДХК і ГДХК знижувався невірогідно.

Отже, L-аргінін зумовлює активацію киснезалежних процесів біосинтезу жовчних кислот, пов'язаних з мітохондріальними поліферментними системами [12], що підтверджується вище представленими результатами про зростання споживання кисню печінкою під впливом цієї амінокислоти. У дозі 5 мг/кг L-аргінін стимулює в гепатоцитах процеси кон'югації тригідроксихоланової первинної жовчної кислоти – ХК з таурином, не впливаючи на утворення глікокон'югатів. Більша доза амінокислоти (10 мг/кг) пригальмовує кон'югацію жовчних кислот як з гліцином, так і з таурином. Слід відзначити також встановлені нами залежні від дози особливості впливу L-аргініну на вміст холатів у жовчі. Таким чином, якщо досліджувана амінокислота у дозі 5 мг/кг збільшувала концентрацію ТХК із одночасним зменшенням ХК, то при застосуванні L-аргініну в дозі 10 мг/кг збільшувалася концентрація дигідроксихоланових кислот (ТХДХК і ТДХК, ХДХК і ДХК). Це свідчить про різний дозозалежний вплив L-аргініну на такі метаболічні перетворення холатів, як гідроксилування та кон'югація. Відомо, що остання є заключним етапом їх біосинтезу у більшості ссавців і, зокрема, у щурів, близько 90 % цих специфічних компонентів жовчі знаходяться у кон'югованому з таурином або гліцином стані [12, 17]. Зазначені амінокислоти взаємодіють з КоА-ефіром відповідної жовчної кислоти. Каталізаторами цієї реакції виступають мікросомальна КоА-лігаза жовчних кислот і цитозольна N-ацетилтрансфе-

раза, які працюють із витратою енергії та за наявності НАД, АМФ, Mg^{2+} , КоА [17]. Можна припустити, що збільшення концентрації таурокон'югатів жовчних кислот у жовчі тварин при введенні L-аргініну пов'язане зі зміною активності відповідних ферментних систем гепатоцитів. Фізіологічне значення кон'югації полягає у тому, що пов'язані з таурином і гліцином холати більш розчинні, ніж відповідні вільні жовчні кислоти. Завдяки цьому значно зростає швидкість їх секреції з жовчю. Оскільки здатність останньої солюбілізувати жири та сприяти їх всмоктуванню в кишечнику значною мірою залежить від вмісту в ній холатів, можна вважати, що L-аргінін покращує вказані властивості жовчі. Разом з тим ступінь літогенності печінкового секрету залежить також від вмісту в ньому певних фракцій жовчних кислот. І саме збільшення концентрації ТХК має знижувати ризик виникнення жовчокам'яної хвороби [7].

Введення L-аргініну у дозі 5 мг/кг під час блокади NO-синтази L-NAME зумовлювало збільшення концентрації кон'югованих жовчних кислот з одночасним зниженням вмісту вільних холатів порівняно з вихідним рівнем (табл. 2). Так, концентрація ТХК в 1-й та 2-й півгодинних пробах жовчі збільшувалася відповідно на 9,3 та 20,6 % ($P < 0,001$). Паралельно з цим збільшувалася вміст у жовчі суміші ТХДХК і ТДХК на 4,5 та 7,8 % відповідно ($P < 0,05$). Концентрація фракції ГХК підвищувалася на 4,3 % ($P < 0,05$) у перші 30 хв після введення речовин. Водночас знижувалася концентрація вільних жовчних кислот у жовчі відносно вихідного рівня. В обох дослідних півгодинних пробах жовчі досліджуваного зменшувався вміст вільної ХК на 10,4 та 18,0 % ($P < 0,01$), а суміші ХДХК і ДХК на 4,7 та 7,9 % відповідно ($P < 0,05$).

При введенні L-аргініну у дозі 10 мг/кг на фоні дії L-NAME також збільшувалася вміст у жовчі кон'югованих холатів порівняно з вихідним рівнем (див. табл. 2). Так, в 1-й та 2-й

Таблиця 2. Концентрація жовчних кислот у жовчі щурів після введення L-аргініну в дозах 5 і 10 мг/кг на фоні дії L-NAME в дозі 20 мг/кг (M±SD)

Дози препарату	Проби жовчі	Таурохолева кислота	Таурохенодезоксихолева і Тауродезоксиохолева кистоти	Глікохолева кислота	Глікохенодезоксихолева і глікодезоксихолева кистоти	Холева кислота	Хенодезоксихолева і дезоксихолева кистоти
5 мг/кг	1	179,5 ±8,49	98,54 ±7,63	140,46 ±11,28	17,92 ±5,24	21,62 ±3,21	7,64 ±0,49
	2	196,14 ±10,94***	103,0 ±8,41**	146,56 ±10,29**	18,36 ±6,1	19,38 ±2,86**	7,28 ±0,54***
	3	216,54 ±9,67 ***	106,26 ±8,82**	144,6 ±13,36	17,4 ±7,1	17,72 ±2,81***	7,04 ±0,54***
10 мг/кг	1	188,62 ±14,09	96,07 ±17,61	164,55 ±62,0	25,97 ±10,58	20,15 ±8,54	10,27 ±2,93
	2	207,55 ±21,71**	107,73 ±18,99**	176,93 ±76,15*	29,00 ±10,6 *	20,7 ±8,19	10,7 ±2,04
	3	213,25 ±30,25*	108,4 ±25,78*	171,48 ±113,46	28,5 ±11,45	21,32 ±11,59	10,9 ±1,96

півгодинних пробах жовчі зросла концентрація ГХК на 10,0 та 13,1 % ($P<0,05$) та суміші ТХДХК і ТДХК на 12,1 та 12,8 % відповідно ($P<0,05$). Аналогічний показник ГХК зростав на 7,5% ($P<0,05$) у перші 30 хв після введення речовин. Концентрація вільних холатів підтримувалася на рівні, близькому до такого у першій півгодинній пробі жовчі.

Отже, L-аргінін викликає посилення киснезалежних синтетичних процесів у печінці, зокрема, пов'язаного з мітохондріальними поліферментними системами біосинтезу жовчних кислот, з одночасною активацією в гепатоцитах тканинного дихання. PO_2 в залозі при цьому не змінюється, ймовірно, завдяки зростанню її кровопостачання під впливом NO. Реалізація цих ефектів амінокислоти відбувається частково за участі NO та, можливо, за її безпосередньої дії. Разом з тим L-аргінін пригнічує холерез, що не пов'язано з його здатністю бути донором утворення оксиду азоту. Встановлена нами дозозалежність ефектів L-аргініну на вміст холатів у жовчі може свідчити про різний вплив амінокислоти на такі метаболічні перетворення жовчних кислот, як гідроксилювання та кон'югація.

П.І. Янчук, Е.В. Бондзик, Е.Н. Решетник, С.П. Весельський.

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ КИСЛОРОДНОГО БАЛАНСА ПЕЧЕНИ И ЕЕ ЖЕЛЧЕСЕКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ

В острых опытах на наркотизированных крысах показано, что L-аргинин вызывает усиление кислородзависимых синтетических процессов в печени, в частности, связанных с митохондриальными полиферментными системами биосинтеза желчных кислот, с одновременной активацией в гепатоцитах тканевого дыхания. Напряжение кислорода в железе при этом не изменяется. Реализация указанных эффектов осуществляется частично при участии оксида азота. Вместе с тем L-аргинин угнетает холерез без вовлечения в реакцию NO. Дозозависимое действие L-аргинина на содержание холатов в желчи может свидетельствовать о различном действии аминокислоты на такие метаболические преобразования желчных кислот, как гидроксильрование и конъюгация.

Ключевые слова: печень, L-аргинин, L-NAME, кислородный баланс, холерез, желчные кислоты.

P.I. Yanchuk, O.V. Bondzyk, E.M. Reshetnik, S.P. Veselsky

EFFECT OF L-ARGININE ON THE OXYGEN BALANCE OF THE LIVER AND ITS BILE SECRETION FUNCTION

In acute experiments on anesthetized rats we showed

that L-arginine causes an increase in oxygen-dependent synthetic processes in the liver, particularly associated with mitochondrial polyenzyme systems biosynthesis of bile acids with simultaneous activation in hepatocytes tissue respiration. The level of oxygen tension in the gland is not changed. Implementation of these effects partly involves nitric oxide. In addition, the L-arginine inhibits cholepoiesis without involving to the reaction NO. Dose-dependent influence L-arginine on the bile cholates content may indicate a different effect of this amino acids on metabolic transformation of bile acids such as hydroxylation and conjugation.

Key words: liver, L-arginine, L-NAME, oxygen balance, cholepoiesis, bile acids.

Taras Shevchenko Kyiv National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Апихтіна О.Л., Коцюрuba A.B., Андрусишина І.М. Продукція оксиду азоту в печінці за умов впливу ацетату свинцю в експерименті // Совр. пробл. токсикології. – 2007. – 2. – С. 22–26.
- Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека // К.: Наук. думка, – 1975. – 280 с.
- Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Коркушко О.В., Безруков В.В., Кульницький О.К., Стефанов О.В., Соловйов А.І., Мала Л.Т., Фролькіс В.В. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №1. – С. 11–30.
- Мурашук К., Іккерт О., Гальків М., Гордій С. Вплив L-аргініну на вікові зміни процесів пероксидного окислення ліпідів та активність системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 3. – С.38–43.
- Пат. 99031324 Україна, МБН А61В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи // С.П. Весельський, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська. – № 33564А; заяв. 05.10.1999; опубл. 15.02.2001; Бюл. № 1.
- Цыбенко В.А., Егорова Л.С., Михайлова Н.В., Жахалова Л.А., Дубилей Т.А. Нейрогенный контроль окислительного метаболизма в печени // Физиол. журн. СССР. – 1988. – 5. – С.737–745.
- Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: *Практ. руководство*. – М. ГОЭТАР – МЕД, 2002. – 864 с.
- Agreese M., Trauner M. Molecular aspects of bile formation and cholestasis // Trends Mol. Med. – 2003. – 9, № 12. – P.558–564.
- Berthe M.C., Darquy S., Breuillard C., Lamoudi L., Marc J., Synober L., Chaumeil J.C., Couderc R. High plasma citrulline and arginine levels ensured by sustained-release citrulline supplementation in rats // Nutrition. – 2011. – 27, № 11-12. – P.1168–1171.
- Buger R.H. The pharmacodynamics of L-arginine // J. Nutr. – 2007. – 137, № 6. – P.1650–1652.
- Boyer J.L. Bile canalicular secretion - tales from Vienna and Yale // Wien Med. Wochenschr. – 2008. – 158, № 19–20. – P.534–538.
- Chiang J.Y. Bile acids: regulation of synthesis // J. Lipid Res. – 2009. – 50, № 10. – P.1955–1966.
- Dawson P.A., Lan T., Rao A. Bile acid transporters // Ibid. – 2009. – 50, № 12. – P.2340–2357.
- Esteller A. Physiology of bile secretion // World J. Gastroenterol. – 2008. – 14, № 37. – P.5641–5649.
- Hofmann A.F. Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients // Hepatology. – 2009. – 49, № 5. – P.1403–1418.
- Hofmann A.F., Hagey L.R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – 65, № 16. – P.2461–2483.
- Kakiyama G., Iida T., Yoshimoto A., Goto T., Mano N., Goto J., Nambara T., Hagey L.R., Hofmann A. F. Chemical synthesis of (22E)-3 alpha,6 beta,7 beta-trihydroxy-5 beta-chol-22-en-24-oic acid and its taurine and glycine conjugates : a major bile acid in the rat // J. Lipid Res. – 2004. – 45. – P.567–573.
- Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation // Physiol. Rev. – 2009. – 89, №1. – P.147–191.
- McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver // PNAS. – 2002. – 99, № 26. – P.17161–17166.
- Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge // J. Nutr. – 2007. – 137, № 6 (2). – P. 1602S–1609S.
- Nikolic J., Stojanovic I., Pavlovic R., Sokolovic D., Bjelakovic G., Beninati S. The role of L-arginine in toxic liver failure: interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase // Amino acids. – 2007. – 32, № 1. – P.127–131.
- Nisoli E., Carruba M.O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis // J. Cell Sci. – 2006. – 119. – P.2855–2862.
- Ozsoy Y., Ozsoy M., Coskun T., Namlı K., Var A., Cızyurt B. The effects of L-Arginine on liver damage in experimental acute cholestasis an immunohistochemical study // HPB Surgery. – 2011. – 2011. – P. 1–5.
- Wu G., Bazer F.W., Davis T.A., Kim S.W., Li P., Marc Rhoads J., Carey Satterfield M., Smith S.B., Spencer T.E., Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease // Amino Acids. – 2009. – 37, №1. – P.153–168.
- Zhao X., Suo Y. LC determination of amino acids in rat plasma with fluorescence detection: Application to exercise physiology // Chromatography. – 2008. – 67. – P.375–382.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: yanchuk49@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 08.01.2013

Е.О. Асанов, Є.Д. Осьмак, Л.А. Кузьмінська

Особливості реакції симпатoadреналової системи на психоемоційне напруження при гіпоксії у людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням дихальної системи

Вивчено особливості реакції симпатoadреналової системи на психоемоційний і гіпоксичний стрес у практично здорових молодих людей, а також у людей похилого віку з фізіологічним та прискореним старінням дихальної системи. Показано, що при старінні розвивається більш виражена реакція симпатoadреналової системи на психоемоційний стрес. Водночас у людей похилого віку з різним типом старіння дихальної системи не розрізняється реакція симпатoadреналової системи на психоемоційний стрес. У людей похилого віку комбінація психоемоційного та гіпоксичного стресу активує симпатoadреналову систему. При цьому у людей похилого віку із прискореним старінням дихальної системи реакція симпатoadреналової системи більш виражена.

Ключові слова: симпатoadреналова система, гіпоксія, психоемоційний стрес, прискорене старіння.

ВСТУП

Основну роль у регуляції функції, обміну речовин і адаптації організму відіграє центральна нервова система (ЦНС) [9, 11, 14]. З віком виникають характерні морфофункціональні її зміни [9, 12, 13]. Дослідження, виконані в Інституті геронтології, свідчать, що при старінні знижується еластичність і розтягненість судин головного мозку, а також мозкова гемодинаміка. Так, вивчення стану мозкової гемодинаміки радіоізотопним методом за кліренсом ^{133}Xe продемонструвало етапне зниження мозкового кровотоку при старінні [6]. Вікові зміни ЦНС визначають обмеження пристосувальних можливостей організму людей похилого віку, зниження його фізичної продуктивності та розумової працездатності. З віком погіршується концентрація, увага, знижується пам'ять, кількість інформації, яка сприймається. З іншого боку, за думкою Фролькіса [9], це компенсується розвитком логічної пам'яті, підвищенням мо-

тиваційних фактів, смисловою організацією матеріалу, використанням досвіду. Розвиток змін ЦНС при старінні створює передумови для зниження стійкості до психоемоційного стресового впливу [1, 9, 13, 15]. Результати клініко-фізіологічних і клінічних досліджень показують, що здорові люди похилого віку більш чутливі до психоемоційного стресу [1]. У них підвищується периферичний судинний опір і артеріальний тиск [9, 15, 18].

Залежно від темпу, розрізняють фізіологічне та прискорене старіння [5]. Особливістю прискореного старіння є більш значне обмеження пристосувальних можливостей організму [5]. При такому старінні посилюються гіпоксичні зрушення, знижується стійкість організму до гіпоксії, розвивається виражене обмеження пристосувальних його механізмів [4, 5]. Це різко обмежує резервні можливості функціонування органів і систем, а також створює передумови для розвитку різних захворювань, та їх важкого перебігу.

У розвитку процесів старіння, особливо прискореного, значну роль відіграє гіпоксія [4]. З іншого боку, вік суттєво впливає на здатність організму пристосовуватися до гіпоксії [4, 5]. При цьому важливим фактором формування адаптаційної реакції на гіпоксію є симпатoadреналова система [10, 15]. Вона відіграє головну роль у адаптації до стресу, в т.ч. і до гіпоксичного. Це було відмічено ще Г. Сельє в 1952 р. Збудження симпатoadреналової системи при стресі є початковим ланцюгом реакції організму [15].

Зміни симпатoadреналової системи при старінні виступають як головний механізм вікових порушень адаптації до різних факторів, у тому числі і до гіпоксії, і до психоемоційного стресу [14, 15, 19]. Раніше нами було показано, що при старінні розвивається більш виражена реакція симпатoadреналової системи на гіпоксичний стрес [3]. Однак складні та важливі симпатoadреналові механізми адаптації до психоемоційного стресового впливу в умовах гіпоксії в похилому віці вивчені недостатньо.

Мета роботи – дослідити особливості реакції симпатoadреналової системи на психоемоційний стресовий вплив в умовах гіпоксії у людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням.

МЕТОДИКА

Обстежено 25 молодих (20–29 років) і 35 практично здорових людей похилого віку (60–74 роки) з фізіологічним (17 чоловік) і прискореним (18 чоловік) старінням дихальної системи. Усі особи були без патології серцево-судинної, дихальної, ендокринної та інших систем організму. Участь в обстеженні була добровільною.

Функціональний вік системи дихання визначали за спірографічними показниками з допомогою розробленої нами формули на спірографі “Spirobank” (“Mir”, Італія):

для чоловіків:

$$\text{ФВДС} = 96,3 - 0,3 \times (\text{MVV} - \text{VE}) - 11,3 \times$$

$$\text{ERV} - 3 \times \text{IRV} - 2,5 \times \text{MEF}_{25\%-75\%}$$

для жінок:

$$\text{ФВДС} = 91 - 0,123 \times (\text{MVV} - \text{VE}) - 26,4 \times$$

$$\text{ERV} - 4,5 \times \text{IRV} - 4 \times \text{MEF}_{25\%-75\%}$$

де: ФВДС – функціональний вік дихальної системи; MVV – VE – резерв дихання, л/хв; VE – хвилинний об’єм дихання, л/хв; MVV – максимальна вентиляція легень, л/хв; ERV – резервний об’єм видиху, л; IRV – резервний об’єм вдиху, л; MEF_{25%-75%} – середній видихуваний потік, л/с.

При цьому прискорено старіючими людьми похилого віку вважали тих, у кого функціональний вік системи дихання перевищував паспортний більше ніж на 10 років [4]. Стан нормобаричної гіпоксії викликали вдиханням газової суміші зі зниженим вмістом кисню (12 % O₂ і 88 % N₂) протягом 20 хв. Упродовж 5 хв дихання повітрям, 20 хв дихання гіпоксичною сумішшю і 5 хв після переходу на дихання повітрям реєстрували сатурацію крові (SpO₂) і частоту серцевих скорочень (ЧСС), які визначали за допомогою монітора ЮМ-300 фірми “ЮТАС” (Україна) пульсоксиметричним методом. У вихідному рівні, на 7-й хвилині психоемоційного стресового напруження при диханні повітрям та на 20-й хвилині гіпоксії оцінювали стан симпатoadреналової системи.

Для відтворення стану психоемоційного напруження використовували лабораторну модель – комп’ютерне завдання вибору, яке адекватне для відтворення цього стану і є легко виконуваною для людей будь-якого віку [7].

Стан симпатoadреналової системи оцінювали за концентрацією катехоламінів у плазмі крові – адреналіну, норадреналіну, яку визначали окисленням і наступною флуоресценцією з допомогою спектрофлуориметра “MPF” (“Hitachi”, Японія) [17].

Вегетативну регуляцію вивчали за аналізом варіабельності ритму серця (ВРС) за допомогою монітора фірми “ЮТАС”, у відповідності з міжнародними стандартами [16]. Для дослідження хвильової структури

серцевого ритму розраховували спектр потужності, що базувався на швидкому перетворенні Фур'є, а також потужність компонент серцевого ритму в двох діапазонах частот: 0,15–0,4 Гц (високочастотні коливання, HF), 0,04–0,15 Гц (низькочастотні коливання, LF). Розрахунок спектра проводили для 5-хвилинного запису RR-інтервалів. Загальновідомо, що потужність HF-коливань відображає парасимпатичну активність, потужність LF-коливань – барорефлекторну активність, а відношення LF/HF є показником симпатовагального балансу.

Статистичну обробку результатів виконано за допомогою програми Statistica 6.0 («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів показав, що концентрація норадреналіну в крові молодих людей була дещо вищою, ніж у людей похилого віку. При цьому вміст у крові адреналіну з віком суттєво не змінювався (табл. 1). Отримані результати про вікові зміни вмісту катехоламінів збігаються з даними інших дослідників, а також з проведеними нами раніше дослідженнями [3, 8, 10, 13].

У вихідному стані у людей похилого віку з різним типом старіння показники симпатoadреналової системи не відрізнялися. Про це свідчить відсутність у них різниці вмісту катехоламінів у крові, а також аналіз спектральних показників ВРС. Окрім того, не було виявлено різниці у показниках центральної гемодинаміки (ЧСС, АТ; табл. 2).

Психоемоційний стрес, як показав аналіз проведених досліджень, викликав типову універсальну реакцію усіх пацієнтів, зумовлену активацією симпатoadреналової системи (див. табл. 1). Відбувалося викидання у кров гормонів надниркових залоз, про що свідчить підвищення вмісту катехоламінів у крові. Однак у молодих людей підвищення концентрації адреналіну було хоча і достовірним, але незначним. При цьому вміст норадреналіну

у них не змінився. У людей похилого віку збільшувалася концентрація як адреналіну, так і норадреналіну (див. табл. 1).

Наслідком реакції на психоемоційний стрес також було підвищення симпатичної активності в усіх обстежених, як видно з аналізу ВСР. При цьому підвищувався симпатовагальний індекс HF/LF – показник, що відображає активність симпатичного відділу вегетативної нервової системи (див. табл. 1). Загалом у людей похилого віку зсув HF/LF був більший порівняно з молодими людьми, а в групах людей похилого віку з фізіологічним та прискореним старінням дихальної системи зсув симпатовагального індексу не розрізнявся (див. табл. 2).

Реакція симпатoadреналової системи на психоемоційний стрес проявлялася збільшенням ЧСС як у молодих, так і у людей похилого віку (див. табл. 1). Зсув показників центральної гемодинаміки був однаковим у людей похилого віку з різним типом старіння дихальної системи (див. табл. 2). Водночас у молодих людей психоемоційний стрес викликає деяке збільшення ЧСС, без змін АТ. Виявлені вікові відмінності реакції системної гемодинаміки на психоемоційний вплив, зумовлені, ймовірно, тим, що для літніх людей психоемоційне навантаження є великим стресом.

При вдиханні 12 % кисню, у молодих людей психоемоційне навантаження не призводило до подальшої активації симпатoadреналової системи. Доказом цього є відсутність відмінностей між зсувами вмісту катехоламінів у крові під час психоемоційного стресу в умовах дихання повітрям і в поєднанні психоемоційного і гіпоксичного стресу. Слід зазначити, що діяльність симпатичного відділу вегетативної нервової системи молодих людей при поєднанні психоемоційного і гіпоксичного стресу порівняно лише з психоемоційним стресом при диханні повітрям, також залишилась незмінною. Комбінований вплив психоемоційного і гіпоксичного стресу не викликав змін ЧСС і АТ серед молоді (див. табл. 1).

Навпаки, у людей похилого віку комбінований вплив психоемоційного і гіпоксичного стресу призводив до ще більш вираженої реакції симпатoadреналової системи (див. табл.

1). Однак слід зазначити, що у людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи, реагування симпатoadреналової системи на комбінований стрес було більш

Таблиця 1. Середні показники симпатoadреналової системи і центральної гемодинаміки у здорових людей молодого і похилого віку при психоемоційному (ПЕН) і гіпоксичному напруженні

Показник	Молоді люди	Люди похилого віку
Сатурація крові, %		
вихідний рівень	98,64±0,14	95,82±0,17**
за умов гіпоксії	84,16±0,49	77,72±0,51*,**
зсув	-14,48±0,24*	-18,07±0,19*,**
Адреналін, нмоль/л		
вихідний рівень	0,48±0,06	0,49±0,05
за умов ПЕН	0,79±0,08	1,22±0,11**
Δ за умов ПЕН	0,32±0,09*	0,74±0,09*,**
за умов ПЕН та гіпоксії	0,89±0,10	1,68±0,14**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	0,42±0,08*	1,20±0,11*,**,**
Норадреналін, нмоль/л		
вихідний рівень	0,62±0,08	0,30±0,06**
за умов ПЕН	0,72±0,11	0,83±0,08
Δ за умов ПЕН	0,11±0,07	0,54±0,07*,**
за умов ПЕН та гіпоксії	0,78±0,13	1,22±0,09**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	0,16±0,09	0,90±0,14*,**,**
LF/HF		
вихідний рівень	1,07±0,08	1,37±0,08**
за умов ПЕН	1,26±0,12	1,89±0,17**
Δ за умов ПЕН	0,19±0,08*	0,61±0,08*,**
за умов ПЕН та гіпоксії	1,32±0,12	2,57±0,15**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	0,25±0,10*	1,23±0,09*,**,**
Систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
вихідний рівень	117,71±5,24	131,55±6,41
за умов ПЕН	118,52±4,36	140,42±5,23**
Δ за умов ПЕН	0,83±0,59	8,52±1,44*,**
за умов ПЕН та гіпоксії	122,61±3,45	151,67±5,45**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	3,78±1,85	19,48±3,26*,**,**
Діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
вихідний рівень	72,33±2,45	78,24±3,11
за умов ПЕН	73,05±3,74	84,55±3,26
Δ за умов ПЕН	0,73±0,54	6,31±1,22*,**
за умов ПЕН та гіпоксії	74,45±2,77	89,79±3,12**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	2,10±1,53	11,58±1,84*,**,**
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹		
вихідний рівень	67,25±2,55	70,36±2,78
за умов ПЕН	73,90±2,81	77,76±2,35
Δ за умов ПЕН	6,68±1,57*	7,37±1,44*
за умов ПЕН та гіпоксії	74,47±2,29	88,54±2,58**
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	7,24±1,46*	18,21±2,12*,**,**

Примітка. Тут і в табл. 2. *P<0,05 – зсуви достовірні; **P<0,05 – порівняно з молодими людьми; ***P<0,05 – порівняно зі зсувами при психоемоційному напруженні; LF – низькочастотні коливання; HF – високочастотні коливання, LF/HF – симпатовагальний індекс.

виражено. Свідченням цього є виражені зміни в крові концентрації катехоламінів, а також зсуви симпатовагального індексу у людей

похилого віку з прискореним старінням дихальної системи (див. табл. 2).

Збільшення концентрації гормонів стресу

Таблиця 2. Середні показники симптоадреналової системи і центральної гемодинаміки у людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням дихальної системи при психоемоційному (ПЕН) і гіпоксичному напруженні

Показник	Фізіологічне старіння	Прискорене старіння
Сатурація крові, %		
вихідний рівень	96,58±0,21	94,95±0,19 ^{*,**,*}
за умов гіпоксії	80,11±0,25	76,71±0,27 ^{*,**}
зсув	-16,53±0,13	-18,32±0,13 ^{*,**,*}
Адреналін, нмоль/л		
вихідний рівень	0,50±0,07	0,49±0,06
за умов ПЕН	1,22±0,14	1,23±0,12
Δ за умов ПЕН	0,73±0,08 [*]	0,75±0,11 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	1,64±0,12	2,16±0,13 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	1,14±0,08 ^{*α}	1,68±0,10 ^{*,**,*}
Норадреналін, нмоль/л		
вихідний рівень	0,32±0,11	0,29±0,08
за умов ПЕН	0,84±0,13	0,81±0,12
Δ за умов ПЕН	0,53±0,07 [*]	0,51±0,08 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	1,16±0,12	1,73±0,12 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	0,85±0,08 [*]	1,44±0,14 ^{*,**,*}
LF/HF		
вихідний рівень	1,33±0,12	1,41±0,11
за умов ПЕН	1,87±0,14	1,95±0,18
Δ за умов ПЕН	0,54±0,07 [*]	0,55±0,12 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	2,22±0,13	2,94±0,14 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	0,90±0,07 ^{*α}	1,55±0,10 ^{*,**,*}
Систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
вихідний рівень	132,24±5,75	129,58±6,23
за умов ПЕН	141,55±5,17	139,64±5,48
Δ за умов ПЕН	9,31±1,23 [*]	9,95±1,48 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	140,72±4,34	158,81±4,21 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	8,45±1,19	29,25±2,49 ^{*,**,*}
Діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
вихідний рівень	77,76±3,23	78,68±3,13
за умов ПЕН	84,72±3,31	85,15±3,18
Δ за умов ПЕН	6,94±1,22 [*]	6,45±1,41 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	74,45±2,77	89,79±3,12 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	2,10±1,53	11,58±1,84 ^{*,**,*}
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹		
вихідний рівень	70,16±2,56	70,52±2,49
за умов ПЕН	77,25±1,97	77,86±2,12
Δ за умов ПЕН	7,10±1,24 [*]	7,38±1,52 [*]
за умов ПЕН та гіпоксії	84,21±2,34 [#]	86,17±2,45 ^{**}
Δ за умов ПЕН та гіпоксії	14,04±0,21 [*]	15,66±0,32 ^{*,**,*}

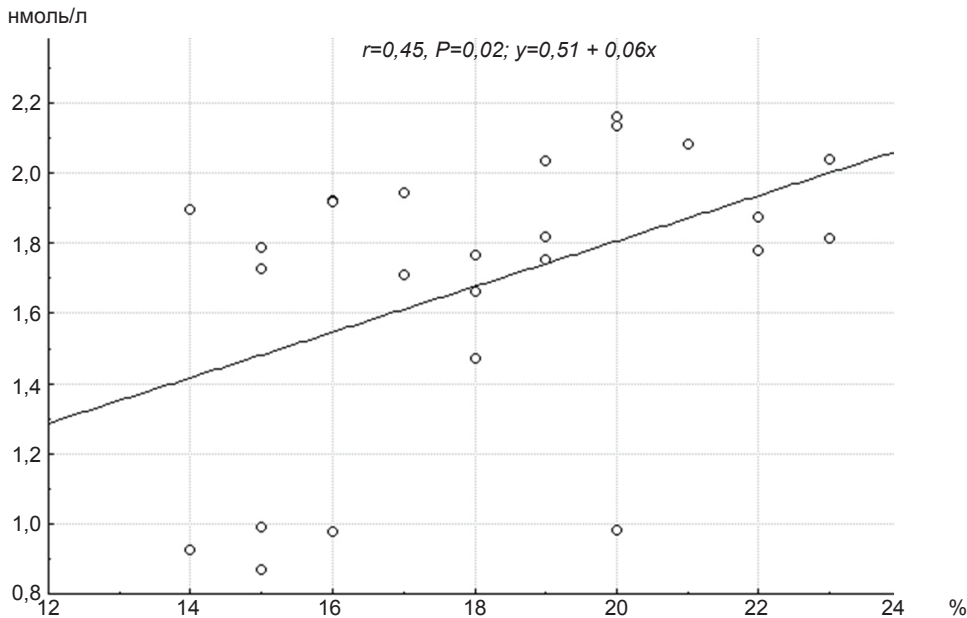
Примітка. Тут і в табл. 2. *P<0,05 – зсуви достовірні; **P<0,05 – порівняно з молодими людьми; ***P<0,05 – порівняно зі зсувами при психоемоційному напруженні; LF – низькочастотні коливання; HF – високочастотні коливання, LF/HF – симпатовагальний індекс.

в крові при комбінованому стресі призводить до компенсаторної реакції з боку серцево-судинної системи – збільшується ЧСС і кров'яний тиск у людей похилого віку. Вказані зміни спрямовані на централізацію гемодинаміки та забезпечення киснем життєво важливих органів, особливо мозку в умовах стресу [2, 11, 14].

Окреме обстеження людей похилого віку з фізіологічним та прискореним старінням дихальної системи показало, що реакція ЧСС і АТ на комбінований стрес у людей похилого віку з прискоренням старінням дещо більша.

Відмінності реакції симпатoadреналової системи і центральної гемодинаміки у людей похилого віку з різним типом старіння дихальної системи на комбінований психоемоційний і гіпоксичний стрес, зумовлені, ймовірно, у людей похилого віку з прискореним старінням більш вираженою артеріальною гіпоксемією та значною стрес-реакцією на неї. Дійсно, при диханні 12%-м киснем зниження сатурації крові киснем у людей похилого віку з прискореним старінням системи дихання, було більш виражене порівняно з

фізіологічно старіючими людьми. Водночас, незважаючи на більш виражену реакцію симпатoadреналової системи, у людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи відповідь ЧСС на комбінований стрес все ж недостатня. Про це свідчать відсутність розбіжностей серед людей похилого віку з прискореним старінням (у порівнянні з фізіологічно старіючими людьми) значень співвідношень $\Delta\text{ЧСС}/\Delta\text{SpO}_2$, яке відображає відповідь ЧСС на одиницю зсуву сатурації ($0,85 \pm 0,10$ у фізіологічно і $0,84 \pm 0,07$ у прискорено старіючих людей). Справді, зменшення сатурації при гіпоксичному стресі у людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи більше. Тому і реакція ЧСС у них повинна бути більша. Однак, як видно, це не спостерігається. Крім того, загалом у групі людей похилого віку встановлена залежність між зсувами вмісту в крові концентрації адреналіну і сатурацією ($r = 0,45$, $P = 0,02$) при психоемоційному стресі в умовах вдихання гіпоксичної газової суміші. Рисунок показує майже лінійне збільшення вмісту в крові адреналіну у людей похилого



Взаємозв'язок зрушень вмісту адреналіну у крові від сатурації крові при диханні 12 % O₂ протягом 20 хв у людей похилого віку

віку, коли зменшується сатурація крові під час впливу психоемоційного стресу при вдиханні гіпоксичної суміші. І, як видно з рисунка, у більшості людей похилого віку зсув вмісту адреналіну у крові при комбінованому стресі перевищував 1,5 нмоль/л.

Виявлені зміни вмісту катехоламінів у крові в умовах комбінованого стресу вказують на зниження стійкості до стресових чинників (гіпоксія, психоемоційне напруження) у людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи і спрямовані на підвищення стійкості до гіпоксії і психоемоційного стресу. Збільшення секреції катехоламінів при гіпоксичному та психоемоційному впливі викликають адаптацію організму на клітинному та органному рівні [12].

ВИСНОВКИ

1. Реакція симпатoadреналої системи у людей молодого та похилого віку у відповідь на психоемоційний стрес проявляється викидом стрес-гормонів (катехоламінів). При старінні ця реакція більш виражена.

2. У літніх людей з різним типом старіння дихальної системи реакція симпатoadреналої системи не відрізняється на дію психоемоційного стресу.

3. Поєднання психоемоційного та гіпоксичного стресу у людей похилого віку призводить до подальшої активації симпатoadреналої системи, яка у осіб з прискореним старінням дихальної системи більш виражена.

4. У людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи реакція ЧСС на комбінований стрес більш слабка порівняно з людьми похилого віку з фізіологічним старінням, незважаючи на більш виражену реакцію симпатoadреналої системи.

5. Відмічено зв'язок між проявами артеріальної гіпоксемії та реакцією симпатoadреналої системи під час психоемоційного стресу в умовах гіпоксії у людей похилого віку.

Э.О. Асанов, Е.Д. Осьмак, Л.А. Кузьминская

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ СИМПАТОАДРЕНАЛОВОЙ СИСТЕМЫ НА ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ НАПРЯЖЕНИЕ ПРИ ГИПОКСИИ У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ И УСКОРЕННЫМ СТАРЕНИЕМ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Изучены особенности реакции симпатoadреналої системы на психоемоциональный и гипоксический стресс у практически здоровых молодых людей, а также у пожилых людей с физиологическим и ускоренным старением дыхательной системы. Показано, что при старении развивается более выраженная реакция симпатoadреналої системы на психоемоциональный стресс. В то же время у пожилых людей с различным типом старения дыхательной системы не различается реакция симпатoadреналої системы на психоемоциональный стресс у людей пожилого возраста, в отличие от молодых людей, сочетание психоемоционального и гипоксического стресса приводит к дальнейшей активации симпатoadреналої системы. При этом у пожилых людей с ускоренным старением дыхательной системы реакция симпатoadреналої системы более выражена.

Ключевые слова: симпатoadреналої система, гипоксия, психоемоциональный стресс, ускоренное старение.

E.O. Asanov, E.D. Osmak, L.A. Kuzminskaya

PECULIARITIES OF THE RESPONSE OF THE SYMPATHOADRENAL SYSTEM TO PSYCHOEMOTIONAL STRESS UNDER HYPOXIC CONDITIONS IN AGED PEOPLE WITH PHYSIOLOGICAL AND ACCELERATED AGING OF RESPIRATORY SYSTEM

The peculiarities of the response of the sympathoadrenal system to psychoemotional and hypoxic stress in healthy young people and in aged people with physiological and accelerated aging of respiratory system were studied. It was shown that in aging a more pronounced response of the sympathoadrenal system to psychoemotional stress. At the same time, elderly people with different types of aging of the respiratory system did not demonstrate a difference in the response of the sympathoadrenal system to psychoemotional stress. Unlike in young people, in aged people, combination of psychoemotional and hypoxic stresses resulted in further activation of the sympathoadrenal system. The reaction of the sympathoadrenal system was more expressed in elderly people with accelerated ageing of the respiratory system.

Key words: sympathoadrenal system, hypoxia, psychoemotional stress, accelerated aging.

Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Kyiv.

V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism NAMS of Ukraine, Kyiv.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк-Щеглова І. А., Шатило В. Б., Турта М. І. Надмірна реакція артеріального тиску при дозованій психоемоційній пробі як предиктор розвитку серцево-судинної патології у людей літнього віку // Пробл. старення и долголетия. – 2007. – 16, №4. – С. 371–376.
2. Демченко И. Т. Кровоснабжение бодрствующего мозга. – Л.: Наука, 2007. – 174 с.
3. Коркушко О.В., Асанов Э.О., Писарук А.В., Беликова М.В. Реакция симпатoadреналовой системы на гипоксический стресс у пожилых людей // Пробл. старення и долголетия. – 2007. – №1. – С. 3–10.
4. Коркушко О.В., Асанов Э.О., Писарук А.В., Чеботарев Н.Д. Изменения газообмена в легких при гипоксии у пожилых людей с физиологическим и ускоренным старением дыхательной системы // Укр. пульмонол. журн. – 2010. – №1. – С. 54–56.
5. Коркушко О.В., Шатило В.Б., Ярошенко Ю.Т. Передчасне старіння: фактори ризику, діагностика, засоби попередження, метаболічна терапія : Бібліотечка практикуючого лікаря. – К: Тов. ДСГ Лтд, 2003. – 52 с.
6. Лизогуб В.Г. Регионарный мозговой кровоток при старении и церебральном атеросклерозе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 1978. – 28 с.
7. Поляков О.А., Прокопенко Р.О., Писарук А.В. Автоматизована система оцінки психофізіологічного забезпечення трудової діяльності працюючих осіб старшого віку : Метод. Рекомендації. – К., 2007. – 15 с.
8. Сато А. Симпатическая регуляция функции мозгового слоя надпочечников при старении // Физиол. журн. – 1990. – 36, № 5. – С.94–99.
9. Фролькис В.В. Старение мозга. – Л.: Наука, 1991. – 227 с.
10. Фролькис В.В. О нейрогуморальной регуляции функции при старении организма // Весн. АМН СССР. – 1963. – С. 70–76.
11. Bedi M., Varshney V. P., Babbar R. Role of cardiovascular reactivity to mental stress in predicting future hypertension // Clin. Exp. Hypertens. – 2000. – 22, № 1. – P. 1–22.
12. Esler M.D., Thompson J.M., Kaye D.M., Turner A.G., Jennings G.L., Cox H.S., Lambert G.W., Seals D.R. Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors // Circulation. – 1995b. – 91, № 2. – P. 351–358.
13. Odio M., Brodish A. Age-related adaptation of pituitary-adrenocortical responses to stress // Neuroendocrinology. – 1989. – 49, № 4. – P. 382–388.
14. Freyschuss U., Fagius J., Wallin B.G., Bohlin G., Perski A., Hjendahi P. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to mental stress: a study of sensory intake and rejection reactions // Acta phisiol. scand. – 1990. – 139, № 1. – P. 173–183.
15. Frolkis V.V. Stress-age syndrome. [Review] [44 refs] Mechanisms of Ageing & Development. – 1993. – № 69(1–2). – P. 93–107.
16. Heart rate variability. Standart of measurement, physiological, and clinical use. Task Force of European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology // Europ.Heart J. – 1996. – 17. – P. 354–381.
17. Jacobwith P.M., Richardson J.S. Method for the rapid determination of norepinephrin, dopamine, serotonin, in the same brain region// Pharmacol. Biochem. Behavior. – 1979. – 8, № 5. – P. 515–519.
18. Raininko R., Autti T., Vanhanen S.I. The normal brain stem from infancy to old age. A morphometric MRI study // Amer. J. Neuroradiol. – 2000. – 36. – P. 364–368.
19. Steptoe A., Cropley M. Persistent high job demands and reactivity to mental stress predict future ambulatory blood pressure // J. Hypertens. – 2000. – 18, № 5. – P. 581–586.

ДУ «Ін-т геронтології НАМН України», Київ;

ДУ «Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка

НАМН України», Київ

E-mail: eoasanov@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 18.06.2012

В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, Р.В. Янко

Вплив зміненого парціального тиску кисню на остеометричні показники кісткової тканини щурів

Досліджували вплив зміненого парціального тиску кисню на остеометричні та біохімічні показники кісткової тканини. Встановлено, що перебування 12-місячних щурів в умовах зміненого газового середовища вірогідно не впливає на масу, загальну довжину, сагітальний діаметр і щільність стегнових кісток. Спостерігали підвищення активності лужної та зниження тартратрезистентної кислоти фосфатази після дії дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня. Вплив нормобаричної гіпероксії (40 і 90 % O_2), навпаки, пригнічував активність лужної і стимулював активність тартратрезистентної кислоти фосфатази.

Ключові слова: парціальний тиск кисню, регенерація кісткової тканини.

ВСТУП

Кісткова тканина хребетних – один із різновидів сполучної тканини, яка має поліфункціональне призначення. В онтогенезі кожного виду ссавців відбувається генетично зумовлений процес закладання хрящового скелета, поступове насичення його мінеральними компонентами та формування дефінітивної тканини. Остання складається із клітинних елементів (остеобласти, остеокласти) і міжклітинної субстанції (колаген та аморфна речовина). Найбільш специфічний фермент остеобластів – лужна фосфатаза (ЛФ). Саме вона визначає кісткоутворювальну роль цих клітин у мінералізації кісткового матриксу. Остеокласти – це багатоядерні клітини значних розмірів, які резорбують кістку за допомогою лізосомальних ферментів (кисла і тартратрезистентна кислота фосфатази (ТРКФ)), розчиняючи солі й руйнуючи матрикс [6, 11, 13].

В умовах сучасного дефіциту навантаження починається повільна деградація кісткової тканини, яка депонує 99 % всього запасу кальцію в організмі людини. Кінцевим проявом цього процесу стають донозологічні форми зменшення кісткової маси (остеодефіцитні

стану) [5, 10, 12]. Втрата її частини зумовлює послаблення біомеханічних властивостей, зниження міцності та підвищення загрози переломів кісток. Варто зауважити, що ці зміни знаходяться в межах індивідуальних фізіологічних варіацій і майже не діагностуються. Тому надзвичайно актуальним є пошук шляхів і методів корекції процесів остеогенезу та ремоделювання кісткової тканини. Важливим і перспективним шляхом профілактики патології скелета може бути вплив керованого газового середовища.

З літературних джерел відомо, що парціальний тиск кисню (PO_2) є одним із суттєвих факторів, що впливає на функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його систем, тканин і клітин, у тому числі й кісткових [3, 6, 7, 15, 16, 17, 19]. Помірно знижений PO_2 , як неспецифічний стимулятор метаболізму кісткової тканини, сприяє відновленню взаємодії органічного і неорганічного матриксу, нормалізації щільності кістки. При цьому опосередковано через активацію індукованого гіпоксією фактора 1 та через дію паратиреоїдного гормону стимулює діяльність остеобластів [18]. Однак за іншими даними в експериментах *in vitro* в

культури остеобластів максимальний остеогенез спостерігали у газовому середовищі із 35 % O₂, тобто в стані помірної нормобаричної гіпероксії [16]. Отримані літературні дані про вплив зміненого P_{O₂} на процеси фізіологічної регенерації скелета не тільки нечисленні, але й часто суперечливі і залежать від умов проведення експериментів. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив зміненого P_{O₂} на остеометричні показники кісткової тканини.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано протягом 28 діб на 35 щурах-самцях лінії Вістар віком 12 міс. Газову суміш (ГС) подавали у герметичну камеру в таких режимах: I – контроль (атмосферне повітря – 21 % O₂); II – ГС із 10 % O₂ безперервно протягом 30 хв; III – ГС із 10 % O₂ переривчасто 10/30 (10 хв деоксигенації з наступним періодом реоксигенації 30 хв протягом 3 циклів); IV і V – ГС із 40 або 90 % O₂ відповідно протягом години. Щури контрольної і експериментальних груп мали вільний доступ до води та корму ad libitum [4]. Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом. Усі досліди здійснювали з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Матеріалом для досліджень були стегнові кістки щурів і сироватка крові, які одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Остеометричні показники визначали таким чином: стегнові кістки зважували у дистильованій воді та у повітрі на торсійних вагах з межею визначення 500 мг і точністю до 1 мг. Об'єм зразків розраховували за формулою: $V = (M_{\text{у повітрі}} - M_{\text{у воді}})/d$, де d – густина води, що дорівнює 0,996 при 20°C, M – маса зразка. Розраховували щільність кісток за формулою $P=M/V$, де M – маса зразка, V – об'єм. Вимірювали загальну довжину стегнової кістки (відстань від голівки кістки до площини, що проходить через

найнижчі точки латерального та медіального мишелків) і сагітальний діаметр середини діафіза стегнової кістки [2].

Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини досліджували спектрофотометричним методом. У сироватці крові визначали активність ЛФ (фірма “Лахема”, Чехія), ТРКФ (фірма “Лахема”, Чехія) за стандартними наборами реактивів.

Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію t Стьюдента. Для визначення корелятивних зв'язків між окремими показниками використовували коефіцієнт r і методи кореляційно-регресійного аналізу [9]. Інтегральний індекс фосфатаз (ІФ) розраховували за формулою: $ІФ=ЛФ/ТРКФ$. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення “Origin 7,5”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маса стегнових кісток контрольних щурів становила 614,7 мг ± 69,6 мг. Відносний приріст виявлено тільки у тварин II групи на 8 % порівняно з контролем після впливу ГС із 10 % O₂ (таблиця). У тварин III–V груп цей показник лише мав тенденцію до зниження. Загальна довжина та сагітальний діаметр стегнових кісток у контрольних щурів дорівнювали 39,2±1,7 і 3,8 мм ± 0,6 мм відповідно. Ці показники не змінювалися у всіх інших експериментальних тварин. Вірогідне зростання щільності стегнових кісток на 5 % ($P<0,05$) спостерігали лише після впливу нормобаричної гіпоксії (10 % O₂) в переривчастому режимі порівняно з контролем. Таким чином, змінене газове середовище не впливає на ріст стегнових кісток 12-місячних щурів.

Відомо, що кістки ростуть нерівномірно протягом онтогенезу. У молодих тварин закономірно відбувається активна мінералізація кісткової тканини, комбінування росту кісток у довжину і ширину, характерне для цього вікового періоду, формування кісткової маси. Водночас у дорослих тварин темпи приросту маси тіла та формування й руйнування кі-

Остеометричні показники стегнових кісток контрольних і дослідних 12-місячних щурів ($M \pm m$, $n=7$)

Група тварин	Маса, мг	Загальна довжина,	Сагітальний діаметр,	Щільність, мг/мм ³
		мм	мм	
Контроль	614,7±69,6	39,2±1,7	3,8±0,6	1,5±0,1
Гіпоксія				
I режим	661,6±99,5	40,1±1,7	3,7±0,5	1,5±0,1
II режим	595,4±90,8	39,5±1,3	3,6±0,5	1,6±0,1*
Гіпероксія				
40 % O ₂	592,9±63,2	40,7±1,2	3,8±0,2	1,4±0,1
90 % O ₂	584,0±79,3	40,0±1,2	3,7±0,2	1,5±0,1

* $P < 0,05$ – порівняно з контролем.

сткової тканини зазвичай врівноважені [4]. Багатоклітинні агрегати, які складаються з остеокластів і остеобластів, діють скоординовано, формуючи нові структурні елементи трабекулярної або кортикальної кістки. Резорбція і формування при ремоделюванні йдуть паралельно і як наслідок відбувається заміна невеликих об'ємів старої кістки на нову. Структура останньої визначається умовами, в яких відбувається цей процес [11, 13, 14].

Дослідження активності ЛФ і ТРКФ для функціонального стану кісткової тканини інформативне, оскільки ці ферменти продукуються остеобластами (ЛФ) і остеокластами (ТРКФ). Активність ЛФ у сироватці крові контрольних щурів становила 38,2 МО/л \pm 3,6 МО/л. Зниження P_{O_2} у вдихуваному повітрі вірогідно збільшувало активність цього ферменту. Так, після впливу 30-хвилинних безперервних щодобових сеансів ГС вона була вищою на 7 %, а після подачі ГС у переривчастому режимі 10/30 хв на 65 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями (рис. 1).

Кореляційний аналіз виявив сильний негативний зв'язок між активністю ЛФ і щільністю стегнових кісток ($r = -0,74$; рис. 2) після впливу ГС із 10 % O₂ 30 хв безперервно.

Дихання гіпероксичною ГС з O₂ 40 % призводило до зниження активності ЛФ на 43 % ($P < 0,05$), а при O₂ 90 % спостерігали лише тенденцію до зниження цього показника на 11% порівняно з контролем. Також нами був зафіксований сильний негативний зв'язок між активністю ЛФ і масою стегнових кісток

($r = -0,82$; рис. 3) після впливу ГС із 40 % O₂.

За даними Поворознюка та співавт. [8] синтез ЛФ підвищується під час процесу диференціювання остеобластів і прискореного кісткоутворення. Використовуючи дані спеціальної літератури припускаємо, що наслідком зафіксованого нами зростання активності ЛФ, ймовірно, може бути більш високий синтез колагену, що є додатковою умовою активного процесу формування кістки на клітинному рівні.

Зниження активності ЛФ у сироватці крові при диханні гіпероксичною ГС за нашими результатами, мабуть, свідчить про пригнічення процесу регенерації кісткової тканини, викликане підвищенням P_{O_2} у вдихуваній ГС. Поки достеменно не відомо, як ЛФ включається в мінералізацію кісткового матриксу. Lawtence [14] припускає, що дія цього ферменту може здійснюватися через

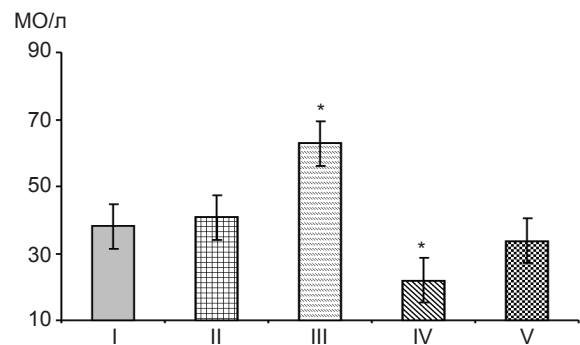


Рис. 1. Активність лужної фосфатази у сироватці крові контрольної (I) і дослідних груп щурів, які дихали газовою сумішшю (ГС): II – ГС із 10 % O₂ 30 хв безперервно, III – ГС із 10 % O₂ переривчасто 10/30 хв, IV – ГС із 40 % O₂, V – ГС із 90 % O₂. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

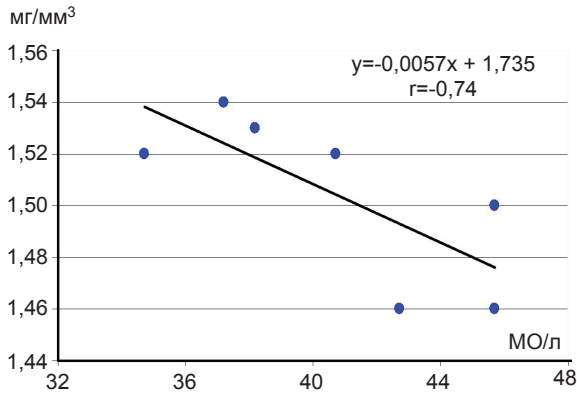


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між активністю лужної фосфатази і щільністю стегнових кісток 12-місячних щурів

підвищення місцевої концентрації іонів фосфору, відщеплення фосфатних груп від інших протеїнів, руйнуванням таких інгібіторів мінералізації, як пірофосфат.

ТРКФ утворюється в органелах остеокластів, транспортується у міжклітинне середовище і забезпечує резорбцію кістки. Активність ТРКФ у щурів контрольної групи становила $12,4 \text{ MO/l} \pm 1,1 \text{ MO/l}$. Спостерігали вірогідне зниження активності ферменту після впливу нормобаричної гіпоксії в обох досліджуваних режимах на 44 і 26 % відповідно (рис. 4). Зростання Po_2 у вдихуваному повітрі, навпаки, збільшувало активність ТРКФ; після впливу ГС із 40 % O_2 на 107 % ($P < 0,05$), а ГС із 90 % O_2 на 147 % ($P < 0,05$) порівняно з вихідними значеннями. Аврунін [1] вважає, що у фізіологічних умовах кількість ферментів регулюється тільки в межах необхідної резорбтивної діяльності клітин. Якщо активність лізосомальних ферментів збільшується, то у кістковій тканині виникають дефекти структури, спричинені неконтрольованою дією гідролаз. Тобто вплив нормобаричної гіпероксії (40 та 90 % O_2) призводить до інтенсифікації процесів резорбції кісткової тканини.

На підставі отриманих результатів був розрахований ІФ. Так, у контрольних груп він становив 3,08, після впливу 30 хв щодобових сеансів ГС із 10 % O_2 підвищився до 5,90 порівняно з контролем. У щурів, що

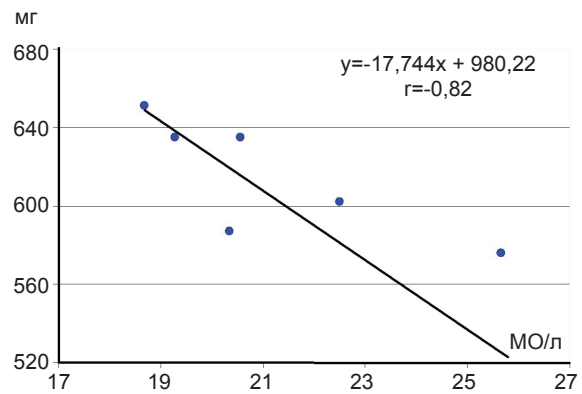


Рис. 3. Кореляційний зв'язок між активністю лужної фосфатази і масою стегнових кісток 12-місячних щурів

дихали ГС із 10 % O_2 в режимі 10/30 хв, він зріс до 6,85. Підвищення ІФ розцінюємо як показник процесу активного ремоделювання і мінералізації кісткової тканини в умовах помірно зниженого Po_2 . Дихання гіпероксичною ГС знижувало ІФ до 0,85 і 1,10 відповідно після впливу ГС із 40 або 90 % O_2 , що вказує на розбалансування процесів формування і резорбції кістки в умовах надлишку кисню.

Таким чином, змінений Po_2 впливає на біоенергетичні процеси, які відображають повноцінність органічного матриксу і його мінералізацію під час ремоделювання кісткової тканини. Отримані результати свідчать, що помірно знижений Po_2 створює умови для підвищення проліферації остеобластів, по-

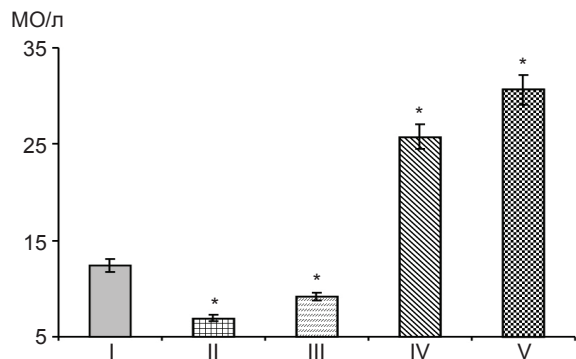


Рис. 4. Активність тартратрезистентної кислотої фосфатази у сироватці крові контрольної (I) і дослідних груп щурів, які дихали газовою сумішшю (ГС): II – ГС із 10 % O_2 30 хв безперервно, III – ГС із 10 % O_2 переривчасто 10/30 хв, IV – ГС із 40 % O_2 , V – ГС із 90 % O_2 груп щурів. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

силення формування зрілих полінуклеарних остеокластів і прискорення темпів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини. Тоді як підвищений PO_2 порушує нормальний перебіг остеогенезу з активацією темпів резорбції кістки, про що свідчить підвищення активності ТРКФ у сироватці крові.

В.А. Березовский, Т.М. Заморская, Р.В. Янко

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА ОСТЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС

Исследовали влияние измененного парциального давления кислорода на остеометрические и биохимические показатели костной ткани. Установлено, что пребывание 12-месячных крыс в условиях измененной газовой среды достоверно не влияет на массу, общую длину, сагиттальный диаметр и плотность бедренных костей. Наблюдалось повышение активности щелочной фосфатазы и снижение активности тартратрезистентной кислой фосфатазы после воздействия дозированной нормобарической гипоксии саногенного уровня. Влияние нормобарической гипероксии (40 и 90 % O_2), наоборот, угнетает активность щелочной и стимулирует активность тартратрезистентной кислой фосфатазы.

Ключевые слова: парциальное давление кислорода, регенерация костной ткани.

V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska, R.V. Yanko

THE EFFECTS OF OXYGEN PARTIAL PRESSURE CHANGES ON THE OSTEOMETRIC MARKERS OF BONE TISSUE IN RATS

Our purpose was to investigate the oxygen partial pressure changes on the osteometric and biochemical markers of bone tissue in rats. It was shown that breathing of altered gas mixture did not change the mass, general length, sagittal diameter and density thigh-bones in 12-month Wistar male-rats. The dosed normobaric hypoxia increased the activity of alkaline phosphatase and decreased the activity of tartrate-resistant acid phosphatase. At the same time normobaric hyperoxia with 40 and 90 % oxygen conversely decreased the activity of alkaline phosphatase and increased the activity of tartrate-resistant acid phosphatase.

Key words: oxygen partial pressure, bone regeneration.

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

*In-t фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: tanya_ztm@ukr.net*

ISSN 0201-8489 Фізіол. журн., 2013, Т. 59, № 2

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В., Емельянов В.Г. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани. – СПб: Ольга, 1998. – 68 с.
2. Алексеев В.П. Остеометрия. – М.: Наука, 1966. – С.148–152.
3. Жиронкин А.Г. Кислород. Физиологическое и токсическое действие. – Л.: Медицина, 1972. – 186 с.
4. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
5. Зацепин С.Т. Костная патология у взрослых // Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2001. – 640 с.
6. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – К.: ДП “Інформ.-аналіт. агентство”, 2011. – 243 с.
7. Петровский Б.В., Ефуня С.Н. Основы гипербарической оксигенации. – М.: Медицина, 1995. – 346 с.
8. Поворознюк В.В., Малишкіна С.В., Горідова Л.Д., Сторожук Л.М. Біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини // Проблеми остеології. – 1999. – 2, №4. – С. 4–14.
9. Радченко С.Г. Устойчивые методы оценивания статистических моделей: Монография. – К.: ПП “Санспарель”, 2005. – 504 с.
10. Романюк А.М., Гортинська О.М., Будко Г.Ю. Реакція кісткової тканини на негативні впливи фізичних та хімічних факторів зовнішнього середовища // Вісн. Сум. держ. ун-ту. Серія: Медицина. – 2002. – 14, №11 – С. 5–11.
11. Франке Ю., Рунге Г. Остеопороз / Пер. с нем. – М.: Медицина, 1995. – 304 с.
12. Шуба Н.М. Остеопороз – актуальная проблема XXI века: современное представление о патогенезе и терапии // Укр. ревматол. журн. – 2008. – 2, №3. – С. 5–14.
13. Dempster D.W. Ремоделирование кости. – В кн.: Остеопороз / Пер. с англ. – СПб: Бином, Невский диалект, 2000. – С.85–108.
14. Lawrence G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling // Clin. Chem. – 1999. – 45, № 8 (B). – P.1353–1358.
15. O’Driscoll S.W., Fitzsimmons J.S., Commisso C.N. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum // J. Orthop. Res. – 1997. – 15, №2. – P.682–687.
16. Tuncay O., Ho D., Barker M. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop. – 1994. – 105, №5. – P.457–463.
17. Wang Y., Wan C., Deng L., Liu X., Cao X., Gilbert S.R., Boussein M.L., Faugere M.C., Guldberg R.E., Gerstenfeld L.C., Haase V.H., Johnson R.S., Schipani E., Clemens T.L. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development // Clin. Invest. – 2007. – 117, № 6. – P.1616–1626.
18. Wang Y., Wan C., Gibbert S.R., Clemens T.L. Oxygen sensing and osteogenesis // Ann NY Acad. Sci. – 2007. – 111, № 7. – P.1–11.
19. West J. Respiratory Physiology – The Essentials. – Baltimore: London: Los Angeles: Williams and Wilking, 1982. – 196 p.

Матеріал надійшов до редакції 14.12.2012

Л.В. Гарманчук, О.М. Макаренко, Н.М. Храновська, Т.В. Ніколаєнко,
В.В. Нікуліна, Х.Д. Непийвода, Л.І. Остапченко, С.Г. Морозов, М.С. Косіцин

Мітокоректин стимулює ангиогенез *in vitro*

*Досліджували вплив мітокоректину (комплекс нативних олігопептидів, отриманих з мозку новонароджених свиней) на культуру ендотеліальних клітин. Показано, що засіб концентраційнозалежно індукує ангиогенез *in vitro*. За результатами МТТ-тесту та підрахунку клітин у камері Горяєва виявлено мітогенний ефект мітокоректину в концентраціях 0,1–1 мг/мл, який полягає в збільшенні кількості клітин на 25 % ± 5 %, а також зростанні субпопуляції клітин проліферативного пулу (G₂/M+S) в 1,8 рази в розведеннях мітокоректину від 0,01 до 0,05 мг/мл порівняно з контролем. На 3D-культурі клітин і в стаціонарному рості зафіксовано ефекти, що вказують на індукцію мітокоректином диференціювання ендотеліальних клітин: зниження продукції NO, підсилення метаболізму глюкози та формування капілярноподібних структур.*

Ключові слова: мітокоректин, ангиогенез, ендотеліальні клітини.

ВСТУП

Вивчення різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту залишаються актуальними. Відновлення ішемічного вогнища переважно залежить від функціонального стану багатьох органів і тканин [1, 3]. Важливою складовою лікування ішемічної хвороби є нормалізація васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії [8]. За нормальних умов гіпоксія, як вважають, виступає тригером проліферації клітин судинного ендотелію, і відновлення кровопостачання здійснюється індукцією проангіогенними факторами васкуляризації, але при патологічному стані цей процес порушується [10, 15]. Тому ендотеліальні клітини – одна з перспективних мішеней терапії таких захворювань.

Мітокоректин є засобом довільного вибору при комплексній терапії ішемічних захворювань [6]. Вибір препарату в лікуванні зумовлений його відновними властивостями. Так, мітокоректин в умовах гіпоксії підсилює компенсаторну швидкість аеробного гліколізу, модулює активність мембранозв'язаних

ферментів, рецепторних комплексів, що посилюють їх здатність зв'язуватися з лігандами, сприяє покращенню транспорту нейромедіаторів і синаптичної передачі, активації енергогенеруючої функції мітохондрій [7]. Незважаючи на це, вплив мітокоректину на ендотеліальні клітини не вивчено.

Метою нашої роботи було дослідження механізму дії мітокоректину на клітини судинного ендотелію в системі *in vitro*.

МЕТОДИКА

Діючою речовиною мітокоректину [6] є комплекс олігопептидів (з молекулярною масою до 10 000 Да) і амінокислот, виділених з мітохондрій клітин печінки, мозку та підшлункової залози (у співвідношенні 10:10:1) однодобових порослят, народжених у гіпоксичних умовах. Вміст пептидів з молекулярною масою від 1500 до 6000 Да становив 18 %, менше 1500 Да – близько 60 %, а вільних амінокислот – не перевищував у середньому 10 %. Серед пептидів переважали речовини з молекулярною масою близько 1250–1350, 1180, 1070, 680, 370 Да. Всі експерименти з їх

отримання проводили відповідно до правил гуманного поводження з тваринами [9].

Для оцінки про- і антиангіогенного впливу мітокоректину були використані ендотеліальні клітини аорти свині (РАЕ), люб'язно надані проф. Лондонського університету І. Гуттом. Клітини інкубували в середовищі DMEM («Sigma», США) та 10 % ембріональної телячої сироватки («Sigma», США) при 37 °С, в умовах 5% CO₂ та 100 % вологості в 96-лункових планшетах («Nunc», Данія). Мітокоректин розчиняли в середовищі інкубації до кінцевої концентрації 2 мг/мл, стерилізували через нітроцелюлозні шприцеві фільтри (0,22 мкм). Клітини висаджували в кількості 100 тис/мл в об'ємі 100 мкл, препарат додавали в серійних послідовних розведеннях від 0,0001 до 1 мг/мл. Вплив мітокоректину вивчали в декількох паралельних експериментах.

Цитотоксичний/пропроліферативний ефект мітокоректину на культивовані ендотеліоцити визначали з використанням цитофлуориметричного аналізу [13], підрахунком кількості живих і мертвих клітин при фарбуванні трипановим синім (0,25%-й розчин), а також в колориметричному тесті за активністю мітохондріальних дегідрогеназ живих клітин, який базується на їх здатності відновлювати розчинний у фізіологічних буферах 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ, «Sigma») – сіль жовтого кольору в кристалічній формі фіолетового кольору [11].

Вміст нітрит-аніона (NO₂⁻) та нітрат-аніона (NO₃⁻) визначали колориметричним методом за допомогою реактиву Грісса [5]. Вміст глюкози в середовищі інкубації ендотеліальних клітин під впливом мітокоректину розраховували за глюкозооксидазним методом з використанням стандартного набору реактивів («Філісіт», Україна), як описано нами раніше [12], за формулою:

$$C = 10,0 \cdot E_{\text{досл.}} / E_{\text{кал.}}$$

де: С – концентрація глюкози в досліджуваному зразку, ммоль/л; 10,0 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність досліджуваного зразка; $E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Сумарний адгезивний потенціал під впливом мітокоректину визначали фарбуванням фіолетовим кристалічним клітин, прикріплених до субстрату, як описано нами раніше [4]. Проангіогенну дію мітокоректину на формування капілярноподібних структур (КПС) вивчали, використовуючи 2D і 3D моделі культивування ендотеліальних клітин [2, 14]. Отримані результати фотографували і обробляли за допомогою інвертованого мікроскопа AxioVert з програмним забезпеченням AxioVision («Zeiss», Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Origin 6,1» і критерію t Стьюдента. Всі результати приведені у вигляді середніх арифметичних і стандартних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті комплексного дослідження було виявлено, що вплив мітокоректину на культивовані ендотеліальні клітини лінії РАЕ залежить як від його концентрації, так і від часу дії на культуру. Після дії мітокоректину в дозі 0,1–1 мг/мл на ендотеліоцити протягом 24 год було виявлено їх збільшення на 25 % ± 5 % порівняно з контролем (рис. 1).

Співвідношення живих і мертвих клітин

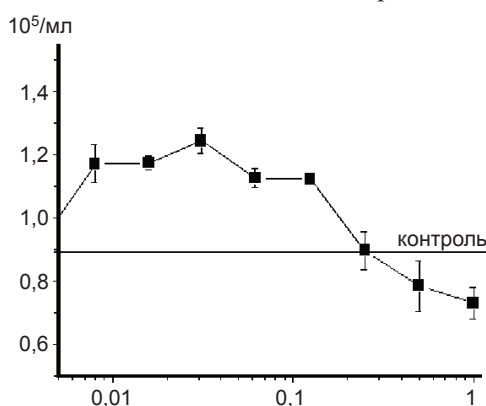


Рис. 1. Вплив мітокоректину протягом 24 год на проліферацію ендотеліальних клітин лінії РАЕ. $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (без препарату)

не залежало від концентрації мітокоректину у середовищі інкубації, і виживання було вище в середньому в 1,3 раза відносно відповідного контролю (5–7 % у зразках з мітокоректином порівняно з 11,5 % у контролі). Кількість апоптотичних клітин після впливу препарату також була меншою, ніж у контролі (8–12 % щодо 15 % у контролі).

За результатами цитофлуориметричного аналізу виявлено збільшення популяції проліферативного пулу клітин під впливом мітокоректину (0,01–0,05 мг/мл) в 1,8 раза ($P < 0,01$), в той час як у більш високих концентраціях (0,1–1 мг/мл) змін у клітинному циклі ендотеліоцитів у порівнянні з контролем не виявлено (таблиця).

МТТ-тест [11] для клітин експоненційного та стаціонарного росту, що культивувалися з мітокоректином 24 та 72 год відповідно, показав, що активність дегідрогеназ у розрахунку на одиницю клітин була вищою в стаціонарній фазі росту ендотеліоцитів порівняно з експоненційною та відповідними контрольними показниками.

Отже, результати, отримані в трьох функціональних тестах, можуть свідчити про мітогенний потенціал мітокоректину, оскільки збільшувалася популяція клітин проліферативного пулу та зменшувалася кількість апоптотичних клітин. Найбільш виражений мітогенний та антиапоптотичний вплив мітокоректину на ендотеліоцити був при його концентраціях 0,1–1 мг/мл. Таким чином, ці дози можуть бути найбільш терапевтично ефективними для відновлення васкуляризації в постінсультний період [2].

Важливим показником функціонального статусу ендотеліальних клітин є рівень активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS). Відомо, що оксид азоту має широкий спектр біологічної дії і характеризується поліфунк-

ціональністю проявів: здатний як посилювати процеси перекисного окиснення ліпідів у мембранах клітин і ліпопротеїдах сироватки крові, так і інгібувати їх, може викликати вазодилатацію та вазоконстрикцію, індукує апоптоз і водночас проявляє захисний ефект стосовно нього, але спричиненого іншими агентами [5]. У наших дослідженнях було показано, що мітокоректин у дискретних концентраціях знижує продукцію NO як в експоненційному (24 год інкубації), так і в стаціонарному рості клітин (72 год інкубації). Так, 1; 0,1 та 0,001 мг/мл мітокоректину в середовищі інкубації клітин знижує вищевказаний показник в 1,5–1,7 раза ($P < 0,01$), а в стаціонарному рості в концентрації 1 та 0,1 мг/мл – в 2 і 1,5 раза ($P < 0,01$) відповідно (рис. 2), що підтверджує попередні результати визначення кількості апоптотичних клітин. Нами було показано, що мітокоректин знижує їх вміст внаслідок інгібування продукції NO і, відповідно, одним з механізмів його впливу є антиапоптотичний ефект [18].

Мітокоректин у умовах гіпоксії викликає компенсаторну активацію аеробного гліколізу та зменшує пригнічення окиснювальних

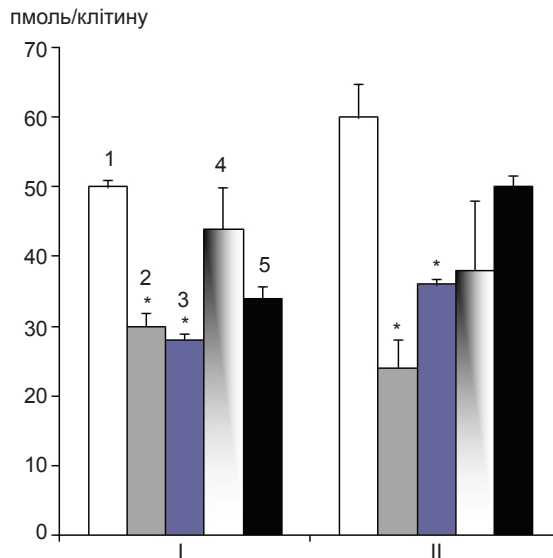


Рис. 2. Залежність продукції NO ендотеліальними клітинами PAE від концентрації мітокоректину та часу інкубації з агентом: I – 24 год; II – 72 год; 1 – контроль; 2–1 мг/мл; 3–0,1 мг/мл; 4–0,01 мг/мл; 5–0,001 мг/мл мітокоректину відповідно.* $P \leq 0,05$ в порівнянні з контролем

процесів у циклі Кребса з підвищенням вмісту АТФ і креатинфосфату, активацію енергосинтезувальної функції мітохондрій, стабілізацію клітинних мембран [6, 7]. У концентрації мітокоректину 1,0 і 0,5 мг/мл поглинання глюкози клітинами знижується на $44 \pm 1,7$ і $19 \% \pm 2 \%$ ($P < 0,05$) відповідно, тоді як у концентрації 0,02; 0,01 та 0,005 мг/мл – підвищується на $22 \% \pm 3 \%$ ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 3).

Отримані результати можуть свідчити про інтенсифікацію метаболізму глюкози під впливом мітокоректину в розведеннях від 0,001 до 0,05 мг/мл, а за більш високих концентрацій (0,1–1 мг/мл) спостерігається протилежний ефект, тобто пригнічення метаболічного перетворення глюкози.

Виявлено також, що для клітин ендотелію транскрипція гена основного транспортера глюкози GLUT1 регулюється серин-треоніновою кіназою Akt1 [16]. Водночас остання асоційована з адгезивними молекулами, тому важливим є визначення сумарного адгезивного потенціалу за кількістю прикріплених до субстрату клітин. Показано 2–4-кратне збільшення кількості адгезивних клітин при

концентрації мітокоректину 0,2–1 мг/мл та їх зменшення при 0,002–0,2 мг/мл у середовищі інкубації клітин.

Одним із найбільш специфічних тестів для оцінки ангиогенезу *in vitro* є здатність ендотеліальних клітин формувати КПС в моделях 2D- та 3D-росту, що є проявом пізньої стадії ангиогенезу – диференціюванням. Ця властивість – їхня автономна характеристика, тобто клітини потребують позаклітинних сигналів, які ініціюють початок формування КПС, але не таких, що контролюють етапи цього процесу [17]. Так, за умов довготривалого культивування клітин лінії PAE в рідкій 2D-культури при дії мітокоректину було зафіксовано більш інтенсивне формування КПС у вигляді ланцюжків (рис.4,б), порівняно з контролем (рис.4,а), що може свідчити про судинний морфогенез. На рис. 4,г продемонстровано явище виходу клітин із 3D-культур та їх радіальна міграція по субстрату, тоді як для контролю характерним є хаотичний рух клітин (див. рис. 4,в). Ендотеліоцити, що виходять за міграційну зону, починають проліферувати, створюючи передумови для більш інтенсивного формування КПС. Зростання проліферативних показників клітин за впливу мітокоректину (0,01–0,05 мг/мл) підтверджено як у МТТ-тесті, так і цитофлуориметричним аналізом (див. таблицю).

Отже, отримані результати показують, що мітокоректин може бути задіяний у двох різних механізмах ангиогенезу: проліферація ендотеліальних клітин з наступною їх диференціацією та стабілізацією.

Таким чином, проведене комплексне дослідження свідчить про те, що мітокоректин проявив позитивну проангіогенну дію відносно культивованих ендотеліальних клітин лінії PAE свині. Це підтверджується зростанням субпопуляції клітин проліферативного пулу

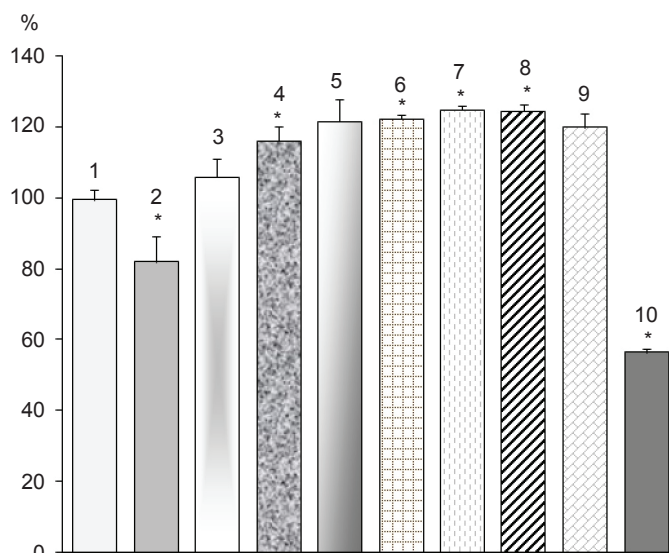


Рис. 3. Вплив мітокоректину на рівень поглинання глюкози клітинами лінії PAE: 1 – контроль; 2 – 1 мг/мл; 3 – 0,5 мг/мл; 4 – 0,2 мг/мл; 5 – 0,1 мг/мл; 6 – 0,05 мг/мл; 7 – 0,02 мг/мл; 8 – 0,01 мг/мл; 9 – 0,005 мг/мл; 10 – 0,001 мг/мл мітокоректину відповідно. * $P \leq 0,01$ порівняно з контролем

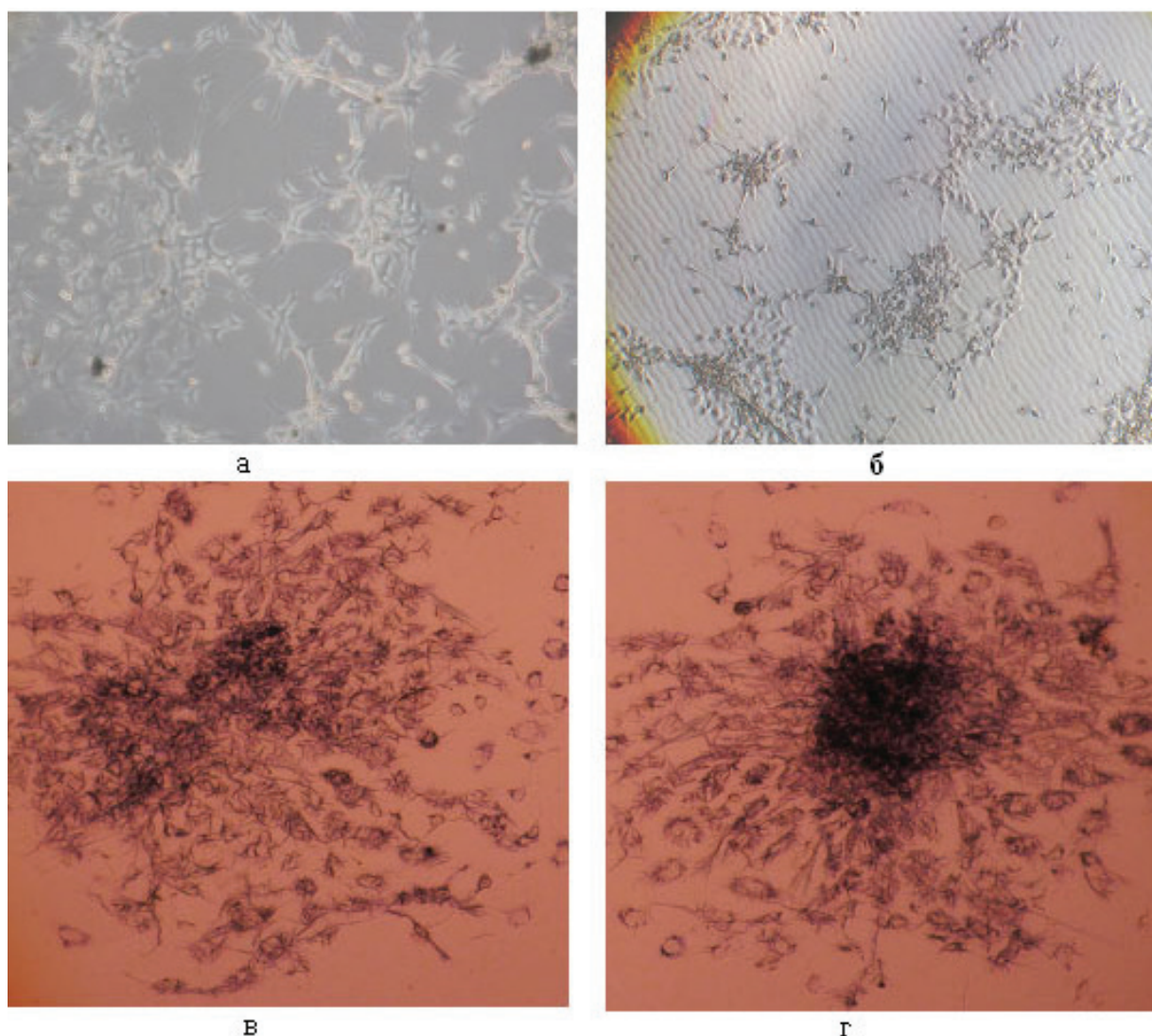


Рис. 4. Міграція клітин лінії PAE по субстрату під впливом мітокоректину: а – контроль для 2D-культури, б – після впливу мітокоректину, в – контроль для 3D-культури, г – після впливу мітокоректину

(G₂/M+S) порівняно з контролем, зниженням кількості апоптотичних клітин. Також зафіксовано ефекти, що вказують на індукцію мітокоректином диференціювання ендотелі-

Розподіл клітин лінії PAE (%) за фазами клітинного циклу під впливом мітокоректину

Вміст клітин у фазах клітинного циклу	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₂ /M+S
Контроль	80,08±1,22	12,14±0,42	7,78±0,26	19,92±0,68
Мітокоректин, мг/мл				
0,01–0,05	65,98±0,41*	19,82±0,31**	13,20±0,87	34,02±1,25*
0,1–1	76,09±0,93	16,84±1,27*	8,08±2,23	23,92±3,21

*P<0,05; **P<0,01 порівняно з контролем.

альних клітин: зниження продукції NO, підсилення метаболізму глюкози та формування КПС. Отже, цей препарат може бути досить ефективним засобом відновлення васкуляризації, що є важливим у постінсультний період при ішемічних ускладненнях.

**Л.В. Гарманчук, А.Н. Макаренко,
Н.Н. Храновська, Т.В. Николаенко,
В.В. Нікуліна, Х.Д. Непийвода,
Л.І. Остапченко, С.Г. Морозов, Н.С. Косицин**

МИТОКОРРЕКТИН СТИМУЛИРУЕТ АНГИОГЕНЕЗ IN VITRO

Исследовали влияние митокорректин (комплекс нативных олигопептидов, выделенных из мозга новорожденных свиней) на эндотелиоциты в культуре. Выявлено, что препарат в зависимости от концентрации индуцирует ангиогенез in vitro. Согласно результатов МТТ-теста и стандартного подсчета клеток в камере Горяева показано митогенный эффект митокорректин при 0,1–1 мг/мл, который состоит в увеличении количества клеток на 25% ± 5%, а также субпопуляции клеток пролиферативного пула ($G_2/M+S$) в 1,8 раза в разведениях митокорректин от 0,01 до 0,05 мг/мл относительно контроля. В 3D-культуре клеток и в стационарной фазе роста зафиксировано эффекты, которые указывают на индукцию митокорректин дифференцирования эндотелиальных клеток: снижение продукции NO, усиление метаболизма глюкозы и формирование капилляроподобных структур.

Ключевые слова: митокорректин, ангиогенез, эндотелиальные клетки.

**L.V. Garmanchuk, A.N. Makarenko,
N.N. Khranovskaya, T.V. Nikolayenko,
V.V. Nikulina, K.D. Nepiyvoda, L.I. Ostapchenko,
S.G. Morozov, N.S. Kositsyn**

MITOKORREKTINE STIMULATES ANGIOGENESIS IN VITRO

The effect of mitokorrectine (complex native oligopeptides isolated from neonatal pig brain) on endothelial cells in culture was investigated. It was revealed that the drug concentration-dependently induces angiogenesis in vitro. Mitogen effect of Mitokorrectine was shown by MTT-test and routine cell count in concentration diapason (0.1–1 mg/ml) which means an increased number of cells by 25±5% and cell subpopulation of proliferative pool ($G_2/M+S$) 1.8 times in concentration diapason mitokorrectine (0,01–0,05 mg/ml) in comparison with control. In 3-D culture and in stationary phase we detected induction of differentiation of endothelial cells, a decrease the level of NO production and enhancement of glucose metabolism and stimulation of formation of capillary-like tubes.

Key words: mitokorrectin, angiogenesis, endothelial cells.

NSC «Institute of Biology,» Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv,

National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine,

The Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow,

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAS, Moscow

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Виленский Б.С. Осложнение инсульта: профилактика и лечение. –С.-П.:Фолиант, 2000. – С. 128.
2. Гарманчук Л.В. Моделивання ангиогенезу in vitro з використанням 3D-культур ендотеліальних клітин // Фізика живого. – 2010. – №3. – С.55–57.
3. Гарманчук Л.В., Храновская Н.Н., Макаренко А.Н., Мазур О.В., Скачкова О.В., Непийвода Х.Д., Лаврова Е.В., Перепелицына Е.М., Сенчило Н.В., Васильева И.Г., Остапченко Л.И. Комплексное исследование иммуномодулирующего влияния препаратов с ноотропным механизмом действия на иммунокомпетентные клетки // Журн. НАМН Украины. – 2011. – 17, № 3. – С. 218–226.
4. Гарманчук Л.В., Перепелицына О.М., Гринюк І.І., Прилуцька С.В., Магишевська О.П., Сидоренко М.В. Вплив фулеренів C_{60} на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // Доп. НАН України. – 2009. – №4. – С.164–167.
5. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. – М.:ГЭОТАР Медиа. – 2001. – С.177.
6. Пат. № 2008136321/15 РФ. Лекарственный препарат для лечения гипоксических и токсических митохондриальных нарушений и способ его получения // Макаренко А.Н., Морозов С.Г., Кульчиков А.Е., Широбокова Л.П., Божко А.М. – Опубл. 20.03.2010, Бюл. № 8.
7. Макаренко А.М., Широбокова Л.П., Шаяхметова А.М. Состояние биохимических показателей печени и газообмена у экспериментальных животных в условиях острой нитробензольной интоксикации и коррекции новым интраорганонидным средством мито-хондрином // Токс. вестн. – 2003. – №2. – С.6–9.
8. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M, Van Der Z.R., Li T., Witzenbichler B. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. – 1997. – 275. – P.964–967.
9. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – W.: National Academy of Press, 1996. – P. 140.
10. Folkman J., D'amore P.A. Blood vessel formation: What is its molecular basis? // Cell. – 1996. – 87. – P. 1153–1155.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // J. Immunol. Methods. – 1983. – 65. – P.55–63.

12. Neryuvoda K., Lavrova K., Garmanchuk L., Ostapchenko L. EGF and herceptin influence on proliferation, adhesion and glucose consumption of tumor cells MCF-7 // Abstracts VIII Parnas conference. – Warsaw, Poland, 2009. – P.7.10. – P.59.
13. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // J.Immunol. Methods. – 1991. – 139. – P. 271–280.
14. Pauly R.R., Passaniti A., Crow M., Kinsella J.L., Papadopoulos N., Monticone R., Lakatta E.G., Martin G.R. Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells // Circulation. – 1992. – 86. – P. 11168–11173.
15. Risau W. Differentiation of endothelium // FASEB. J. – 1995. – 9. – P. 926–933.
16. Wei-Lan Yeh, Chun-Jung Lin, Wen-Mei Fu. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia // Mol.Pharm. – 2008. – 73, №1. – P. 170–177.
17. Zhu W.H., Guo X., Villaschi S., Nicosia R.F. Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis // Lab. Invest. – 2000. – 80. – P. 545–555.
18. Ziche M., Morbidelli L., Masini E., S. Amerini, H.J. Granger, C.A. Maggi, P. Geppetti. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P // J. Clin. Invest. – 1994. – 94. – P. 2036–2044.

ННЦ “Ін-т біології», Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка,

Нац. ін-т раку, Київ;

Ін-т загальної патології та патофізіології РАН, Москва;

Ін-т вищої нервової діяльності та нейрофізіології РАН, Москва

E-mail: nikolaenkotetiana@yandex.ua

*Матеріал надійшов
до редакції 31.10.2012*

М.М. Кондро, Т.І. Галенова, М.Ю. Кузнєцова, О.М. Савчук

Експресія інсулінового рецептора у субклітинних фракціях м'язової та жирової тканин як фактор розвитку тканинної інсулінорезистентності у щурів за умов висококалорійної дієти

Нами було встановлено різнонаправлені зміни вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції та цитозолі клітин жирової тканини щурів за умов їх довготривалого перебування на висококалорійній дієті. Його зниження у мембранах жирової тканини можливо зумовлено порушеннями цілісності ліпідного бішару адипоцитів через посилення пероксидації. Підвищення вмісту у цитозолі клітин цієї тканини може вказувати на активацію синтезу цього білка, але внаслідок ушкодження плазматичної мембрани ймовірно порушується внутрішньоклітинна транслокація інсулінового рецептора, за рахунок чого новосинтезовані молекули рецептора не надходять до мембрани і накопичуються у цитозолі. Наші результати показали, що досліджувані тканини по-різному реагують на довготривале вживання висококалорійної їжі. Так, вміст рецепторів до інсуліну у плазматичних мембранах клітин м'язової тканини підвищується, а у мембранах жирової навпаки знижується. Це може скоріш за все є наслідком порушень функціонування клітин жирової тканини.

Ключові слова: висококалорійна дієта, інсулінорезистентність, інсуліновий рецептор.

ВСТУП

Нині все більшої актуальності у медицині набуває проблема інсулінорезистентності (ІР), яка має тісні причинно-наслідкові зв'язки з ожирінням, цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу, метаболічним синдромом тощо. ІР – це патологічний стан, який характеризується нормальним або підвищеним синтезом інсуліну одночасно з порушенням чутливості периферичних тканин до його біологічних ефектів [1, 9]. Інсулін, взаємодіючи з відповідними рецепторами на поверхні клітин-мішеней, індукує низку внутрішньоклітинних реакцій, через які регулюються вуглеводневий, ліпідний і білковий обмін, забезпечується прояв мітогенних, проліферативних, а також протизапальних ефектів гормону [2, 10]. При ІР біологічна відповідь на дію інсуліну знижена, в результаті чого порушуються основні

метаболічні процеси в організмі, ініціюються мітогенні реакції [1, 3].

На жаль, не існує єдиної концепції розвитку ІР. Виділяють декілька потенційних її механізмів, що реалізуються на рецепторному та пострецепторному рівнях і можуть бути пов'язані зі зміною вмісту чи порушенням функціонування ключових ланок інсулінового сигнального каскаду [4, 5, 13]. Відомо, що ІР може бути не тільки генетично детермінована, але й індукована несприятливою дією таких факторів зовнішнього середовища, як надмірне вживання калорійної їжі та низької фізичної активності. Встановлено, що споживання їжі, незбалансованої за вмістом жирів і вуглеводів, призводить до розвитку абдомінального ожиріння, сприяє накопиченню вільних жирних кислот і суттєво погіршує чутливість до інсуліну [6, 7, 12]. Зважаючи на такий взаємозв'язок перспективним є вивчен-

ня функціонування компонентів інсулінової сигнальної системи за умов довготривалого перебування на висококалорійній дієті.

Метою нашої роботи було визначити вміст інсулінового рецептора у субклітинних фракціях м'язової та жирової тканин дослідних щурів та встановити можливий взаємозв'язок зміни його вмісту, розвитку ІР і довготривалого вживання висококалорійної їжі.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар з початковою масою 200–215 г. Упродовж 18 тиж тварини перебували на висококалорійній дієті, яка складалася зі стандартної їжі (47 %), солодкого концентрованого молока (44 %), кукурудзяної олії (8 %) і рослинного крохмалю (1 %) (дієта #С 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ). Від групи дослідних тварин на 6, 9, 12, 15 та 18-му тижні експерименту рандомізовано відбирали по п'ять щурів. Сироватку отримували з цільної крові, яку, для вилучення фібриногену та супутніх білків, залишали при 37° С на 4 год, а потім центрифугували при 2000 g протягом 15 хв. Мембранну фракцію та цитозоль клітин м'язової та жирової тканин щурів отримували з загальних гомогенатів методом диференційного центрифугування [8]. Контрольну групу складали щури такої самої маси і віку, що перебували на стандартному раціоні віварію.

У групі щурів, залучених до експерименту, проводили моніторинг концентрації глюкози крові за допомогою глюкометра «Глюкофот-ІІ» виробництва фірми «Норма» (Україна). Дослідження проводили згідно з інструкцією приладу.

Вміст інсуліну визначали у сироватці крові дослідних тварин (натщесерце) за допомогою методу імуноферментного аналізу з використанням поліклональних антитіл проти інсуліну. Фракцію анти-інсулінових антитіл отримували самостійно з сироватки крові імунізованого кроля, яку поступово очищали

за допомогою афінної хроматографії на колонках з протеїн А-сефарозою («Amersham», США) та інсулін-сефарозою, що готували за стандартною методикою іммобілізації лігандів на матриці за допомогою бромціану [9]. Всі процедури щодо отримання, очищення та перевірки специфічності антитіл були проведені згідно з рекомендаціями стандартних протоколів [10, 11].

Вміст інсулінового рецептора визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних моноклональних антитіл проти β -субодиниці інсулінового рецептора щурів («Millipore», США). Як антиген використовували білковий матеріал цитозольної та мембранної фракцій досліджуваних тканин щурів у концентрації 10 мкг/мл, попередньо солюбілізованих за наявності 1 % неіонного детергенту Тритон Х-100. Про вміст інсулінових рецепторів у зразках судили за адсорбцією специфічних антитіл, яку визначали як різницю екстинцій при 450 нм (робоча хвиля) та 492 нм (поправка на похибку вимірювання) і виражали в умовних одиницях.

Додатково у групі контрольних тварин, а також щурів, які перебували на висококалорійній дієті (на 7-му та 15-му тижні експерименту) було проведено тест на інсулінолеерантність [12]. Для цього у крові дослідних тварин (натщесерце) визначали концентрацію глюкози, після чого щурам внутрішньовенно вводили розчин інсуліну («Монодар», Україна) з розрахунку 0,75 од./кг. Через 15, 30, та 60 хв з хвостової вени щурів за допомогою внутрішньовенного катетера відбирали проби крові у об'ємі 100 мкл та визначали концентрацію глюкози. За результатами тесту будували глікемічні криві, що відображають швидкість зниження вмісту глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали отримані нами результати, концентрація глюкози в сироватці крові щурів на

6-й тиждень вживання висококалорійної їжі зростала на 75 % відносно контролю (рис. 1). На 9-му та 12-му тижні вона знижувалася до контрольних значень, що може бути результатом активації адаптаційних механізмів організму. Однак на більш пізніх строках експерименту спостерігали поступове зростання концентрації глюкози, і на 18-му тижні різниця між значеннями контрольних щурів і тварин, що перебували на дієті становила 70 % (див. рис. 1).

Встановлено, що довготривале перебування тварин на висококалорійній дієті супроводжувалося прогресуючим підвищенням вмісту інсуліну в сироватці крові дослідних тварин (рис. 2). Так, цей показник у тварин, які вживали висококалорійну їжу, на останньому тижні експерименту вдвічі перевищував значення контрольних щурів. Такі зміни можуть бути як наслідком активації компенсаторних реакцій у відповідь на розвиток гіперглікемії у дослідних щурів, так і результатом негативного впливу надлишку висококалорійної дієти на метаболізм інсуліну в печінці та зв'язування гормону з відповідними поверхневими рецепторами.

Аналізуючи отримані результати щодо зміни вмісту глюкози та інсуліну в сироватці крові дослідних тварин, було зроблено висновок, що вживання висококалорійної їжі може

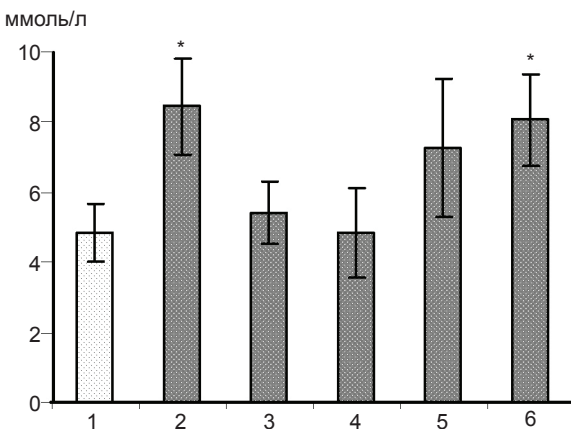


Рис. 1. Концентрація глюкози у крові дослідних щурів, які вживали висококалорійну дієту: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – 6, 9, 12, 15, 18-й тиждень відповідно. * P < 0,05 порівняно з контролем

приводити до гіперглікемії, у відповідь на що β-клітини підшлункової залози починають секретувати більше інсуліну. За рахунок цукрознижувальних ефектів останнього рівень глікемії на деякий час нормалізується, що підтверджується зниженням вмісту глюкози на 9-му та 12-му тижнях експерименту (див. рис. 1). Підвищення цього показника на більш пізніх строках можливо є наслідком зниження чутливості (резистентності) периферичних тканин до біологічних ефектів гормону.

У групі контрольних тварин і щурів, які вживали висококалорійну їжу протягом 7 та 14 тиж, було проведено інсулінотолерантний тест, за результатами якого були побудовані глікемічні криві (рис. 3). Слід відмітити, що у групі дослідних тварин на 7-й тиждень експерименту, незважаючи на підвищення базального вмісту глюкози в крові, чутливість до гіпоглікемічних ефектів інсуліну була на рівні контролю (див. рис. 3,а). На 14-й тиждень разом з гіперглікемією спостерігали зниження поглинання глюкози периферичними тканинами організму під дією інсуліну (див. рис. 3,б), що може бути результатом резистентності клітин і тканин різних органів до цукрознижувальної дії цього гормону.

Ключову роль у реалізації метаболічних ефектів інсуліну відіграє його рецептор. У зв'язку з цим нами було досліджено вміст

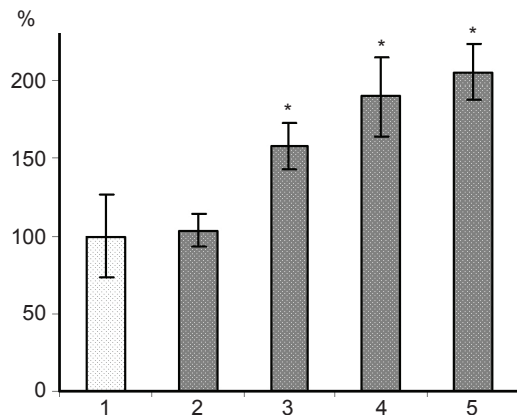


Рис. 2. Вміст інсуліну у сироватці крові дослідних щурів, які вживали висококалорійну дієту: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, – 6, 9, 12, 18-й тиждень відповідно. * P < 0,05 порівняно з контролем

останнього у складі плазматичних мембран і цитозолі клітин основних інсулінозалежних тканин – м'язовій та жировій. Відомо, що зменшення кількості інсулінового рецептора на поверхні клітин ймовірно є причиною зниження проникності мембран цих тканин для глюкози і порушення механізмів її утилізації та призводити до розвитку ІР.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів, які перебували на висококалорійній дієті, протягом перших 12 тиж експерименту, вміст інсулінового рецептора у мембранній фракції м'язової тканини був таким, як у контрольних тварин. На 15-му тижні цей показник у мембранах клітин м'язової тканини підвищувався на 20 %, порівняно з контролем і залишався на цьому рівні до кінця експерименту (рис. 4). Водночас у цитозолі клітин м'язової тканини щурів, які перебували на дієті спостерігалися наступні зміни: на 9-му тижні експерименту вміст інсулінового рецептора зменшувався на 30 % порівняно з контролем, мінімальні його значення нами були зафіксовані на 12-й тиждень, тоді як на більш пізніх етапах експерименту (15-й тиждень) він поступово збільшувався і повертався до значень контролю на 18-му тижні експерименту (рис. 4).

Незначне підвищення вмісту інсулінового рецептора у мембранах м'язової тканини може бути наслідком активації компенсаторних механізмів у відповідь на вживання

висококалорійної їжі. Ймовірно, що на більш ранніх строках експерименту підвищується кількість інсулінового рецептора на поверхні клітин внаслідок виснаження їхніх внутрішньоклітинних резервів, тоді як на більш пізніх термінах вживання висококалорійної дієти активуються процеси синтезу нових молекул, що може призводити до підвищення вмісту інсулінового рецептора не лише у складі мембран, а й у цитозолі клітин.

При дослідженні вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції жирової тканини нами була відмічена протилежна тенденція. Так, уже на 6-му тижні висококалорійної дієти показано зниження вмісту цього показника на 26 % порівняно з контролем. Максимально низьке його значення (зниження на 35 % порівняно з контролем) зафіксовано на 9-му тижні експерименту. Починаючи з 12-го тижня вміст інсулінового рецептора поступово підвищувався і на 15-му тижні різниця між значеннями контрольних і дослідних тварин становила лише 10 %. На 18-му тижні цей показник у мембранах клітин жирової тканини залишався достовірно зниженим порівняно з контролем. Показано відсутність змін вмісту інсулінового рецептора у цитозолі клітин жирової тканини щурів, які перебували на дієті, протягом перших 12 тиж. На більш пізніх строках експерименту (15-й тиждень) було встановлено збільшення вмісту інсулінового рецептора на 25 % щодо

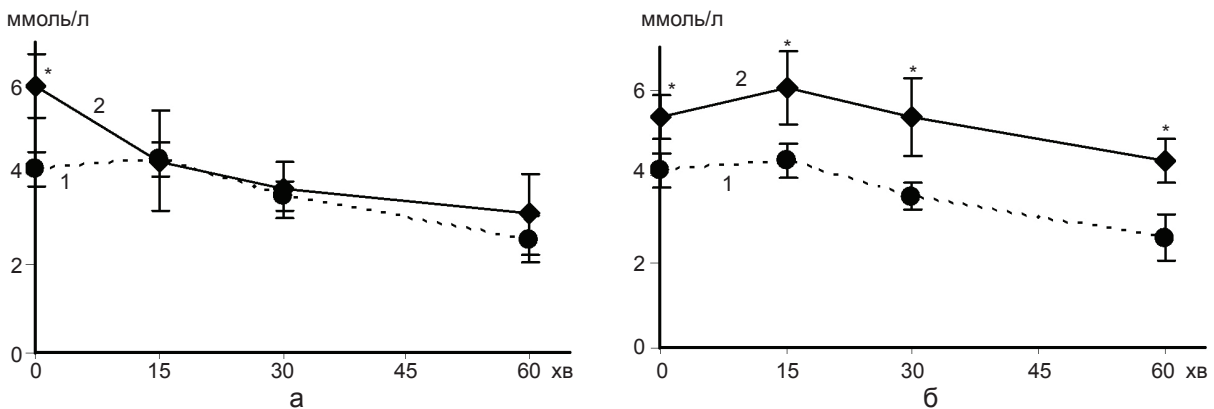


Рис. 3. Глікемічні криві отримані під час інсулінотолератного тесту у групі контрольних тварин (1) та щурів, які вживали висококалорійну їжу (2) на 7-й (а) та 14-й (б) тиждів експерименту. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

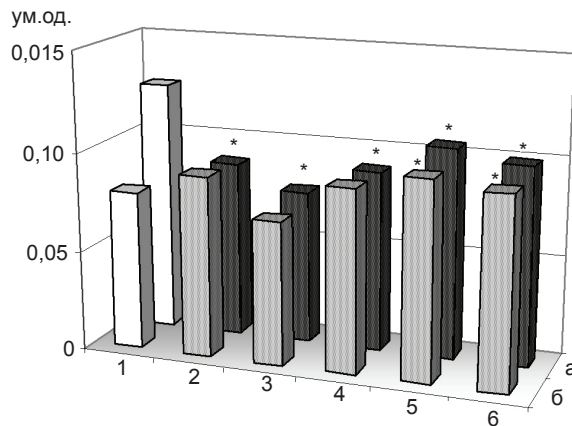


Рис. 4. Вміст інсулінового рецептора у мембранній фракції (а) та цитозолі клітин (б) жирової тканини щурів за умов висококалорійної дієти: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – 6, 9, 12, 15 і 18-й тиждень відповідно. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

контролю. Цей показник залишався достовірно підвищеним порівняно з контролем і на 18-му тижні.

Таким чином, нами було встановлено різнонаправлені зміни вмісту інсулінового рецептора у мембранній фракції та цитозолі клітин жирової тканини щурів за умов їх довготривалого перебування на висококалорійній дієті. Його зниження у мембранах жирової тканини можливо зумовлено порушеннями цілісності ліпідного бішару адипоцитів через активацію процесів пероксидації. Підвищення вмісту у цитозолі клітин цієї тканини може вказувати на посилення синтезу цього білка, але внаслідок ушкодження плазматичної мембрани ймовірно порушуються процеси внутрішньоклітинної транслокації інсулінового рецептора, за рахунок чого новосинтезовані молекули рецептора не надходять до мембрани і накопичуються у цитозолі.

Отже, встановлені нами результати показали, що досліджувані тканини по-різному реагують на довготривале вживання висококалорійної їжі. Так, вміст рецепторів до інсуліну у плазматичних мембранах клітин м'язової тканини підвищується, а у мембранах жирової навпаки знижується. Це вказує

на те, що розвиток ІР на пізніх термінах експерименту скоріш за все є наслідком порушень функціонування клітин жирової тканини. Наші висновки можуть мати значення для розуміння механізму розвитку ІР за умов довготривалого вживання висококалорійної їжі.

М.М. Кондро, Т.І. Галенова, М.Ю. Кузнецова, А.Н. Савчук

ЭКСПРЕСИЯ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МЫШЕЧНОЙ ТА ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ТКАНЕВОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

Нами были установлены разнонаправленные изменения содержания инсулинового рецептора в мембранной фракции и цитозоле клеток жировой ткани крыс в условиях их длительного пребывания на высококалорийной диете. Снижение его содержания в мембранах жировой ткани, возможно, обусловлено нарушением целостности липидного бислоя адипоцитов вследствие усиления пероксидации. Повышение содержания инсулинового рецептора в цитозоле клеток этой ткани может указывать на активацию синтеза данного белка, но вследствие повреждения плазматической мембраны, возможно, происходит нарушение внутриклеточной его транслокации, за счет чего новосинтезированные молекулы рецептора не поступают к мембране и накапливаются в цитозоле. Наши результаты показали, что исследуемые ткани по-разному реагируют на длительное употребление высококалорийной пищи. Так, содержание рецепторов к инсулину в плазматических мембранах клеток мышечной ткани повышается, а в мембранах жировой наоборот снижается. Это может указывать на то, что развитие инсулинорезистентности на поздних сроках эксперимента, скорее всего, является следствием нарушений функционирования клеток жировой ткани. Ключевые слова: высококалорийная диета, инсулинорезистентность, инсулиновый рецептор.

М.М. Kondro, T.I. Galenova, M.U. Kyznecova, O.M. Savchyk

EXPRESSION CHANGES IN INSULIN RECEPTOR IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF MUSCULAR AND ADIPOSE TISSUE AS THE FACTOR OF THE TISSUE INSULIN RESISTANCE DEVELOPMENT IN RATS UNDER CONDITIONS OF THE HIGH-ENERGY DIET

Nowadays the problem of insulin resistance, which has close cause-effect relations with obesity, diabetes mellitus type 2,

metabolic syndrome, etc., is of urgent importance in medicine. We have revealed bidirectional changes of the IR content in crude membrane and cytosol of the adipose tissue cells in rats under conditions of the long-term high-energy diet. It is possible that reduction of the IR content in the adipose tissue cells has been predetermined by the disruption of lipid bilayer of adipocytes as a result of peroxidation processes activation. Increase in the IR content in the cytosol of cells of this tissue may indicate the activation of synthesis of this protein; however, it is possible that the IR translocation process disorder occurs due to the damage of plasma membrane, preventing the transfer of newly synthesized molecules of the receptor to the membrane and causing their accumulation in cytosol. The obtained results show that the tissues react to the long-term consumption of high-energy food in different ways. Thus, the content of insulin receptors in the plasma membrane of the muscle tissue cells increases, and, on the contrary, it decreases in adipose tissue cells. Such results may indicate that IR development at the late period of the experiment is likely the result of the adipose tissue cells disfunction. The obtained data may be of high significance in understanding the mechanism of the IR development under conditions of the long-term consumption of the high-energy food.

Key words: High-Energy Diet, Insulin Resistance, Insulin Receptor.

Danylo Halysky Lviv National Medical University Department of Human Physiology;

Teaching and Research Center "Institute of Biology" at Taras Shevchenko Kyiv National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Кетти Д. Антитела // Методы. – Книга 1. – М.: Мир, 1991. – С. 288.
- Кот Л.І. Богданова О.В., Остапченко Л.І. Сучасні уявлення про біохімічні механізми патогенезу інсуліннезалежного цукрового діабету // Вісн. НАН України. – 2008. – № 9. – С. 18–26.
- Скибчик В.А. ІР: клінічне значення, методи визначення, підходи до лікування // Укр. мед. часопис. – 2006. – 6, № 56. – С. 61–67.
- Рыбальченко В.К. Коганов М.М. Структура и функции мембран // Практикум. – К.: Выща школа, 1988. – С. 312.
- Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – С. 536.
- Antti Virkamäki, Kohjiro Ueki, C. Ronald Kahn. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance // J. Clin. Invest. – 1999. – 103(7). – P. 931–943.
- Bruning J.C., Winnay J., Bonner-Weir S., Taylor S.I., Accili D., Kahn C.R. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles // Cell. – 1997. – 88(4). – P. 561–72.
- Chad R. Hancock, Dong-Ho Han, May Chen, Shin Terada, Toshihiro Yasuda, David C. Wright, and John O. Holloszy. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria // PNAS. – 2008. – 105, № 22. – P. 7815–7820.
- Jellinger P.S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance // Clin. Cornerstone. – 2007. – № 8. – P. S30–42.
- Huse K., Böhme H.J., Scholz G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – 51, № 3. – P. 217–31.
- Pessin J.E., Saltiel A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance // J. Clin. Invest. – 2000. – 106(2). – P. 165–169.
- Vasudevan A.R., Garber A.J. Insulin resistance syndrome // Minerva Endocrinol. – 2005. – 30(3). – P. 101–119.
- Pandona P., Aliada A., Chaudhuri A. Metabolic syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation // Circulation. – 2005. – 110, № 11. – P. 1448–1454.
- Yang H. Obesity accelerates thymic aging // Blood. – 2009. – 114(18). – P. 100–110.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького;
ННЦ «Ін-т біології» Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка
E-mail: kondro78@mail.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 18.12.2012*

О.П. Долайчук, Р.С. Федорук, І.І. Ковальчук

Вплив компонентів натуральної та генетично модифікованої сої на показники імунної і репродуктивної систем у самиць щурів

Досліджено вміст глікопротеїнів та їх окремих вуглеводних компонентів, загального білка, гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, молекул середньої маси та циркулюючих імунних комплексів у крові самиць щурів 3-місячного віку. Проаналізовано їхню репродуктивну здатність з визначенням коефіцієнтів маси плодів за введення в раціон бобів натуральної та генетично модифікованої сої. Встановлено, що згодовування сої суттєво не впливало на гематологічні показники організму тварин дослідних груп порівняно з контролем. Показано, що додавання до раціону щурів бобів, традиційної і генетично модифікованої сої, більше впливає на вміст глікопротеїнів та їх окремих вуглеводних компонентів, фертильність самиць і співвідношення маси плода до маси самиць, але менше на показники функціонального стану їх імунної системи. Узагальнений аналіз одержаних результатів досліджень, проведених на самицях щурів, дає підстави зробити висновок про відсутність вираженого негативного чи позитивного впливу ГМ-компонентів сої на їх фізіологічний стан порівняно з тваринами, яким згодовували натуральну сою.

Ключові слова: глікопротеїни, циркулюючі імунні комплекси, молекули середньої маси, гематологічні показники, щури, генетично модифікована соя, репродуктивна функція.

ВСТУП

Глікопротеїни в організмі виконують низку імунохімічних, захисних, структурних функцій, регулюють імунобіологічні властивості крові [9, 11, 15]. До них належать білкові комплекси, що беруть участь у забезпеченні вродженого та набутого імунітету, зокрема – інтерферони, імуноглобуліни, антигенні протеїни головного комплексу гістосумісності класів I і II тощо. Вуглеводна частина здебільшого стабілізує структуру молекули глікопротеїну, обмежуючи неспецифічні білок-білкові взаємодії та захищає від дії пептидогідролаз. Разом з тим зміна структури глікану та положення окремих вуглеводних залишків визначає фізіологічну активність протеїнів, впливає на адгезію клітин, їх диференціацію та проліферацію. Зокрема, фукоза в основному займає кінцеві позиції на бічних олігосахаридних ланцюгах макромолекул [10, 14]. Її

© О.П. Долайчук, Р.С. Федорук, І.І. Ковальчук

відсутність в нативній структурі глікопротеїнів крові змінює доступність їх білкової частини для пептидгідролаз, що призводить до порушення функціонування імунної, репродуктивної, гормональної та інших систем. Вважають, що між вмістом сіалопротеїнів у сироватці крові та реактивністю організму існує пряма залежність [13]. Важливе фізіологічне значення відіграють залишки сіалових кислот і в активації В-клітин [12]. Крім того, глікопротеїновим комплексам належить провідна роль у зв'язуванні та виведенні ксенобіотиків [8], а також імуномодулювальна [6] й антиоксидантна активність [1] та здатність інгібувати протеїнази [6]. Враховуючи значення глікопротеїнів у формуванні імунобіологічного статусу організму та його функції розмноження, при дослідженні фізіологічних механізмів дії аліментарних чинників важливим є, поряд з вивченням функціонального стану імунної та репродуктивної систем, визначення і глікопротеїнових

показників, що інтегрально характеризують перебіг цих процесів. Вміст сіалових кислот, фукози, сероглікоїдів, гексоз, зв'язаних з білками, гаптоглобіну та церулоплазміну в крові тварин може виражати як імунобіологічну реакцію організму на дію антипоживних і шкідливих речовин, так і виявляти певні залежності з іншими показниками імунного захисту та репродуктивної функції. Тому метою нашого дослідження було провести порівняльну оцінку фізіологічного впливу бобів натуральної та генетично модифікованої сої на імунобіологічну та репродуктивну здатність організму самиць щурів, визначити його глікопротеїновий статус і розвиток плодів за цих умов.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили в умовах віварію Інституту біології тварин НААН на 3-місячних самицях щурів масою 120–140 г. Тварин розділили на 3 групи, по 13 у дослідних групах та 12 у контрольній. Тварин I групи (контрольної) утримували на збалансованому стандартному раціоні впродовж усього періоду досліджень. Тварини II та III груп (дослідні) одержували раціон за схемою контрольної групи із заміною 30 % за поживністю кормів раціону на боби нативної та трансгенної сої відповідно. Соя перед згодовуванням проходила термічну обробку протягом 2 год при 140 °С для інактивації антипоживних речовин (у сої містяться речовини білкової природи, які прийнято вважати антипоживними компонентами, зокрема інгібітори протеолітичних ферментів, лектини, уреаза, ліпоксигенази тощо). Раціони всіх груп відповідали стандартним вимогам та прийнятним нормам. Через 40 діб після початку згодовування сої самиці всіх груп були спаровані і утримувались у тих самих умовах. На останньому періоді вагітності (за 5–8 діб до родів) 6 тварин з групи декапітували. Евтаназію проводили під легким ефірним наркозом, без порушень норм гуманного

поводження з лабораторними тваринами, з врахуванням загальноприйнятих біоетичних норм і дотримання міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт [7]. Від кожної самиці відбирали зразки крові для фізіолого-біохімічних досліджень. Решту самиць залишали для контролю за постнатальним розвитком приплоду.

У крові досліджували кількість еритроцитів і лейкоцитів, концентрацію гемоглобіну, загального білка, вміст фукози, гексоз, зв'язаних з білками, сероглікоїдів, сіалових кислот, церулоплазміну, гаптоглобіну, молекул середньої маси [2] та циркулюючих імунних комплексів [4]. Репродуктивну функцію самиць оцінювали за здатністю до запліднення, виражену у відсотках кількості запліднених тварин до загального числа спарованих. Цифрові результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Стьюдента та комп'ютерної програми Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження впливу згодовування нативної та генетично модифікованої сої на організм самиць щурів свідчать про певні відмінності фізіологічного стану тварин дослідних груп, на що вказують міжгрупові різниці гематологічних показників (табл. 1). Зокрема, вміст гемоглобіну у плазмі крові щурів II і III груп був нижчим на 20,9 і 16,1 % відповідно, ніж у самиць I групи. У тварин дослідних груп відмічено характерні, але протилежно відмінні реакції клітин білої крові – зниження числа лейкоцитів на 11,5 % у щурів II групи та підвищення на 38,5 % у III групі. Відомо, що пригнічення лейкоцитозу може спостерігатися за дії низки чинників, у тому числі екологічних, аліментарних. Встановлено, що зменшення числа лейкоцитів у кров'яному руслі може відбуватися у разі інгібування гемопоетичної функції кісткового мозку, а також прискореного переходу окремих форм клітин білої крові у міжклітинний простір тканин [3]. Очевидно, дія окремих

компонентів натуральної сої зумовлювала інгібувальний вплив на функцію кровотворення в кістковому мозку самиць щурів. Підтвердженням цієї гіпотези є суттєве зниження вмісту гемоглобіну і, менш виражене, кількості еритроцитів у крові тварин дослідних груп. Однак виявлена тенденція до збільшення числа лейкоцитів у крові самиць щурів III групи, які одержували боби генетично модифікованої сої, може вказувати на переважаючий прояв у них гострої реакції клітин білої крові.

Відомо, що при патологічних процесах, особливо за їх тривалого перебігу, у біологічних рідинах організму накопичується значна кількість продуктів метаболізму, більшість з яких входить до класу речовин, що ідентифікують як молекули середньої маси (від 300–500 до 5000 Да). Ці компоненти пригнічувально впливають на метаболічні процеси і є досить точним критерієм наявності та виразності синдрому метаболічної інтоксикації [5]. Виконані дослідження вказують, що за введення до раціону щурів бобів сої спостерігалось підвищення концентрації молекул середньої маси у крові тварин дослідних груп, однак ці різниці були не вірогідні (див. табл. 1). Відзначена тенденція свідчить про можливість нагромадження шкідливих продуктів обміну і початок фор-

мування в організмі самиць дослідних груп метаболічної інтоксикації, яка виявляється на низькому фізіологічному рівні. Ця гіпотеза підтверджується також і вмістом циркулюючих імунних комплексів, який був нижчим у крові самиць обох дослідних груп порівняно з контролем, що однак більше виражено у тварин, які отримували боби генетично модифікованої сої. Очевидно компоненти сої, особливо генетично модифікованого сорту, викликають певні негативні фізіологічні зміни в організмі і, враховуючи нижчий вміст імунних молекул у крові тварин дослідних груп, проявляють незначну імунодепресивну дію на секрецію імунних глобулінів. Однак синтез білків крові у самиць дослідних груп проходить на вищому рівні, про що свідчить вищий вміст загального білка в сироватці крові.

У крові вагітних самиць щурів, до раціону яких додавали боби натуральної і трансгенної сої, спостерігалось підвищення вмісту фукози на 18,5 і 17,4 % відповідно ($P < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 2). Це може свідчити про вищий ступінь імунобіологічної реактивності організму тварин II і III груп, зумовленої дією компонентів сої порівняно з щурами контрольної групи, що є фізіологічно необхідним у період особливого виснаження імунних резервів під час вагітності. Вміст сіалових кислот у крові тварин II групи був

Таблиця 1. Гематологічні та імунологічні показники організму вагітних самиць щурів, до раціону яких додавали боби нативної та трансгенної сої ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Гемоглобін, г/л	Лейкоцити, 10^9 /л	Еритроцити 10^{12} /л	Загальний білок, г/л	Циркулюючі імунні комплекси, од.екстинції	Молекули середньої маси, г/л
Контроль (I група)	88,6±6,10	5,2±0,37	7,2±0,40	66,4±2,42	15,0±1,73	1,48±0,05
Тварини, які вживали боби:						
нативної сої (II група)	70,0±7,61	4,6±0,31	7,0±0,29	68,5±2,51	14,0±0,57	1,58±0,11
трансгенної сої (III група)	74,3±1,86	7,2±0,32*	7,0±0,31	66,9±0,77	12,0±1,52	1,55±0,06

Примітка. У цій та наступних таблицях * $P < 0,05$.

Таблиця 2. Вміст глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів у крові щурів, до раціону яких додавали боби нативної та трансгенної сої (M±m, n=6)

Група тварин	Фукоза, мг%	Сіалові кислоти, одекстинції ×1000	Гексози, зв'язані з білком, г/л	Сероглікоїди, г/л	Церулоплазмін, одекстинції × 1000	Гаптоглобін, г/л
Контроль (I група)	9,2±0,07	307,3±34,26	2,0±0,09	0,13±0,001	482,3±14,77	3,8±0,29
Тварини, які вживали боби:						
нативної сої (II група)	10,9±0,84	301,3±59,27	1,8±0,03*	0,11±0,006*	493,3±0,58	3,2±0,18*
трансгенної сої (III група)	10,8±0,52*	271,3±73,87	2,0±0,19	0,15±0,010	482,7±13,35	3,3±0,34

майже однаковим зі значеннями контрольної групи. Однак цей показник виявляв тенденцію до зниження у крові щурів III групи, що корелює зі змінами вмісту циркулюючих імунних комплексів. Вміст гексоз, зв'язаних з білками, і сероглікоїдів був вірогідно нижчим у крові тварин II групи на 10,0 і 15,4 % відповідно, тоді як у тварин III групи він залишався на рівні контролю для гексоз і зростав для сероглікоїдів на 15,4 %. Вірогідне зниження вмісту сероглікоїдів у крові тварин II групи порівняно з контролем може свідчити про порушення протеосинтетичної функції печінки. Але виявлена тенденція до збільшення вмісту сероглікоїдів у крові тварин III групи може вказувати на відмінні механізми впливу комплексів нативної та трансгенної сої на функціонування фізіологічного зв'язку між синтезом глікопротеїнових комплексів та їх окремих вуглеводних компонентів в організмі тварин. Встановлені відмінності вмісту глікопротеїнових компонентів корелюють з тенденцією змін кількості лейкоцитів у крові самиць дослідних груп, що ймовірно говорить про функціональне поєднання цих елементів у процесах прояву імунобіологічної реактивності організму.

Підвищення вмісту церулоплазміну у крові тварин II групи на 2,3 % може свідчити про незначну дію ізофлавонової сої, які мають антиоксидантну активність, на функцію ендогенних антиоксидантних ферментів. У крові

тварин II і III груп знижувався вміст гаптоглобіну в 1,2 раза порівняно з контролем. Це може бути наслідком зниження біосинтетичної функції печінки або ж посилення гемолізу еритроцитів за умов згодовування бобів сої. Враховуючи, що зниження вмісту гаптоглобіну у крові тварин дослідних груп перебувало у межах фізіологічної норми, це ймовірно свідчить про незначне посилення гемолізу еритроцитів у цих тварин.

Об'єктивним показником стану функції відтворення тварин є ефективність їх спаровування, що відображає фертильність експериментальних тварин. Проведеними дослідженнями встановлено, що згодовування традиційної та генетично модифікованої сої самицям щурів за 40 діб до спаровування та протягом вагітності призводить до незначного зниження фертильності самиць обох дослідних груп порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 3). Так, кількість незапліднених самиць щурів у дослідних групах становила 15,4 % від загальної кількості спарованих самиць, тоді як для тварин контрольної групи цей показник був нижчим на 7,1 %. Це може свідчити про негативний вплив компонентів сої, зокрема фітоестрогенів, на фертильність цих тварин.

Кількість плодів на одну самицю контрольної та дослідних груп була в межах фізіологічної норми і коливалася від 7 до 13 плодів. Для самиць III групи цей показник був

Таблиця 3. Характеристика репродуктивної функції самиць шурів, до раціону яких додавали боби нативної та трансгенної сої (M±m, n=6)

Група тварин	Фертильність самиць			Середня кількість плодів на одну самицю	Середня маса плода, г	Загальна маса плодів на одну самицю, г	Коефіцієнт маси плода до маси самиці, г/кг
	Кількість спарованих	Кількість незапліднених	Відсоток заплідненості				
Контроль (I група)	12	1	91,7	9,0±0,68	1,9±0,07	16,4±2,10	6,5±0,46
Тварини, які вживали боби:							
нативної сої (II група)	13	2	84,6	9,2±0,40	1,9±0,17	17,2±1,92	8,1±0,76
трансгенної сої (III група)	13	2	84,6	8,8±0,60	2,2±0,19	18,2±2,64	8,3±0,50

нижчим порівняно з тваринами I та II груп, проте ці зміни не були вірогідні. Середня маса одного плода була найвищою у самиць III групи і перевищувала значення цього показника у тварин I та II груп на 15,8 %. Вищими для тварин III групи були і загальна маса плодів на одну самицю і коефіцієнт відношення маси плода до маси самиці. Однак ці зміни були не вірогідними і можуть бути пов'язані з незначними різницями (1–2 доби) у терміні вагітності.

ВИСНОВКИ

Дослідженнями встановлено, що згодовування самицям шурів бобів сої трансгенного та нативного сортів не викликає вірогідних змін досліджених гематологічних показників їхньої крові порівняно з контролем. Однак зниження вмісту зв'язаних з білками гексоз, сероглікоїдів та гаптоглобіну ($P < 0,05$) у крові тварин II групи, які отримували боби натуральної сої, може свідчити про її інгібувальний вплив на глікопротеїнсинтетичну функцію печінки. У крові тварин, яким згодовували боби натуральної і генетично модифікованої сої вірогідно зростає вміст фукози, що, очевидно, є результатом активації імунної системи організму. Згодовування сої впливає на репродуктивну функцію організму самиць шурів, знижуючи фертильність тварин у дослідних групах і підвищуючи

коефіцієнт маси плода до маси самиці.

Отже, додавання до раціону шурів соєвих бобів натурального та генетично модифікованого сортів більше впливає на вміст таких глікопротеїнів, як сероглікоїди і гаптоглобін та їх окремих вуглеводних компонентів (фукоза, зв'язані з білками гексози), а також на функцію відтворення тварин, проте менше на показники стану імунної системи. Узагальнений аналіз одержаних результатів досліджень, проведених на самицях шурів, дає підстави зробити висновок про відсутність вираженого негативного чи позитивного впливу ГМ-компонентів сої на їх фізіологічний стан порівняно з тваринами, яким згодовували натуральну сою.

О.П. Долайчук, Р.С. Федорук, І.І. Ковальчук

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ НАТУРАЛЬНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИМУННОЙ И РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМ У САМОК КРЫС

Исследовали содержание гликопротеинов, а также их отдельных углеводных компонентов, общего белка, гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, молекул средней массы и циркулирующих иммунных комплексов в крови самок крыс 3-месячного возраста. Проанализировали их репродуктивную функцию и коэффициентов массы плодов при введении в рацион бобов натуральной и трансгенной сои. Исследованиями установлено, что скормливание сои не оказывало существенного влияния на гематологические показатели организма самок крыс опытных групп

в сравнении с контрольной. Показано, что добавление в рацион крыс бобов, традиционной и генетически модифицированной сои, более существенно влияет на содержание гликопротеинов и их отдельных углеводных компонентов, фертильность самок и соотношения массы плода и массы самки, и менее выражено это воздействие на показатели функционального состояния иммунной системы организма самок. Обобщенный анализ полученных результатов исследований, проведенных на самках крыс, позволяет сделать вывод об отсутствии выраженного отрицательного или положительного влияния ГМ-компонентов сои на их физиологическое состояние по сравнению с животными, которым скармливали традиционную сою.

Ключевые слова: гликопротеины, циркулирующие иммунные комплексы, молекулы средней массы, гематологические показатели, крысы, генетически модифицированная соя, воспроизводительная функция.

O.P. Dolaychuk, R.S.Fedoruk, I.I. Kovalchuk

THE IMPACT OF COMPONENTS CONVENTIONAL AND GENETICALLY MODIFIED SOYBEANS ON PARAMETERS OF THE IMMUNE AND REPRODUCTIVE SYSTEMS FEMALE RATS

The article presents results of research of the content of glycoproteins and their specific carbohydrate components, total protein, hemoglobin, erythrocyte, leucocytes molecules of average mass and circulating immune complexes in the blood of female rats under conditions feeding of conventional and transgenic soybeans. Also the reproductive function and mass coefficient of fetus of the studied animals was analyzed. The studies were conducted in three groups of female rats aged 3 months. Animals of I group (control) were kept on a balanced diet during the study period. Animals of groups II and III (research) received a diet according to the scheme of the control group with the addition of 30% from the nutritional value diet native or transgenic soybean, respectively. We found that soy feeding had no significant effect on hematological data in the second and third experimental groups versus control. However, addition to the diet of soybeans, including genetically modified, has a significant impact on the content of glycoproteins and their specific carbohydrate components, female's fertility and less pronounced impact on the data of functional status of their immune system. A generalized analysis of the results of research leads to the conclusion that there is no definite negative or positive impact of GM soy components on their physiological state compared with animals fed native soybeans. Key words: glycoproteins, circulating immune complexes, molecules of average weight, hematological data, rats, genetically modified soybeans, reproductive function.

Institute of Animal Biology, Lviv

Ин-т біології тварин НААН України, Львів

E-mail: dolaychuk@gmail.com

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ващенко В.И., Ващенко Т.Н. Церулоплазмин – от метаболита до лекарственного средства // Психофармакология, биология, наркология. – 2006. – 6, № 3. – С. 1254–1269.
2. Влізлю В.В., Федорук Р.С., Рагич І.Б. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – Л.: СПОЛЮМ, 2012. – с. 764.
3. Гематология: руководство для врачей / Под ред. Н.Н. Мамаева, С.И. Рябова. – СПб.: СпецЛит, 2008. – С. 543.
4. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. – 1981. – №8. – С. 493–496.
5. Громашевская Л. Л. Средние молекулы как один из показателей метаболической интоксикации в организме // Лаб. диагностика. – 1997. – №1. – С. 11–16.
6. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях // Вопр. онкологии. – 2004. – 50, № 5. – С. 515–519.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, 1986. – 53 p.
8. Fournier T. Medjoubi N., Porquet D. Alpha-2-acid glycoprotein // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – 1482, № 1–2. – P. 157–171.
9. Huntoon K., Wang Y., Epplito Ch. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity // J. Leukocyte Biol. – 2008. – 84, № 1. – P. 170–181.
10. Küster B., Hunter A.P., Wheeler S.F., Dwek R.A., Harvey D.J. Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of alpha-acid glycoprotein // Electrophoresis. – 1998. – 19, № 11. – P. 1950–1959.
11. Lowe J.B. Glycosylation, immunity and autoimmunity // Cell. – 2001. – 104, № 6. – P. 809–812.
12. Naito Y. Activation-dependent change in sialic acid species in mouse B cells // Trends Glycosci. and Glyc. – 2009. – 21, № 120. – P. 237–246.
13. Sato C. Chain length diversity of sialic acids and its biological significance trends in glycoscience and glycotecology // Ibid. – 2004. – 16, № 91. – P. 331–344.
14. Thompson G.M., Cantwell J., Cornell C., Turner G.A. Abnormally fucosylated haptoglobins a cancer marker from tumor burden but not gross liver metastasis // Brit. J. Cancer. – 1991. – 64, № 2. – P. 386–390.
15. Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of soybean isoflavone genistein // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1995. – 208, № 1. – P. 124–132.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.10.2012*

Ю.А. Коряк

Изменение сократительных свойств трехглавой мышцы голени и электромеханической задержки под влиянием 120-суточной моделируемой микрогравитации с использованием физической тренировки

Исследовали влияние продолжительного (120 сут) постельного режима в антиортостатическом положении (наклон головы -5°) с применением физической тренировки (ФТ) на сократительные свойства и жесткость мышечно-сухожильного комплекса (МСК) трехглавой мышцы голени (ТМГ) у группы молодых женщин ($n = 4$; 28 лет). ФТ выполнялась 6 дней в неделю на протяжении 14 нед. Продолжительность ФТ составляла 60 мин/день, а за две недели до подъема с постельного режима ФТ выполнялась 2 раза в день по 30–40 мин. Сократительные свойства ТМГ оценивали по максимальной произвольной силе (МПС), силы одиночного сокращения ТМГ в ответ на одиночный супрамаксимальный стимул, приложенный к п. tibialis в области подколенной ямки (Рос), максимальной силы (Ро; частота 150 имп/с), по времени одиночного сокращения (ВОС), времени полурасслабления ($1/2$ ПР) и общему времени сокращения (ОВС). По дельте между МПС и Ро определяли величину силового дефицита (Рд). Скоростно-силовые свойства ТМГ оценивали по относительным показателям развития «взрывного» произвольного и вызванного (непроизвольного) сокращения в ответ на тетаническое ритмическое раздражение п. tibialis частотой 150 имп/с. Жесткость МСК определялась по величине электромеханической задержки (ЭМЗ) при выполнении произвольного «взрывного» сокращения. Использовался специальный таймер, позволяющий синхронно с предъявлением светового сигнала выполнять сокращение мышцы. По механограмме определяли общее время реакции (ОВР), пре-моторное время (ПМВ) и электромеханическую задержку (ЭМЗ). После экспериментальных воздействий с применением ФТ ВОС, время $1/2$ ПР и ОВС ТМГ снизились на 4, 17 и 19 % соответственно относительно контрольных показателей. МПС, Рос и Ро уменьшились в среднем на 3 ($P > 0,05$), 14 и 9 % соответственно. Значение Рд уменьшилось на 10 % ($P < 0,05$). Скорость нарастания электрически вызванного тетанического сокращения существенно не изменялась, но скорость развития произвольного изометрического сокращения увеличилась. ЭМЗ после экспериментальных воздействий в применении ФТ уменьшилась в среднем на 12,2 % ($P < 0,05$), ПМВ и ОВР – на 5,3 и 7,3 % ($P < 0,01$) соответственно. Полученные результаты показывают, что данный комплекс физических упражнений, входящий в состав ФТ, ослабляет негативное влияние механической разгрузки, но объем нагрузки, как и интенсивность, по-видимому, недостаточен, чтобы полностью предотвратить изменения механических свойств мышечного аппарата, хотя и отмечается как нервная, так и мышечная адаптация в ответ на ФТ.

Ключевые слова: постельный режим, физическая тренировка, трехглавая мышцы голени, электромеханическая задержка, мышечно-сухожильная жесткость, сократительные свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что разгрузка скелетно-мышечной системы, вызванная реальной или модели-

руемой микрогравитацией, сопровождается многочисленными неблагоприятными скелетно-мышечными изменениями и, в частности, атрофией мышц, снижением силы сокраще-

© Ю.А. Коряк

ния мышц как после относительно коротких (10–17 сут) [1, 3, 4, 33], так и продолжительных (больше 5 нед) периодов разгрузки [5, 4, 8, 20, 24]. Ухудшение скелетно-мышечной функции непосредственно не представляет опасности для здоровья или работоспособности человека во время кратковременных космических миссий, но после большой продолжительности могут появиться серьезные проблемы при возвращении на Землю, если не противодействовать негативным влияниям микрогравитации. Поэтому предупреждающие меры от развития полной адаптации человека к условиям микрогравитации с поддержанием эффективного функционирования всех его систем, фило- и онтогенетически приспособленных для жизни в условиях гравитационного поля Земли, чрезвычайно важны.

Потенциальным средством для поддержания массы и особенно функций мышц является физическая тренировка (ФТ) [21, 34]. Известно, что высокорезистивные упражнения являются эффективным средством для увеличения размера (или площади поперечного сечения) и силы сокращения мышц [2, 43]. Поэтому ФТ с резистивными упражнениями и с высокой интенсивностью могут успешно использоваться в условиях разгрузки, чтобы противостоять снижению сократительных функций мышц.

Для исследования активности мышц во время выполнения движения регистрируют электромиограмму (ЭМГ). Однако между моментом появления ЭМГ активности мышцы-агониста движения и началом проявления биомеханической силы или движения обнаруживается задержка времени – электромеханическая задержка (ЭМЗ). Сила мышцы регистрируется лишь тогда, когда сократительные ее элементы укорачиваются, растягивая серию эластических компонент (СЭК), участвующих в передаче силы к сухожилию и суставу [18, 19].

Существенные изменения обнаруживаются в показателях ЭМЗ при изменении уровня силы сокращения и, следовательно, в СЭК

[32, 35]. Это поддерживает точку зрения, что время, требуемое для растяжения СЭК, является первичным детерминантом ЭМЗ [35]. Кроме того, структуры СЭК, классически составленные из активной части (расположенной в миофибриллах) и пассивной части (главным образом представленной апоневрозом и сухожилием) [48], которые могут внести свой вклад в ЭМЗ.

ЭМЗ включает время, связанное с электрохимическим возбуждением мышцы, активацией поперечных мостиков и растяжением СЭК [35]. Преобладающий компонент ЭМЗ – это время, требуемое для растяжения эластических компонент мышечно-суставной структуры [12] и, таким образом, является мерой изменения серии эластической жесткости. Известно, что жесткость мышечно-сухожильного комплекса (МСК) увеличивается после тренировки [10, 22, 23] и, следовательно, можно ожидать, что ЭМЗ у испытуемых, применявших ФТ в условиях разгрузки, будет короче по сравнению с обследованными, без ФТ [5].

Изменения в ЭМЗ приписаны, прежде всего, изменениям в жесткости СЭК мышцы. Жесткость мышцы описывается отношением между силой и длиной ее растяжения. Механически жесткая мышца передаст большие силы при очень небольшом растяжении СЭК и, наоборот, механически «поплавная» (или «слабая») ткань требует, чтобы мышца намного больше сократилась, чтобы растянуть СЭК и произвести измеряемую силу. «Послушные» ткани требуют большего количества времени от активации до начала генерирования силы, т.е. их ЭМЗ более продолжительна и укорачивается, когда жесткость мышцы увеличена ее преднапряжением [35, 44]. Таким образом, ЭМЗ может быть критерием различия в жесткости МСК мышцы при различных ее условиях.

Разгрузка вызывает не только снижение массы и функций мышц, что, по-видимому, имеет клиническую важность, но изменяет и другие функционально важные структуры скелетно-мышечной системы, которые

изменяются под влиянием разгрузки и, в частности, в сухожилии, последовательно соединенном с мышцей. Известно, что сухожилие обеспечивает не только структурную связь между мышцей и костью, но выполняет также основную роль в передаче силы, развиваемой сократительными элементами мышцы к скелету. Таким образом, сухожилие способно изменять длину и, соответственно, сила сократительных элементов, включенных последовательно, зависит от степени изменения растяжимости, которой они подвергаются [38, 48]. Степень деформации сухожилия в ответ на сокращение мышцы зависит от механических свойств сухожилия [27, 20, 29], поскольку сухожилие не инертная структура и также как мышца обладает пластичностью к изменению уровня физиологической нагрузки. Механические свойства сухожилия могут быть адаптированы к изменению уровня нагрузки [10, 17, 37, 46, 47]. Так, увеличенная нагрузка сопровождается гипертрофией сухожилия [46, 47]. Таким образом, если разгрузка является причиной снижения МСЖ мышцы, то тогда крайне важно знать, может ли нагрузка (тренировочные упражнения) предотвратить потенциально отрицательный эффект разгрузки.

Цель настоящего исследования, во-первых, оценить эффективность ФТ на сократительные свойства ТМГ у группы молодых женщин для уменьшения негативных влияний механической разгрузки, вызванной продолжительным постельным режимом, и, во-вторых, количественно оценить степень изменения ЭМЗ у обследованных, находящихся продолжительное время на жестком постельном режиме с использованием ФТ.

МЕТОДИКА

Обследовали практически здоровых женщин-добровольцев ($n = 4$) в возрасте $28,0 \pm 1,1$ лет (диапазон 26–31), ростом $162,3 \text{ см} \pm 4,2$ см (диапазон 174–155) и массой тела $59,9 \text{ кг} \pm 2,3$ кг (диапазон 53–62,2). Все женщины

во время предварительного посещения лаборатории были информированы о целях и методах, подробно ознакомлены с процедурами исследования произвольных и электрически вызванных сокращений мышц. После этого каждая из них подписала информированное согласие на участие в эксперименте.

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-вине крови, креатинина, молочной кислоты, билирубина, мочевой кислоты и холестерина, а также оценки физического состояния при выполнении нагрузочного теста на велоэргометре, представляющий непрерывную ступенчато-возрастающую работу с частотой педалирования 60 об/мин и с начальной нагрузкой 50 Вт в течение 3 мин. Нагрузка последующих «ступеней» повышалась на 25 Вт и критерием прекращения работы было достижение субмаксимальных значений ЧСС. Все обследованные клинически были оценены как здоровые и находились в хорошем физическом состоянии, не употребляли медикаментозных средств во время исследования и были некурящими.

Все 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 местной комиссией по биомедицинской этике при Институте медико-биологических проблем.

Постельный режим. В качестве воздействия, имитирующего длительное влияние фактора невесомости, использовали модель постельного режима в антиортостатическом положении (угол наклона головы – 5°). Длительность экспозиции составляла 120 сут.

Обследованные постоянно оставались в антиортостатическом положении, включая прием пищи и выделительные функции. Во время экспозиции на протяжении 24 ч

они постоянно находились под контролем медицинского персонала и дополнительно проводился мониторинг их поведения. Во время транспортировки, выполнении личной гигиены, включая прием пищи, женщины находились под медицинским наблюдением.

Физическая тренировка. Основным средством для тренировки была беговая дорожка в горизонтальном положении. Обследованные были обучены к выполнению физических упражнений динамического характера в положении лежа на спине с использованием специальной системы «притяга» к полотну беговой дорожки (степень «притяга» регулировалась в диапазоне от 0 до 70 кг). Добровольцы приступали к ФТ через 12–16 сут после экспозиции на постельный режим.

ФТ, используемая в длительных космических полетах на российской станции «МИР», включала разминку (ходьба на беговой дорожке в течение 5 мин), бег в медленном (2 мин), умеренном (2 мин) и максимальном темпе (1 мин). ФТ выполнялась на протяжении трех дней, а затем следовал день отдыха [6]. Длительность ФТ составляла 60 мин/сут в течение 6 дней в неделю на протяжении 14 нед. За 2 нед до окончания постельного режима обследованные перешли на двухразовые тренировки в день, продолжительностью каждая по 30–40 мин. Более того, учитывая анатомо-физиологические особенности женского организма, общая нагрузка ФТ была снижена и составляла 70 % от нагрузки мужчин, а при использовании экспандеров, предназначенных для выполнения силовых упражнений, на 25–30 %.

Тестирующая процедура и измерения. Методы и установка для измерения произвольной и электрически вызванной (непроизвольной) силы сокращения отдельной мышцы у человека в условиях *in situ* подробно описаны ранее [3, 4].

Сократительные свойства ТМГ исследовали дважды – за 10–8 сут до начала эксперимента и на 2–3-и сутки после подъема с постельного режима и протокол испытания до

и после постельного режима был идентичен.

Силовые свойства. Сократительные свойства ТМГ оценивали по механическим показателям произвольного и электрически вызванного сокращения (одиночного, парного и тетанического).

Перед выполнением произвольного (при волевом усилии обследованной) сокращения всех женщин инструктировали, как реагировать на звуковой сигнал – «сократить максимально сильно». Им предоставлялось от 2 до 3 попыток максимальных сокращений. Наилучшая из 3 попыток принималась за показатель максимальной произвольной силы (МПС), а если 3-я попытка была наибольшей, то выполнялась 4-я, и если она была большей, то измерение повторяли пока не установится максимум. Интервал отдыха между каждой попыткой составлял не менее 1 мин.

Изометрические одиночные, парные и тетанические сокращения ТМГ вызывали электрическим раздражением *n. tibialis*, используя прямоугольные импульсы длительностью 1 мс супрамаксимальной силы и частотой 150 имп/с [4, 5] от универсального нейромышечного электростимулятора (тип «ЭСУ-1», СССР) через изолирующую приставку. Общая длительность тетанического раздражения составляла ~ 0,5 с.

Для стимуляции *n. tibialis* использовали монополярный электрод – активный электрод (катод) диаметром 1 см устанавливали под коленной ямкой (место наименьшего сопротивления), а пассивный (анод) размером 6 x 4 см – на нижней трети передней поверхности бедра. Большой электрод заземления (Ag-AgCl-пластина 7,5 x 6,5 см) устанавливали в проксимальной части голени между отводящими и раздражающим электродами. Положение стимулирующих электродов подбирали таким образом, чтобы при некоторой «минимальной» силе раздражения регистрировать (по ЭМГ залпу *m. soleus*) наибольший прямой ответ мышцы (М-ответ). В дальнейшем силу раздражения увеличивали в 1,5–2 раза (на 30–40 % больше «минимальной» силы, при

которой впервые достигается максимальный М-ответ), что позволяло использовать супра-максимальную силу раздражения n. tibialis.

Для регистрации М-ответа мышцы применяли поверхностные биполярные чашечные (диаметр 8 мм) Ag-AgCl-электроды с межэлектродным расстоянием 25 мм, которые устанавливали на брюшко m. soleus. Электроды располагали на уровне 6 см ниже головок m. gastrocnemius по средней линии m. soleus. Место постановки регистрирующих ЭМГ электродов тщательно обрабатывалось абразивной пастой и протиралось изопропиловым спиртом. Таким способом уменьшалось межэлектродное сопротивление, которое составляло менее чем 5 кΩ. Амплитуда М-ответа была измерена от пика до пика [39].

Амплитуда сокращения мышцы в ответ на одиночный электрический импульс, приложенный к n. tibialis, являлась показателем изометрической силы одиночного сокращения (P_{oc}), а при тетанической ритмической (частота 150 имп/с) стимуляции n. tibialis – показателем максимальной силы (P_o) сокращения ТМГ [3].

Для количественной оценки степени совершенства центрально-нервных (координационных) механизмов управления произвольным движением рассчитывали силовой дефицит (Рд), определяемый как дельта между P_o и МПС [3, 4].

При парном раздражении второй электрический импульс подавали с интервалом в 3, 4, 5, 10, 20 и 50 мс после первого и определяли максимальную амплитуду второго (суммированного) механического ответа ТМГ [3].

Скоростные свойства. По тендограмме изометрического одиночного сокращения ТМГ в ответ на одиночный электрический импульс, приложенный к n. tibialis, рассчитывали временные показатели развития P_{oc} [3, 4]. Рассчитывали: время от момента раздражения до пика P_{oc} (время одиночного сокращения – ВОС), время от пика до половины расслабления – 1/2 ПР и время от момента раздражения до полного расслабления (общее

время сокращения – ОВС). Точность измерений составляла 2 мс. Тетанический индекс (ТИ) определяли по отношению амплитуд P_{oc} / P_o [3].

Скоростно-силовые свойства. По тендограмме изометрического произвольного сокращения ТМГ, выполненного при условии «сократить максимально быстро и сильно», рассчитывали время нарастания мышечного сокращения до уровня 25, 50, 75 и 90 % от максимума [3, 4, 7]. Произвольное сокращение ТМГ в ответ на световой стимул принималось как «взрывное» баллистическое.

Аналогично по тендограмме электрически вызванного сокращения при стимуляции n. tibialis с частотой 150 имп/с [3, 4] определяли время его нарастания. Точность измерения составляла 2 мс.

Дополнительно в кривой сила–время изометрического произвольного сокращения рассчитывали максимальную скорость (dP_{oc}/dt) нарастания напряжения путем дифференцирования аналогового сигнала [3]. Так же рассчитывали максимальную скорость [dP_{oc}/dt] электрически вызванного сокращения.

Электромеханическая задержка. Обследованным на предъявляемый световой сигнал выполняли подошвенное сгибание стопой при условии «сократить как можно быстро и сильно» [5]. Сигналом к движению «взрывного» характера был световой диод (диаметр 7 мм, 1 Вт), помещенный на расстоянии 1 м перед ней, подаваемый от электронного блока. Длительность сигнала составляла 2,5 с и пауза между сигналами в случайном порядке составляла от 1,4 до 4,0 с.

В исследовании использовался 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 электромеханическая задержка – ЭМЗ), определяемым как временной интервал от момента появления электрической активности мышцы-агониста движения до начала самого движения, т.е. момента развития сокращения [45].

Каждая женщина выполняла три попытки с интервалом отдыха между попытками не менее 1 мин и лучшая попытка использовалась для определения ОВР, ПМВ и ЭМЗ.

Статистика. При обработке полученных результатов исследования использовали общепринятые статистические методы. Весь анализ был выполнен, используя SuperANOVA и StatView статистического пакета. Физические характеристики испытуемых, различия между фоновыми (контрольными) показателями МПС, P_0 , Рд, ТИ, ВОС, 1/2 ПР, ОВС, dP/dt , ЭМЗ, ПМВ, ОВР и времени развития изометрического напряжения ТМГ и показателями, зарегистрированными после подъема с постельного режима, были проанализированы с использованием параметрического критерия t Стьюдента и значение $P < 0,05$ принимали как существенную. Изменения показателей мышечного сокращения до и после постельного режима при использовании парного электрического раздражения с разными межимпульсными интервалами были проанализированы с использованием двухфакторного анализа ANOVA. Данные представлены как средняя и стандартная ошибка средней ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние данные изменения силовых сократительных свойств ТМГ в результате длительной механической разгрузки, вызванной 120-суточным постельным режимом с использованием ФТ, представлены графически на рис. 1 (верхняя панель). Анализ полученных результатов показал незначительное

снижение силовых свойств мышцы. Так, изометрическая P_{oc} уменьшилась в среднем на 13,6 % ($10,3 \pm 1,8$ против $8,9 \text{ кг} \pm 0,7 \text{ кг}$; $P > 0,05$), еще меньше снизилась МПС – на 3,1 % ($35,9 \pm 5,7$ против $34,8 \text{ кг} \pm 2,6 \text{ кг}$; $P > 0,05$) и P_0 – на 9,4 % ($60,6 \pm 6,8$ против $54,9 \text{ кг} \pm 2,6 \text{ кг}$; $P > 0,02$). Рд – показатель степени совершенства центрального нервного произвольного управления мышечным аппаратом, уменьшился в среднем на 10,0 % ($40,2 \pm 8,2$ против $36,2 \text{ \%}$ 5,5 %; $P < 0,05$).

Динамика изменений изометрической силы сокращения ТМГ в зависимости от межимпульсного интервала при парной сти-

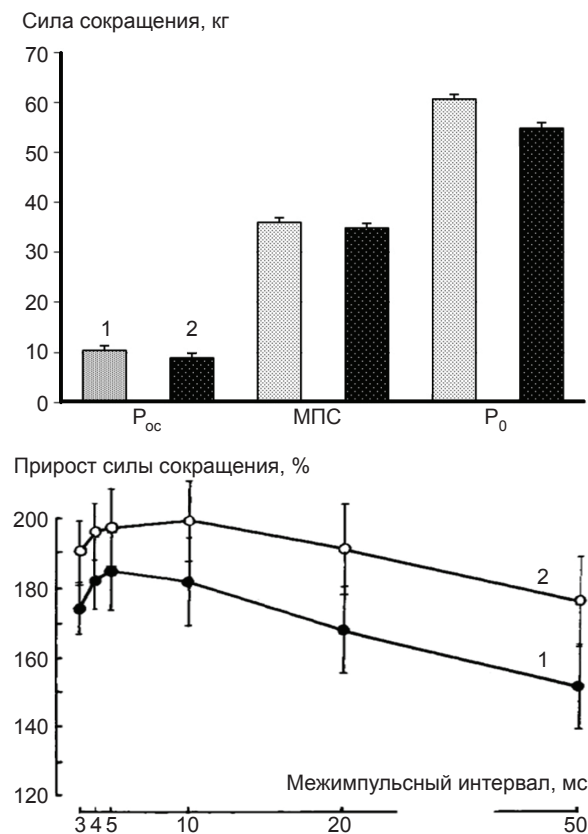


Рис. 1. Влияние 120-суточного постельного режима с применением физической тренировки на силу одиночного изометрического сокращения (P_{oc}), максимальную произвольную силу (МПС), электрически вызванное (или P_0) тетаническое сокращение трехглавой мышцы голени – ТМГ (верхняя панель) и на максимальную силу изометрических сокращений ТМГ при парном раздражении с разными межимпульсными интервалами (нижняя панель): 1 – до; 2 – после тренировки

муляции двигательного нерва, когда второй импульс наносился через 3, 4, 5, 10, 20, 50 мс после первого, графически представлена на рисунке 1 (нижняя панель). Как следует из анализа данных, сила сокращения ТМГ в ответ на второе раздражение при интервалах между импульсами 4–20 мс примерно одинакова, а уменьшение или увеличение межимпульсных интервалов 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 120-суточной механической разгрузки был значительно больше по сравнению с контролем ($P < 0,001$).

Анализ временных показателей развития изометрического Р_{0с} ТМГ (обратная величина скорости сокращения) после 120-суточного постельного режима с применением ФТ показал, что временные параметры сокращения мышцы после разгрузки незначительно изменились (рис. 2). Так, ВОС уменьшилось в среднем на 3,5 % ($135,5 \text{ мс} \pm 11,7 \text{ мс}$ после $130,8 \text{ мс} \pm 6,0 \text{ мс}$), 1/2 ПР и ОВС – на 17,4 % ($101,5 \text{ мс} \pm 10,0 \text{ мс}$ после $94,0 \pm 10,2 \text{ мс}$; $P < 0,05$) и 19,3 %

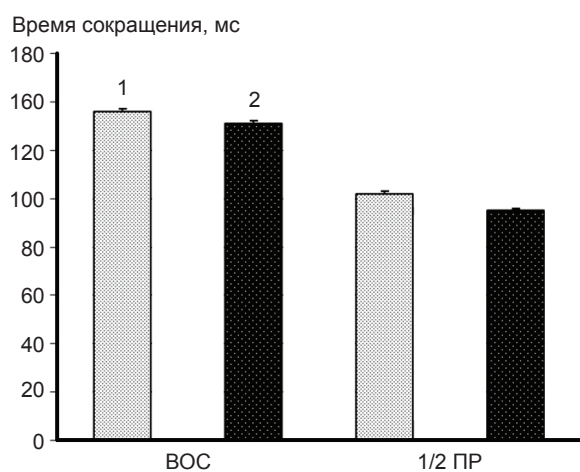


Рис. 2. Влияние постельного режима (120 сут) с применением физической тренировки на время одиночного сокращения (ВОС) и время полурасслабления (1/2 ПР) ТМГ: 1 – до; 2 – после тренировки

($546,8 \text{ мс} \pm 25,3 \text{ мс}$ после $441,3 \text{ мс} \pm 19,8 \text{ мс}$; $P < 0,001$) соответственно.

Косвенный показатель скоростных свойств мышц (ТИ), уменьшился на 15,8 % ($P < 0,05$).

Данные об изменении времени нарастания, или иначе градиент, изометрического сокращения ТМГ графически представлены на рис. 3. Из их анализа следует, во-первых, что скорость нарастания изометрического напряжения ТМГ при произвольном сокращении значительно меньше по сравнению с электрически вызванным сокращением и, во-вторых, форма кривых сила–время различается до и после механической разгрузки. Время достижения любого «относительного» уровня изометрического напряжения после разгрузки с использованием ФТ уменьшилось: отмечается увеличение выпуклости кривой сила–время. Анализ максимальной нормализованной $dP_{ис}/dt$ обнаружил незначительное снижение (в среднем на 8,4 %) по сравнению с исходным значением ($0,83 \text{ %/мс}$ против $0,78 \text{ %/мс}$; $P < 0,001$).

Изучение развития электрически вызванного сокращения не обнаружило существенных различий на всем протяжении

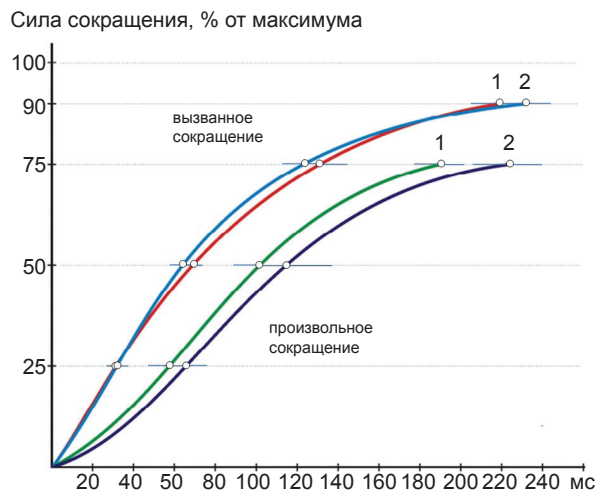


Рис. 3. Усредненные кривые сила–время, выраженные в относительных величинах, при выполнении «взрывного» произвольного и электрически вызванного сокращений ТМГ (частота 150 имп/с): 1 – до и 2 – после 120-суточного постельного режима с применением физической тренировки

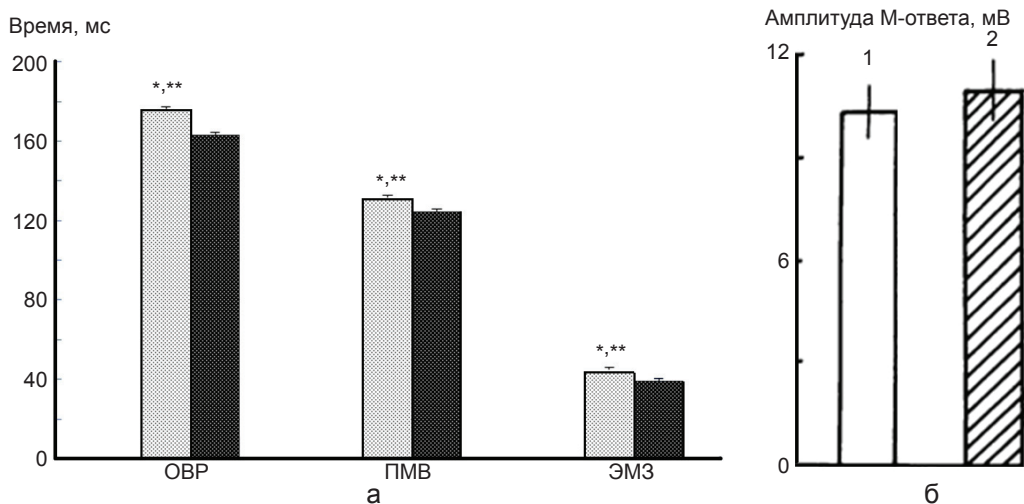


Рис 4. Влияние 120-суточного постельного режима с применением физической тренировки на общее время реакции (ОВР), премоторное время (ПМВ) и электромеханическую задержку (ЭМЗ): на а – (для сравнения символы: * – до; ** – после без физической тренировки (по: 7)). На б – амплитуда поверхностного потенциала действия камбаловидной мышцы

развития изометрического напряжения (см. рис. 3; $P > 0,05$), но вместе с тем отмечается небольшое (в среднем на 14,5 %) увеличение максимальной dP_{vc}/dt по сравнению с исходной величиной (1,17 %/мс против 1,34 %/мс; $P < 0,001$).

ЭМЗ при «взрывном» произвольном сокращении ТМГ на предъявляемый световой стимул была существенно меньше (в среднем на 12,2 %) после продолжительной механической разгрузки по сравнению с исходным значением ($44,9 \pm 2,0$ против $39,4 \text{ мс} \pm 3,1$ мс; $P < 0,05$). Данные ПМВ после механической разгрузки уменьшились в среднем на 5,3 % ($131,8 \pm 6,4$ против $124,8 \text{ мс} \pm 8,1$ мс; $P < 0,01$) и ОВР было меньше в среднем на 7,3 % ($176,2 \pm 9,7$ против $163,4 \text{ мс} \pm 8,3$ мс; $P < 0,01$; рис. 4,а).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые представлены результаты влияния хронической разгрузки на механические свойства мышц-разгибателей стопы у молодых взрослых женщин с использованием ФТ и исследована эффективность программы упражнений на сохранение функции мышц во время разгрузки. Объектом

исследования была ТМГ, поскольку показано, что при разгрузке в большей степени подвергнуты изменениям именно мышцы-разгибатели стопы по сравнению с другими мышцами-разгибателями нижних конечностей [1, 15].

Это исследование рассматривает программу упражнений, выполненную обследованными на протяжении 120 сут жесткого постельного режима, в то время как члены экипажей на борту космической станции применяют аналогичную программу в течение 6 мес. Мы исследовали преимущество этой программы упражнений для того, чтобы защитить различные механические аспекты скелетной мышцы.

Основной результат данного исследования состоит в том, что 120-суточная разгрузка с использованием ФТ сопровождалась несущественным снижением сократительных, в частности силовых, скоростных и скоростно-силовых свойств ТМГ. Так, МПС после 120-суточного жесткого постельного режима с использованием ФТ уменьшилась на 14 %, ВОС – на 4 % и кривая нарастания изометрического произвольного сокращения претерпела меньшие изменения, что подтверждает в целом значимость использования ФТ для поддержания функций мышц, особенно в

условиях их механической разгрузки. Однако, используемая программа тренировочных упражнений, режим выполненных упражнений, полностью не предотвратила отрицательного влияния разгрузки на функции ТМГ.

Меньшее изменение МПС в ответ на разгрузку может означать, что ФТ способствовала не столько относительному сохранению функций мышцы, сколько способствовала повышению роли центральнонервной регуляции, фактором, определяющим МПС. Последнее подтверждается меньшими изменениями Рд, что указывает об увеличении центрального драйва в моторном контроле произвольного движения нервной системой. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными, что ФТ способствует увеличению синхронизации и активации двигательных единиц [31] и позволяет предположить, что нервная адаптация вносит существенный вклад в увеличение МПС, которая отмечается в условиях 120-суточного постельного режима с применением ФТ. Таким образом, ФТ противодействует потере массы мышцы, связанной с неупотреблением, и предотвращает изменения в композиции (составе) мышечных волокон, вызванных неупотреблением [26]. Это согласуется с ранее полученными данными, что сократительная адаптация мышц к ФТ происходит независимо от изменений типа волокон [9]. Поскольку мы не могли количественно определить интенсивность выполняемых упражнений то, вероятно, это и предопределило выполнение членами эксперимента упражнений большего объема, но низкой интенсивности.

Данные по использованию высокорезистивных упражнений с высокой интенсивностью подтверждают их значимость в сохранении функций мышц от атрофии. Так, сбалансированная ФТ, включающая выполнение высокорезистивных и интенсивных упражнений (2–3 дня в неделю) и аэробных упражнений (~ 4 дня в неделю), более эффективна, чтобы сохранить сократительные характеристики мышцы во время продол-

жительного постельного режима [40–42] по сравнению с программой, используемой на космической станции, в частности на Международной космической станции (МКС). Так, тренировки с высокоинтенсивными резистивными упражнениями продолжительностью ~7 мин в неделю во время постельного режима были более эффективны по сравнению с тренировками > 60 мин в неделю членами экипажа на МКС [41], что подтверждает эффективность применения высокоинтенсивных резистивных упражнений в тренировочном процессе в условиях невесомости.

Мы ожидали, что изменения в R_{oc} и R_o будут соответствовать изменениям МПС, а именно увеличением после ФТ и уменьшением при постельном режиме без ФТ [21]. Однако в настоящем исследовании после ФТ R_o даже слегка уменьшилась (~ 9 %) и, таким образом, появляется тенденция для уменьшения отношения R_{oc}/R_o после 120-суточного постельного режима с использованием ФТ. Изменения отношения R_{oc}/R_o может отражать степень изменения растяжимости мышцы. Как указывает клиническая литература неупотребление вызывает увеличение жесткости в мышце и суставе и уменьшение диапазона движения сустава [7]. Уменьшение растяжимости мышцы позволяет более эффективно передавать развиваемое напряжение саркомерами сократительной ткани и, таким образом, отношение R_{oc}/R_o увеличивается. Наоборот, увеличение растяжимости мышцы может быть причиной уменьшения отношения R_{oc}/R_o [25]. Мы предполагаем, что в нашем эксперименте в условиях постельного режима ФТ способствовала в некоторой степени увеличению растяжимости мышцы, что, возможно, является причиной уменьшения R_{oc} .

В настоящем исследовании ФТ выполнялась каждый третий день, что допускает возможность выполнения только двух тренировок в неделю. Более того, учитывая, что общая нагрузка ФТ была снижена (см. «Методику»), то, по-видимому, общий объ-

ем, особенно интенсивность выполняемых упражнений, был недостаточен, чтобы поддержать механические свойства сухожилия ТМГ. Вместе с тем ФТ действительно уменьшала до некоторой степени уровень снижения жесткости МСК по сравнению с разгрузкой без тренировки [5]. Следует отметить, что сухожилие – это не инертная структура, и также как и скелетная мышца показывает пластичность к изменению физиологической нагрузки, иными словами, механические свойства сухожилия могут приспособливаться к изменениям нагрузки.

Во время гравитационной нагрузки (условия Земли) сухожилие ТМГ у человека подвергнуто крайне высокой ритмической нагрузке, благодаря непрерывному применению и перемещению сил мышцы, связанной с активностью «пятки» (перекат с «пятки на носок»), требующей стабилизации, и продвижению тела при движении (ходьбе и беге) [16]. Поэтому во время разгрузки полный объем упражнений (уровень нагрузки, частота и продолжительность) должен превышать пороговый уровень, чтобы полностью предотвратить изменения механических свойств в сухожилии. Во время ходьбы нагрузка, генерированная ахилловым сухожилием, составляет порядка $\sim 210 \text{ кг/см}^2$ [14], т.е. для человека массой 70 кг подъем и опускание массы тела в 1 г привели бы к развитию напряжения в ахилловом сухожилии порядка $\sim 200 \text{ кг/см}^2$. Таким образом, если предположить, что обычная ходьба – это достаточный стимул, чтобы поддержать механические свойства сухожилия при нормальных гравитационных условиях, то пороговая нагрузка ФТ, необходимая для предотвращения любого ухудшения во время разгрузки, возможно, должна приблизиться или превышать массу тела. Следовательно, можно предположить, что если нагрузка, используемая в настоящем исследовании, и была достаточной, однако режим упражнений, выполненный во время разгрузки был значительно ниже частоты нагрузки при обычной ходьбе. Поэтому, по-

видимому, необходимая частота нагрузки должна быть увеличенной, чтобы превысить пороговый объем. Последнее подтверждается исследованием, когда во время 20-суточного постельного режима применялась не только ежедневная ФТ (16 дней из 20), но использовались нагрузки/грузы, приближающиеся к массе тела [8]. Более того, анализируя упражнения тренировочного процесса, используемого в настоящем исследовании, не обнаружено упражнений, направленных непосредственно для тренировки мышц-разгибателей стопы, а учитывая, что общая нагрузка ФТ была сниженной, то все эти факторы в совокупности могут быть основными, если не главными, причинами неполного сохранения функций мышц при их разгрузке.

ФТ и разгрузку обычно связывают с гипертрофией и атрофией мышцы соответственно [26]. В настоящем исследовании мы не делали прямого измерения массы ТМГ, однако амплитуда (пик-до-пика) максимального электрического ответа мышцы (М-ответ), которая является косвенной мерой возбудимости мышечной массы, существенно не изменялась как при тренировке ($10,4 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$), так и при разгрузке ($11,0 \text{ мВ} \pm 1,0 \text{ мВ}$; см. рис. 4, б). Это позволяет предположить, что все-таки в массе мышцы произошли небольшие изменения.

Во многих ежедневных ситуациях способность производить высокую силу мышцы в единицу времени более важна, чем способность ее генерировать. Скорость развития силы зависит от многих факторов, в частности, от продолжительности процесса возбуждение–сокращение, скоростно-силовых характеристик волокон мышцы (даже во время изометрического сокращения из-за деформации структур сухожилия) и жесткости СЭК. Таким образом, причиной уменьшения скорости развития сокращения ТМГ после разгрузки может быть снижение жесткости МСК, поскольку, как известно, жесткость СЭК – важный фактор, определяющий скорость развития мышечной силы [11]. Иными

словами, время растяжения СЭК сократительными элементами определяет величину ЭМЗ [12]. Следовательно, изменения в жесткости МСК, или иначе СЭК, после гиперактивности или гипоактивности главным образом объясняют изменения в ЭМЗ.

В настоящем исследовании обнаружено, что скорость развития изометрического произвольного сокращения, выполненного при условии «сократить как можно быстрее», уменьшилась после разгрузки, что поддерживает теоретическую связь между снижением МСЖ мышцы и уменьшением скорости передачи сократительной силы и, соответственно, скорости развития сокращения, но существенно в меньшей степени по сравнению с аналогичными условиями, но без ФТ (см. рис. 3). Эти впервые полученные результаты указывают на уменьшение этого показателя после ФТ в условиях разгрузки мышечного аппарата и позволяют предположить, что ФТ в условиях разгрузки увеличивает жесткость МСК, в то время как отсутствие тренировки сопровождается снижением этого параметра [5]. Таким образом, ФТ в условиях разгрузки мышечного аппарата уменьшает ЭМЗ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными об уменьшении ЭМЗ после изометрической тренировки в условиях постельного режима [22]. Изменения ЭМЗ при тренировке главным образом приписывают изменениям в структурах сухожилия, но следует отметить, что жесткость сухожилия всегда увеличивается при любой форме физической активности как выносливостной [10], так и изометрической силовой тренировке [22, 23]. Более того, изменения в ЭМЗ тесно коррелируют с жесткостью МСК мышцы, особенно с активной фракцией СЭК при тренировке [13, 30, 36].

Таким образом, настоящее исследование показало, что ЭМЗ – достаточно чувствителен и может быть косвенным маркером измерения жесткости МСК мышцы, чтобы обнаружить хроническую адаптацию мышечно-сухожильной структуры мышцы к меха-

нической разгрузке при использовании ФТ в условиях, моделирующих ее, или в условиях реальной микрогравитации. Полученные результаты указывают, что 120-суточная моделируемая микрогравитация привела к снижению механических свойств ТМГ (МПС, P_0 , ВОС и скорости развития произвольной силы) и, хотя эти неблагоприятные влияния были уменьшены в связи с применением ФТ, однако полностью они не были предотвращены тренировочной программой. Это позволяет предположить, что объем и особенно интенсивность выполняемых упражнений не превышали пороговый уровень, требуемый, чтобы полностью предотвратить изменения в механических свойствах мышцы. В настоящем исследовании программа упражнений ФТ имела главным образом умеренную интенсивность, тем самым повышая аэробную способность, но не силовые, мощностные, сократительные свойства мышц, как исполнительного рабочего, органа. Более того, анализ тренировочного процесса, используемого в настоящем исследовании, показал отсутствие упражнений для целенаправленной тренировки мышц-разгибателей стопы, что может быть дополнительным фактором в снижении сократительных свойств. Кроме того, хорошо известно, что только высокоинтенсивные резистивные нагрузки и/или «взрывные» упражнения представляются особенно перспективным для предотвращения «слабости» мышц [12, 29].

Полученные механические ответы мышцы и перечень упражнений, используемый членами настоящего эксперимента, поддерживают значимость ФТ, необходимой для защиты функций и работоспособности скелетных мышц при продолжительном пребывании в условиях микрогравитации. В настоящем исследовании программа упражнений ФТ имела главным образом умеренную интенсивность. Включение в тренировочный процесс упражнений с большей нагрузкой и высокой интенсивностью способствовало более эффективной программе упражнений для

тренировки скелетных мышц и уменьшило бы общее время тренировки в условиях невесомости. В целом, ФТ в условиях микрогравитации позволяет создать увеличенный функциональный запас, уменьшает влияние разгрузки, наблюдаемое в условиях реальной микрогравитации (космический полет).

Yu.A. Koryak

INFLUENCE OF PHYSICAL TRAINING UNDER CONDITIONS OF 120-DAY SIMULATED MICROGRAVITY ON CONTRACTILE PROPERTIES AND MUSCULO-TENDINOUS STIFFNESS OF THE HUMAN TRICEPS SURAE MUSCLE

The effect of a 120-day -5° head-down tilt (HDT) bed rest with countermeasures (physical training) on the mechanical properties of the human triceps surae muscle was studied in four healthy young women aged 28.0. The results showed that the contractile properties of the skeletal muscle studied changed considerably. After HDT without countermeasures the maximal voluntary contraction (MVC) had decreased by 36 % ($P < 0.05$), and the electrically evoked tetanic tension at 150 Hz (P_o) and isometric twitch contraction (P_t) had decreased by 24 % ($P < 0.05$) and 12 % ($P < 0.05$), respectively. Time-to-peak tension (TPT) of the twitch had significantly increased by 14% ($P < 0.05$), but half-relaxation time (1/2 RT), and total contraction time (TCT) had decreased by 19 % ($P < 0.05$) and 18 % ($P < 0.05$), respectively. The difference between P_o and MVC expressed as a percentage of P_o and referred to as force deficiency (P_d), was also calculated. The P_d had increased by 40 % ($P < 0.001$). The rate of increase of voluntary contractions calculated according to a relative scale had significantly reduced, but for the electrically evoked contraction no substantial changes were observed. After HDT with countermeasures TPT, 1/2 RT and TCT had decreased by 4 %, 7 %, 19 %, respectively in relation to the control condition. Training had caused a decrease of 3% ($P > 0.05$) in MVC, and P_t and in P_o of 14 %, and of 9 % ($P > 0.05$), respectively. The P_d had decreased significantly by 10 % ($P < 0.05$). The rate of increase of electrically evoked tetanic tension did not change significantly during HDT with countermeasures but the rate of increase in isometric voluntary tension development was increased. Physical training provided a reserve of neuromuscular function, which attenuated the effect of bed rest. The experimental findings indicated that neural as well as muscle adaptation occurred in response to HDT with countermeasures.

Key words: head-down bed rest; triceps surae muscle; physical training; contraction properties; musculo-tendinous stiffness; electromechanical delay.

State science Center of Russia, Institute of Medical Biological Problems, RAS, Moscow, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козловская И.Б., Григорьева Л.С., Гевлич Г.И. Сравнительный анализ влияний невесомости и ее модели на скоростно-силовые свойства и тонус скелетных мышц человека // Косм. биологии и авиакосм. медицина. – 1984. – **18**. – С. 22–26.
2. Коряк Ю.А. Функциональные свойства нервно-мышечного аппарата у спортсменов разных специализаций // Физиология человека. – 1993. – **19**. – С. 95–104.
3. Коряк Ю. Адаптация скелетных мышц человека к изменению нагрузки. Экспериментальное исследование / Germany. LAM LAMBERT Acad. Publ. GmbH & Co. KG. – 2011. – С. 402.
4. Коряк Ю.А. Нервно-мышечная адаптация к кратковременным и продолжительным космическим полетам человека. – В кн.: Международная космическая станция Российской сегмент / Под ред. Григорьева А.И., Ушакова И.Б. М.: РАН ИМБРП РАН. – 2011. – **2**. – С. 93–123.
5. Коряк Ю.А. Сократительные свойства и мышечно-сухожильная жесткость трехглавой мышцы голени и их изменения в результате продолжительного постельного режима // Физиол. журн. – 2012. – **58**. – С. 66–79.
6. Степанцов В.И., Тихонов М.А., Еремин А.В. Физическая тренировка как метод предупреждения гиподинамического синдрома // Косм. биология и авиакосмич. медицина. – 1972. – **6**. – С. 64–69.
7. Akeson W.H., Amiel D., Abel M.F., Garfin S.R., Woo S.L. Effects of immobilization on joints // Clin. Orthop. – 1987. – **219**. – P. 28–37.
8. Akima H., Ushiyama J., Kubo J., Tonosaki S., Itoh M., Kawakami Y., Fukuoka H., Kanehisa H., Fukunaga T. Resistance training during unweighting maintains muscle size and function in human calf // Med. Sci. Sports Exerc. – 2003. – **35**. – P. 655–662.
9. Alway S.E., MacDougall J.D., Sale D.G., Sutton J.R., McComas A.J. Functional and structural adaptations in skeletal muscle of trained athletes // J. Appl. Physiol. – 1998. – **64**. – P. 1114–1120.
10. Buchanan C.I., Marsh R.L. Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl // Ibid. – 2001. – **90**. – P. 164–171.
11. Bojsen-Møller J., Magnusson S.P., Rasmussen L.R., Kjaer M., Aagaard P. Muscle performance during maximal isometric and dynamic contractions is influenced by the stiffness of the tendinous structures // Ibid. – 2005. – **99**. – P. 986–994.
12. Cavanagh P.R., Komi P.V. Electromechanical delay in human skeletal muscle under concentric and eccentric contractions // Eur. J. Appl. Physiol. – 1979. – **42**. – P. 159–163.
13. Ducomps C., Mauriege P., Darche B., Combes S., Lebas F., Doutreloux J.P. Effects of jump training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen // Acta Physiol. Scand. – 2003. – **178**. – P. 215–224.

14. Finni T., Komi P.V., Lukkariniemi J. Achilles tendon loading during walking: application of a novel optic fiber technique // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 1998. – **77**. – P. 289–291.
15. Fitts R.H., Riley D.R., Widrick J.J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – **89**. – P. 823–839.
16. Fukunaga T., Kubo K., Kawakami Y., Fukashiro S., Kanehisa H., Maganaris C.N. In vivo behaviour of human muscle tendon during walking // *Proc. R. Soc. London. B Biol. Sci.* – 2001. – **268**. – P. 229–233.
17. Hansen P., Aagaard P., Kjaer M., Larsson B., Magnusson S.P. Effect of habitual running on human Achilles tendon load-deformation properties and cross-sectional area // *J. Appl. Physiol.* – 2003. – **95**. – P. 2375–2380.
18. Hill A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle // *Proc. Royal. Soc. London Series B Containing Papers of a Biological Character.* – 1938. – **126**. – P. 136–195.
19. Hof A.L., van den Berg J.W. EMG to force processing I: an electrical analog of the Hill muscle model // *J. Biomech.* – 1981. – **14**. – P. 747–758.
20. Koryak Yu. Contractile properties of the human triceps surae muscle during simulated weightlessness // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 1995. – **70**. – P. 344–350.
21. Koryak Yu. Effect of 120 days of bed-rest with and without countermeasures on the mechanical properties of the triceps surae muscle in young women // *Ibid.* – 1998. – **78**. – P. 128–135.
22. Kubo K., Kanehisa H., Ito M., Fukunaga T. Effects of isometric training on the elasticity of human tendon structures in vivo // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – **91**. – P. 26–32.
23. Kubo K., Kanehisa H., Kawakami Y., Fukunaga T. Elastic properties of muscle–tendon complex in long-distance runners // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2000. – **81**. – P. 181–187.
24. Lambertz D., Perot C., Kaspranski R., Goubel F. Effects of longterm spaceflight on mechanical properties of muscles in humans // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – **90**. – P. 179–188.
25. Less M., Krewer S.E., Eickelberg W.W. Exercise effect on strength and range of motion of hand intrinsic muscles and joints // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 1977. – **58**. – P. 370–374.
26. MacDougall J.D., Elder G.C.B., Sale D.G., Moroz J.R., Sutton J.R. Effect of strength training and immobilization on human muscle fibres // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 1980. – **43**. – P. 25–34.
27. Maganaris C.N. Tensile properties of in vivo human tendinous tissue // *J. Biomech.* – 2002. – **35**. – P. 1019–1027.
28. Maganaris C.N., Paul J.P. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon // *Ibid.* – 2002. – **35**. – P. 1639–1646.
29. Magnusson S.P., Aagaard P., Dyhre-Poulsen P., Kjaer M. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis in vivo // *J. Physiol.* – 2001. – **531**. – P. 277–288.
30. Malisoux L., Francaux M., Nielens H., Theisen D. Stretch-shortening cycle exercises: an effective training paradigm to enhance power output of human single muscle fibers // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – **100**. – P. 771–779.
31. Milner-Brown H.S., Stein R.B., Lee R.G. Synchronization of human motor units: possible roles of exercise and supraspinal reflexes // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* – 1975. – **38**. – P. 245–254.
32. 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.
33. Narici M., Kayser B., Barattini P., Cerretelli P. Effects of 17-day spaceflight on electrically evoked torque and cross-sectional area of the human triceps surae // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2003. – **90**. – P. 275–282.
34. Nicogossian A.E. Countermeasures to space deconditioning. – In: *Space physiology and medicine / Nicogossian A.E., Huntoon C., Pool S.L., eds. Lea and Febiger, Philadelphia, – 1982. – P. 294–311.*
35. Norman R.W., Komi P.V. Electromechanical delay in skeletal muscle under normal movement conditions // *Acta Physiol. Scand.* – 1979. – **106**. – P. 241–248.
36. Pousson M., Pérot C., Goubel F. Stiffness changes and fibre type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training // *Pflügers Arch.* – 1991. – **419**. – P. 127–130.
37. Reeves N.D., Maganaris C.N., Narici M.V. Effect of strength training on human patella tendon mechanical properties of older individuals // *J. Physiol.* – 2003. – **548**. – P. 971–981.
38. 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.
39. Sica R.E.P., McComas A.J. An electrophysiological investigation of limb-girdle and facioscapulohumeral dystrophy // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* – 1971. – **34**. – P. 469–474.
40. Trappe T.A., Burd N.A., Louis E.S., Lee G.A., Trappe S.W. Influence of concurrent exercise or nutrition countermeasures on thigh and calf muscle size and function during 60 days of bed rest in women // *Acta Physiol.* – 2007. – **191**. – P. 147–159.
41. Trappe S., Costill D., Gallagher P., Creer A., Peters J.R., Evans H., Relley D.A., Fitts R.H. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station // *J. Appl. Physiol.* – 2009. – **106**. – P. 1159–1168.
42. Trappe S., Creer A., Minchev K., Slivka D., Louis E., Luden N., Trappe T. Human soleus single muscle fiber function with exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest // *Amer. J. Physiol.* – 2008. – **294**. – P. R939–R947.
43. Tesch P.A. Training for bodybuilding. – In: *The encyclopedia of sports medicine. Strength and power in*

- sports. (Komi P.A. ed.). Blackwell Oxford. – 1991. – P. 370–380.
44. Vos E.G., Harlaar J., van Schenau I. Electromechanical delay during knee extensor contractions // Med. Sci. Sports Exerc. – 1991. – **23**. – P. 1187–1193.
45. Weiss A.D. The locus of reaction time change with set, motivation and age // J. Gerontol. – 1965. – **20**. – P. 60–64.
46. Woo S.L., Gomez M.A., Woo Y.K., Akeson W.H. Mechanical properties of tendons and ligaments. II. The relationships of immobilization and exercise on tissue remodeling // Biorheology. – 1982. – **19**. – P. 397–408.
47. Woo S.L., Ritter M.A., Amiel D., Sanders T.M., Gomez M.A., Kuei S.C., Garfin S.R., Akeson W.H. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons—long term effects of exercise on the digital extensors // Connect Tissue Res. – 1980. – **7**. – P. 177–183.
48. Zajac F.E. Muscle and tendon: properties, models, scaling, and application to biomechanics and motor control // Crit. Rev. Biomed. Eng. – 1989. – **17**. – P. 359–411.

*Гос. науч. центр РФ – Ин-т мед.-биол. проблем РАН,
Москва, Россия
E-mail: yurikoryak@mail.ru*

*Материал поступил в
редакцию 30.08.2012*

І.Є. Сергєєва

Патогенетична зумовленість призначення пептидаз при генералізованому пародонтиті

Обстежено 76 людей віком від 20 до 50 років обох статей, з них 52 хворих на генералізований пародонтит (ГП) I–II ступеня, загостреного перебігу, і 24 практично здорових людей (контрольна група). Показано, що вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові та у змішаній рідині порожнини рота (ЗРПР) хворих на ГП підвищувався. Особливо слід відмітити підвищення вмісту SLPI (від англ. secretory leukocyte protease inhibitor) у периферичній крові хворих до 53 % та зниження в ЗРПР у 4,2 раза при компенсаторному збереженні концентрації інгібіторів протеаз у секреті привушної слинної залози. Це вказує на домінуючі гіперергічні запальні процеси у тканинах пародонта, які супроводжуються підвищеним протеолізом. Надлишкове накопичення у сироватці крові хворих на ГП інгібіторів протеаз (до 53,2 %) інтерлейкінів – ІЛ (ІЛ-1 β , ІЛ-2 та ІЛ-8 до 26,3, 19,5 та 42,8 % відповідно), фактора некрозу пухлин α – ФНП- α (до 48,3 %) та зниження вмісту інтерферону α – ІФН- α (до 78,1 %) вказують на імунологічні зміни та порушення у функціональному стані комплексу «протеаз-антипротеаз». На підставі результатів імунологічного обстеження обґрунтовується доцільність призначення препарату серапептидази per os хворим на ГП як додаткового лікарського засобу до базової терапії.
Ключові слова: генералізований пародонтит, цитокіни, SLPI (від англ. secretory leukocyte protease inhibitor), фактор некрозу пухлин α , інтерферон α , фагоцитарний індекс, фагоцитарне число.

ВСТУП

Генералізований пародонтит (ГП) характеризується тривалим перебігом, з короткочасними ремісіями та досить частими періодами загострення. Це захворювання зумовлює зниження місцевої та загальної резистентності організму пацієнтів і розвиток аутосенсibiliзації, змінює якість життя та навіть призводить до тимчасової втрати працездатності.

ГП розглядається як вогнище хроніосепсису та потребує застосування антибактеріальних, протизапальних, імунологічних та інших лікувальних засобів. Поліетіологічність цього захворювання зумовлена не стільки домінуючим розвитком біологічних і мікробіологічних факторів, скільки комплексом фізичних, імунних (аутоімунних), біохімічних і метаболічних порушень, що призводять до дисрегуляції на місцевому та системному рівнях [3–6].

У дослідженнях *in vitro* та *ex vitro* було відмічено [1, 2, 13–15], що у пацієнтів, котрі приймали комплекс протеаз (препарат вобензим), у сироватці крові значно зростала продукція мононуклеарами фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) та інтерлейкінів (ІЛ; зокрема ІЛ-1 β , ІЛ-6) – цитокінів, які перші беруть участь у гострій фазі клітинної реакції; одночасно в гранулоцитах спостерігалась інтенсифікація «респіраторного вибуху». Отже, стимулювальна дія протеаз є важливою та необхідною умовою для початкової фази запального процесу [6, 11]. Слід враховувати, що гіперпродукція ІЛ-1 α, β відбувається в умовах стимуляції активного фагоцитозу у місцевих ділянках запалення, проліферації антигенчутливих Т-лімфоцитів, індукції та синтезі прозапальних цитокінів ІЛ-2, ІЛ-4, а також при посиленні експресії рецепторів до ІЛ-2, що надає умови для аутокринної регуляції та проліферації Т-хелперів. Крім того,

© І.Є. Сергєєва

вибір призначення протеаз або антипротеаз буде забезпечуватися певним вмістом ІЛ-1 α , β , ФНП- α та інтерферону α – ІФН- α (в першу чергу їхніми адекватними індикаторними кількісними потенціалами), що сприяє регулюванню розвитку місцевих захисних реакцій у тканинах. Складність цієї ситуації зумовлена багатофакторною дією різних типів клітин крові, ендотелію сполучної тканини та епітелію; результатом є формування типової реакції гострого запалення з її класичними клінічними проявами.

Дослідження функції ІФН- α залежно від конкретної локальної ситуації у місцевих тканинах має істотне значення для визначення перебігу запального процесу [11, 17, 18]. Це пов'язано насамперед з його здатністю сприяти перетворенню незрілих дендритних клітин у зрілі, що супроводжується посиленою експресією цитокінів, хемокінів, молекул міжклітинної адгезії, головного комплексу гістосумісності та коstimуляторів. Було доведено, що з набуттям проліферативних та антипроліферативних властивостей (з урахуванням локальних умов міжклітинного компартмента) ІФН- α буде впливати на функції CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітин [12, 13].

З точки зору імуномодельовального впливу ензимів, первинне зростання кліренсу запальних цитокінів відбувається за рахунок їхнього зв'язування з антипротеазами, насамперед з нативною антипротеазою α 2-M, що змінює кінетику метаболічного утворення цитокінів і забезпечує специфічну спорідненість до ФНП- α [21].

SLPI знаходяться в азурофільних гранулах нейтрофілів і можуть всмоктуватись у фаголізосоми або виходити за межі нейтрофілів під час активації запалення. З іншого боку, ці речовини розглядаються як пусковий момент існуючої протизапальної системи, коли дія кислих макрофагів, а також поглинених апоптотичних клітин і лейкоцитів впливає на запальний процес [21]. SLPI перешкоджає видаленню CD-14 макрофагами, що позитивно впливає на протизапальну функцію макрофа-

гів, посилюючи експресію цитокінів ІЛ-10 та трансформуючого фактора β . Залежно від домінуючої дії ендо- та екзогенних сполук, ендотоксинів, некробіотичних, інфікованих та (або) апоптотичних клітин походження сигналів SLPI можуть бути різноманітними. Водночас механізми дії SLPI є подібними – їхній вплив спрямовується на антиген-презентацію, на функцію дендритних клітин і на контроль ситуації, коли стимулювальна антигенпрезентуюча сполука пошкоджує місцеві клітини та тканини, але імунна відповідь є потенційно більш руйнівною та небезпечною, а тому небажаною [17, 19, 20].

Зважаючи на дані літератури про розвиток запалення у тканинах пародонта та встановлюючи переваги захисних функцій нейтрофілів (НФ), треба мати на увазі, що їхня активація залежить від концентрації хемокінів, цитокінів, мікробної асоціації. З іншого боку, фагоцитоз НФ та їх апоптоз треба розглядати як основну частину запального процесу, тому що своєчасне видалення надлишку активованих НФ перешкоджає деструктивному впливу їхніх ферментів на навколишні клітини та тканини, міжклітинний компартмент [6, 9, 11].

Незважаючи на багатогранність і достатній обсяг даних наукових досліджень щодо призначення препаратів протеолітичних ферментів та інгібіторів-протеаз хворим на ГП [1, 2, 4, 10] питання імунопатогенетичної обґрунтованості цих препаратів залишаються актуальними.

Мета нашого дослідження – визначити функціональний стан комплексу «протеаза – антипротеаза» та розпізнавання імунокомпетентними клітинами умов регулювання запальних процесів на місцевому та системному рівнях у хворих на ГП.

МЕТОДИКА

Обстежено 76 пацієнтів віком від 20 до 50 років: 38 жінок і 38 чоловіків. Згідно з класифікацією захворювань пародонта проф.

М.Ф.Данилевського (1994 р.) встановлений діагноз 52 пацієнтам – ГП I–II ступеня, загостреного перебігу. В контрольну групу ввійшло 24 практично здорових людей.

При обстеженні використані стандартні, клінічні методи діагностики, визначені пародонтологічні індекси, комп'ютерна ортопантомографія зубощелепної системи. Всім пацієнтам проведено дослідження крові: загальний аналіз, карта імунологічного обстеження. Аналізи виконували в порівняльному обсязі, визначаючи тотожні показники у різних біологічних середовищах: на системному рівні – у периферичній крові, на місцевому – у секреті привушної слинної залози та у ЗРПР.

Для імунологічних аналізів досліджували надсадкову частину ЗРПР об'ємом 5 мл після центрифугування (3000 об/хв, 30 хв). Визначали активність фагоцитуючих клітин і нейтрофілів у пародонтальних кишнях та периферичній крові.

Для цитологічного дослідження вмісту пародонтальних кишень був отриманий гомогенат з їхньої лізуючої тканини під час закритого кюретажу, що дало змогу провести мікроскопічне дослідження клітин макрофагальної ланки і визначити фагоцитарний індекс (ФІ) та фагоцитарне число (ФЧ) гранулоцитів.

Як об'єкт фагоцитозу ми використовували добову інактивовану культуру золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*, штам 209).

У пробірку з 0,1 мл 1%-го розчину лимоннокислого натрію додавали 0,2 мл гепаринізованої крові та 0,1 мл 400 млн. суспензії золотистого стафілокока (за методом Г. Фримель). Суміш ретельно перемішували та інкубували в термостаті протягом 30 хв при 37 °С. Після інкубації суміш центрифугували (1000 об/хв, 3 хв) і обережно відбирали верхній шар, який складався з фагоцитуючих клітин, з яких готували препарати. Їх фіксували в суміші Нікіфорова й фарбували, за Романовським–Гімза. Щоб визначити рівень

фагоцитарної активності нейтрофілів, ми підраховували число фагоцитуючих клітин, а для визначення рівня поглинальної здатності – кількість мікробів, поглинутих клітиною (мікробне число).

Вміст прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-8, ФНП- α , ІФН- α та SLPI визначали з використанням імуноферментного методу на аналізаторі STAT-FAX 2100 (США) та тест-системи «Протеїновий контур» (Санкт-Петербург, Росія), «Nucult biotechnology» – Human SLPI ELISA TEST KIT (Нідерланди) згідно з інструкціями фірм-виробників. Отримані результати математично обробляли на персональному комп'ютері з використанням пакету програм «SPSS for Windows». Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента; достовірність вважали об'єктивними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами проведених досліджень встановлено динаміку вмісту імунних показників у хворих на ГП I–II ступеня з загостреним перебігом. У сироватці крові вміст ІЛ-1 β (щодо контрольних значень, спостережуваних у практично здорових осіб тієї самої статі та того самого віку) збільшувався до 26,3% \pm 0,12%, ІЛ-2 – до 19,5% \pm 0,25%, ІЛ-8 – до 42,8% \pm 0,11%, ФНП- α – до 48,3% \pm 0,10%, ФІ – на 10,7%-12,1%, ФЧ – до 14,3%, SLPI – від 35 до 53%, а вміст ІФН α знижувався до 78,1% \pm 0,06% ($P < 0,05$).

Згідно з результатами мікроскопічного дослідження вмісту пародонтальних кишень, ФІ та ФЧ становили 70 \pm 3,2 і 2,43% \pm 2,05% відповідно (контроль 55,5 \pm 0,09 і 1,66% \pm 0,08%; $P < 0,05$).

У секретах порожнини рота, де власне розвиваються запалення та дистрофічні процеси, вміст прозапальних цитокінів та інгібіторів серинових протеаз, а також функціональна активність фагоцитів мають вищий градієнт доказових параметрів. Так, у ЗРПР вміст ІЛ-1 β (порівняно з контролем) зростає

на $47,1\% \pm 0,10\%$, ІЛ-2 – до $38,6\% \pm 0,12\%$, ФНП- α – до $36,7\% \pm 0,13\%$. Концентрація ІЛ-8 збільшувалася в 3,18 раза, вміст SLPI зменшувався в 4,2 раза, а ІФН- α на $58,1\% \pm 0,08\%$ ($P < 0,05$).

У секреті привушної слинної залози значення досліджуваних показників порівняно з їх вмістом у ЗРПР були такими: концентрація ІЛ-1 β зростала на $18,2\% \pm 0,27\%$ ($P > 0,05$), ІЛ-2 до $14,1\% \pm 0,36\%$ ($P > 0,05$; немає достовірно статистичної різниці порівняно з таким показником у ЗРПР). Експресія ІФН- α зменшувалася до $52,1\% \pm 0,09\%$; вміст ІЛ-8 зростав у 1,7 раза ($P < 0,05$). Вміст ФНП- α залишався без змін ($P > 0,1$) і демонстрував тенденцією до зниження (до 1,6%). Коливання вмісту SLPI сягало контрольних значень з тенденцією до зростання від 12,8 до 20% ($P < 0,05$; рис. 1,2,3).

Таким чином, у хворих на ГП I–II ступеня загостреного перебігу відбуваються запальні процеси в тканинах пародонта, про що свідчить достовірне значне підвищення концентрації прозапальних цитокінів у ЗРПР. Визначається компенсаторне накопичення тотожних показників у секреті привушної слинної залози, при одночасному інтегральному помірному зростанні вмісту цитокінів у сироватці крові обстежених. Це передбачає можливість оцінити ці показники, як факто-

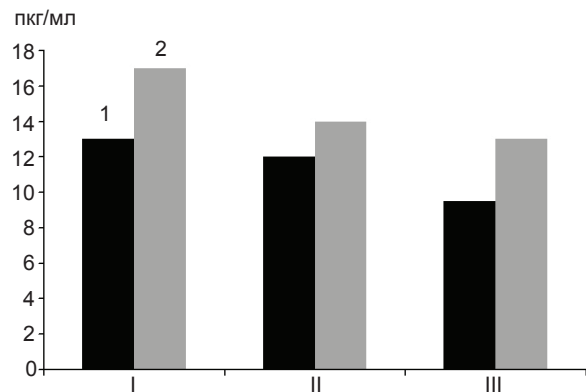


Рис. 1. Динаміка вмісту інтерлейкіну 1 β у хворих на генералізований пародонтит I–II ступеня у порівнянні з контролем: 1 – контроль, 2 – пародонтит; I – кров, II – змішана рідина порожнини рота, III – секрет навколівушної слинної залози

ри, котрі свідчать про розвиток імунодефіцитного стану у порожнині рота, у пародонті, що впливає на перебіг загально-соматичного стану хворих і потребує деталізації діагностики та підвищення протизапальної терапії. Сукупний вплив наслідково-причинних взаємовідносин імунокомпетентних клітин, функціональної активності моноцитарно-макрофагальної системи згідно з експресією медіаторів імунної відповіді ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-8, ФНП- α , ІФН- α дає змогу оцінити вплив фагоцитарної активності місцевої ланки як факторів запалення та реакції імунної системи. Крім того, накопичення SLPI до 53,2% у периферійній крові хворих та утримання концентрації антипротеаз у межах верхньої відмітки контролю з тенденцією зростання до 20% у секреті привушної слинної залози, та при різкому зниженні цього показника в осередках місцевого запалення (ЗРПР) вказують на компенсаторну реакцію організму хворих та на підвищення активності процесів протеолізу у пародонті.

Збільшення ФІ та ФЧ на 44–48 % у вмісті пародонтальних кишень при відсутності достовірної різниці змін у сироватці крові хворих на ГП свідчить про можливу гіперергічну спроможність макрофагальних клітин на місцевому рівні – у зонах запалення. Крім того, підвищене сумарне накопичення ІЛ-8, інгібіторів лейкоцитарних протеаз і

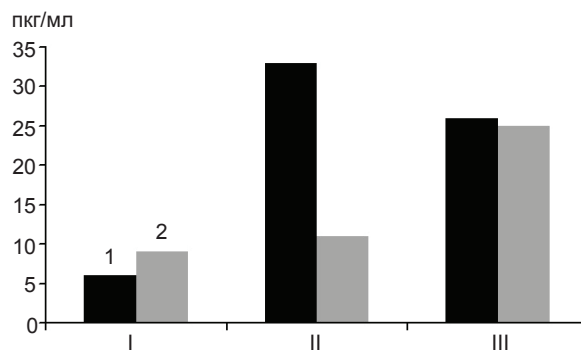


Рис. 2. Динаміка вмісту SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) у хворих на генералізований пародонтит I–II ступеня у порівнянні з контролем: 1 – контроль, 2 – пародонтит; I – кров, II – змішана рідина порожнини рота, III – секрет навколівушної слинної залози

ФНП- α до 50 % у сироватці крові хворих можна розглядати як фактори септикоемії, які, можливо, зумовлені функціональною активністю пародонтопатогенів, антигенів і клітин макрофагальної ланки із комплексу патоморфологічно змінених тканин пародонта. Нейтрофіли, лімфо- та моноцити, котрі контактують з бар'єрними клітинами, епітеліоцитами, антигенами, аутоантигенами підтримують і забезпечують хемотаксис лейкоцитів, активацію ефektorних клітин в осередку запалення, що змінює сумарний вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові. Це можна розглядати як стан порушення функціональної компенсаторної активності місцевого імунітету у хворих при загостренні ГП. Водночас дисбаланс між накопиченням ІФН- α – збільшення його концентрації у 2 рази в ЗРПР при значному зниженні цього показника у секреті привушної слинної залози та у сироватці крові, як медіатора гострої запальної реакції внаслідок адекватної локальної імунної відповіді на пародонтопатогени та їхні токсини, очевидно, може бути пов'язано з активацією дендритних клітин у пародонті.

Установлено, що посилення системи місцевих запальних процесів у пародонті поєднується з процесами всмоктування в

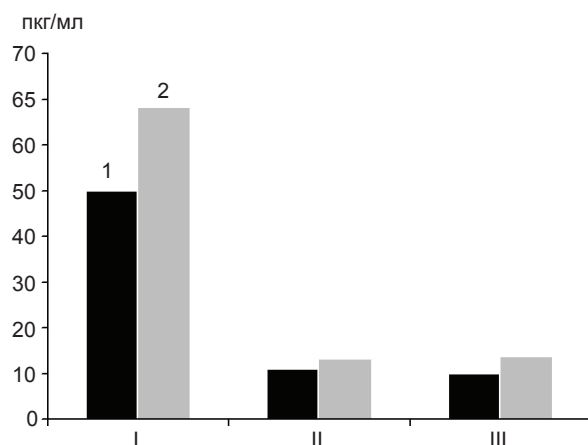


Рис. 3. Динаміка вмісту фактора нейрозу пухлин α у хворих на генералізований пародонтит I–II ступеня у порівнянні з контролем: 1 – контроль, 2 – пародонтит; I – кров, II – змішана рідина порожнини рота, III – секрет навколівушної слинної залози

кров продуктів клітинного розпаду та метаболізму з пошкоджених тканин і перерозподілу рідини в міжклітинному компартменті. Отже, можна дійти висновку, що коригуючи інтенсивність процесів запалення у пародонті та стан системи гомеостазу хворих на ГП I–II ступеня загостреного перебігу, слід зважати на механізми патогенної дестабілізації клітинних мембран. Функціональні макрофаги, виділяючи ферменти, лізують клітинний матрикс, що є факторами прогресування гемодинамічних розладів. Це підтверджуються даними літератури, направлені на визначення чинників регуляторної відповіді [3, 11, 17] гомеостатичного характеру.

Проведені дослідження дають згоду обґрунтувати і визначити необхідність призначення препарату серапептидази, до базового комплексу лікувальних засобів, що зареєстровано державним патентом № 57223 [8]. Насамперед приділяється увага визначенню концентрації антипротеаз SLPI, як в сироватці крові, так і в місцевих секретах порожнини рота (патент №52179) [7]. Виділення серинових антипротеаз SLPI при запальному процесі в пародонті зафіксовано на фагоцитуючих типах клітин. Підтримання поверхневого шару функціонально активних фагоцитів забезпечує рівень нативної імунної відповіді та підтримує міжклітинний компартмент від руйнуючої дії протеази 3, еластази.

SLPI можна розглядати як одну з перших сигнальних реакцій, як і рівень ліпополісахаридів, прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-2), підвищена функціональна активність котрих ресструється в ділянках активації запалення. Антипротеазна активність SLPI направлена на підтримку тканин від патологічної дії ферментів, які висмоктуються з клітин та використовуються при ексудації, альтерації та апоптозі.

Таким чином, при вивченні фізіологічної спроможності SLPI визначена їхня поліфункціональність як індикаторного, сигнального показника. Це забезпечує розширення впровадження медикаментозних засобів, які здатні

розвинути напрямок до базової лікарської дії комплексу антимікробних, антиапоптичних, антизапальних, імунокоригуючих ефектів.

Таким чином, у хворих на ГП I–II ступеня загостреного перебігу підвищується вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІФН- α , ФНП- α), особливо у зонах запалення та спостерігається посилене накопичення ІФН- α та ІЛ-10 у сироватці крові та місцевих осередках, що можна розглядати як розвиток синдрому загальної відповіді. Збільшене накопичення ІЛ-8 в 3,18 разів та ІФН- α на 58% у ЗРПР опосередковано свідчить про розвиток активних запальних процесів у пародонті.

Зниження вмісту інгібіторів пептидаз у ЗРПР у 4,2 разів і збільшення в сироватці крові до 53,2% та в секреті привушної слинної залози в межах контрольних значень у хворих на ГП свідчать про активні протеолітичні процеси у пародонті.

Збільшення вмісту запальних маркерів (насамперед у місцевих діагностичних середовищах та у сироватці крові хворих на ГП) формують синдром системної запальної відповіді, що дає змогу науково обґрунтувати доцільність призначення лікувальних препаратів per os (у нашому випадку – серапептидази) для стабілізації рівноваги системи «протеаза – антипротеаза» з подальшим коригуванням протизапальних процесів у організмі людей.

И.Е. Сергеева

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НАЗНАЧЕНИЯ ПЕПТИДАЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

Обследовано 76 пациентов, из них 52 больных ГП I–II степени, обострившегося течения, и 24 соматически здоровых людей в возрасте от 20 до 50 лет. На основании данных иммунологического обследования обосновано назначение серапептидазы per os, как дополнительного лекарственного средства базисной терапии. Определено повышение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных и в смешанной жидкости полости рта. Отдельное значение имеет увеличение SLPI (от англ. secretory leukocyte protease inhibitor) в периферической крови больных ГП до 53 % и

снижение этого показателя в ЗРПР в 4,2 раза, при компенсаторном сохранении концентрации ингибиторов протеаз в секрете околоушной слюнной железы. Разная концентрация SLPI указывает на доминирующие гиперергические воспалительные процессы в тканях пародонта, сопровождающиеся повышенным протеолизом. Избыточное накопление в сыворотке крови больных ГП ингибиторов протеиназа до 53,2 %, ИЛ-1 β – до 26,3%, ИЛ-2 – до 19,5%, ИЛ-8 – до 42,8%, ФНП- α – до 48,3 %, и снижение содержания ИФН- α до 78,1%, свидетельствует об изменениях состояния комплекса «протеаз-антипротеаз».

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, цитокины, SLPI (от англ. secretory leukocyte protease inhibitor), фактор некроза опухолей α , интерферон α , фагоцитарный индекс, фагоцитарное число.

I.E. Sergeieva

PATHOGENETIC CONDITIONING OF PEPTIDASES ASSIGNMENTS IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH GENERALIZED PERIODONTITIS

76 patients of whom 52 patients with GP-II degree exacerbative and 24 somatically healthy people aged 20-50 years were studied. Based on these immunological examination serapeptidase was assigned per os, as a complementary product to the basic therapy. Any concentration of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) indicates the dominant hyperergic inflammation in periodontal tissues, accompanied by increased proteolysis. Profitable accumulation in the serum of patients with GP inhibitors proteinase to 53%, IL-1 β - to 26.3%, IL-2 - to 19.5%, IL-8 - to 42.8% FNP α - up to 48.3 %, and reduction of IFN α to 78.1% indicates changes of complex “protease-antiproteases” immunocompetent cells and activation of inflammatory processes at the local and systemic levels. Key words: generalized periodontitis, cytokines, SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), TNF- α , IFN- α , phagocytic index, phagocytic number.

National Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веремеенко К.Н. Терапевтическое использование ферментов и их ингибиторов в медицинской практике // Ферменты в народном хозяйстве и медицине. – К., 1971. – Вып.6. – С.221–234.
2. Веремеенко К.Н., Хоменко Л.А., Кизим А.И. Ферменты слюны и их исследования // Лаб. дело. – 1976. – №7. – С.393–398.
3. Григорьян А.С., Грудянов А.И. Ключевые звенья патогенеза заболеваний пародонта в свете данных цитоморфометрического метода исследования // Стоматология. – 2001. – №1. – С.5–8.
4. Данилевский Н.Ф. Хоменко Л.А. Применение ферментов в стоматологии. – К.: Здоров'я, 1972. – 186 с.

5. Косенко К.М., Терешина Т.П. Профилактическая гигиена полости рта. – Одесса: Изд-во КП ОГТ, 2003. – 296 с.
6. Машенко И.С., Сербиненко Е.В. Определение бактерицидного и антиоксидантного потенциала нейтрофильных гранулоцитов у больных генерализованным пародонтитом // Совр. стоматология. – 2003. – №1. – С.51–53.
7. Пат. 52179 МПК G01N 33/48. Спосіб оцінки перебігу генералізованого пародонтиту / Сергеева І.Є. – Опубл. 10.08.10. Бюл. №15.
8. Пат. 57223 МПК А61К 6/00. Спосіб лікування хворих на генералізований пародонтит хронічного та загостреного перебігу / Сергеева І.Є. – Опубл. 10.02.11. Бюл. №3.
9. Сысоев А.С., Левицкий А.П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. – К.:Здоров'я,1979. – 77 с.
10. Хоменко Л.А. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в патогенезе, диагностике и лечении пародонтоза: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – К.,1980. – 44 с.
11. Чумакова Ю.Г. Роль лейкоцитов в патогенезе генерализованного пародонтита: особенности при различных форм заболевания // Вісник стоматології. – 2007. – №1. – С.17–30.
12. Cox S.W., Eley B.M., Kiili M., Asikainen A., Tervahartiala T., Sorsa T. Collagen degradation by interleukin-1-beta-stimulated gingival fibroblast is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases // Oral. Diseases. – 2006. – №12. – P. 34–40.
13. Craandijk J., van Krugten M.V., Verweij C.L., van der Velden U., Loos B.G. Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in relation to periodontitis // J. Clin. Periodontol. – 2002. – №29. – P. 328–334.
14. Delima A.J., Karataz S., Amar S., Graves D.T. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens in reduced by interleukin-1 antagonists // J. Infect. Dis. – 2002. – №186. – P. 511–516.
15. Engebreston S.P., Gibric J.T., Singer R., Lamster I.B. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease // J. Clin. Periodontol. – 1991. – №18. – P. 548–554.
16. Han R., Smith T.J. Induction by IL-1 β of tissue inhibitor of metalloproteinase-9 by human skin // Surgery. – 2005. – №138. – P. 932–939.
17. Hiemstra P.S., Fernie-King B.A., McMichael J. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics // Curr. Pharm. Des. – 2004. – №10. P. 2891–2905.
18. Kinae D.F., Hart T.C. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. – 2003. – №14. – P. 430–449.
19. Mihaila A., Tremblay G.M. Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor // Z. Naturforsch. – 2001. – №56. – P. 291–297.
20. Odaka C., Mizuochi T., Yang J. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response // J. Immunol. – 2003. – №171. – P. 1507–1514.
21. Tralau T., Meyer-Hoffert U., Schroder J.M., Wiedow O. Human leukocyte elastase and cathepsin G are specific inhibitors of C5a-dependent neutrophil enzyme release and chemotaxis // Exp. Dermatol. – 2004. – №13. – P. 316–325.

Нац. мед. ун-т. ім. О.О. Богомольця, Київ
E-mail: mysecondmail2010@yandex.ua

Матеріал надійшов
до редакції 22.11.2012

С.Р. Підручна

Динаміка вмісту відновленого глутатіону в різних тканинах при тяжкій та комбінованій травмі

Вивчали зміни вмісту відновленого глутатіону в патогенезі як тяжкої, так і комбінованої травми. В умовах нашого експерименту у плазмі крові та в тканині печінки, нирок і серця концентрація відновленого глутатіону знижувалася. Слід відмітити, що тварин 2-ї і 3-ї груп з додатковим механічним дефектом і опіком шкіри порушення функціонального статусу системи антиоксидного захисту відбуваються значною мірою порівняно з лише тяжко травмованими тваринами (1-ша група). Найбільш суттєве достовірне зниження (на 34 %) вмісту відновленого глутатіону на 3-тю добу після травми ми зафіксували у печінці тяжко травмованих обпечених тварин. У тварин 1-ї і 2-ї дослідних груп його вміст у печінці зменшувався на 27 та 33,7 % відповідно.

Ключові слова: травма, опік, скальпована рана, антиоксиданти, кров, щури.

ВСТУП

Діяльність сучасної людини здійснюється в умовах зростаючої екстремальності екологічного середовища, коли на організм діють негативні механічні, радіаційні та інші надзвичайні фактори [1–3, 6, 7]. Особливе місце займають травматичні пошкодження різного ступеня тяжкості. Звичним стає твердження про те, що механічна та термічна травми в останні десятиріччя, поряд з онкологічними і серцево-судинними захворюваннями, стали одними із провідних проблем медицини.

Зростаючі темпи індустріального розвитку, безперервний технічний прогрес спричинить одну з актуальних проблем сучасної медицини – політравму. Остання вирізняється складністю діагностики, особливою тяжкістю клінічних проявів, супроводжується значним порушенням життєво важливих функцій організму [10, 11, 13]. На частку постраждалих при політравмі припадає до 60 % загальної кількості травматологічних хворих. Серед пацієнтів переважають особи працездатного віку [4, 9].

Нині загальноприйнята точка зору, що при різних за місцем дії і локалізації травматичної хвороби ключовим внутрішньоклітинним

процесом є порушення структури біомембран, що призводить до дисбалансу діяльності пов'язаних з ними ферментних комплексів. Причому універсальним механізмом пошкодження біомембран при політравмі є активація перекисного окиснення ненасичених жирних кислот фосфоліпідів [5]. Протидіє переокисненню ліпідів біомембран успішне функціонування системи антиоксидантного захисту. Важлива ланка захисту клітин від переокиснення – глутатіонпероксидазна система, яка включає в себе неферментативний компонент відновлений глутатіон. Проте донині до кінця не з'ясована його роль у патогенезі тяжкої та комбінованої травми.

Мета нашої роботи – дослідження ролі відновленого глутатіону при тяжкій та комбінованій травмі.

МЕТОДИКА

В експерименті використано 34 нелінійних білих щурів масою 180–200 г. У 1-й дослідній групі в асептичних умовах під легким ефірним наркозом моделювали тяжку травму, яка передбачала перелом стегнової кістки,

кровотечу зі стегнової вени і введення аутокрові в паранефральну клітковину з розрахунку 1 мл на 100 г маси [8]. У 2-й дослідній групі додатково на депільованій поверхні спини викроювали клаптик шкіри площею близько 10 % її поверхні. На рану накладали стерильну пов'язку. З 3-ї доби рану вели відкритим способом. У 3-й групі тварин моделювали опік на аналогічній ділянці спини III А ступеня за методикою Regas і Ehrlich [14] у нашій модифікації. Відповідно до цієї методики в умовах ефірного знеболювання до депільованої поверхні спини прикладали мідну пластинку площею 28 см², попередньо занурену в киплячу воду не менше ніж на 10 хв. Тварин утримували ізольовано одна від одної. Контрольну групу склали інтактні тварини, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом на 1, 3 та 7-му добу експерименту, дотримуючись принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Для дослідження використовували сироватку крові, гомогенат печінки, нирок і серця. Вміст відновленого глутатіону визначали за Елманом [12]. Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента. Результати вважали достовірними при значеннях $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з результатів, представлених у таблиці, за умов травматичного ураження змінювалася концентрація відновленого глутатіону в тканинах щурів. Через 24 год від початку досліду цей показник як у плазмі крові, так і в гомогенатах печінки, нирок і серця знижувався, особливо в печінці тварин 3-ї групи (32 % нижче від значень інтактних тварин). У 1-й та 2-й групі вміст відновленого глутатіону у печінці знижувався на 19,6 та 28 % відповідно. У тварин 2-ї групи після моделювання тяжкої травми з механічним по-

шкодженням шкіри через 24 год цей показник у печінці знизився на 28 %, плазмі крові та нирках – на 22 %, а у серці – на 18 %. Вміст відновленого глутатіону продовжував достовірно знижуватися до 3-ї та 7-ї доби експерименту в усіх групах і в усіх досліджуваних тканинах щурів. Найбільше його зниження (на 34 %) на 3-тю добу після травми ми зафіксували у печінці тяжко травмованих обпечених тварин. У тварин 1-ї і 2-ї груп вміст відновленого глутатіону у печінці зменшувався на 27 та 33,7 % відповідно. У плазмі крові, нирках та серці спостерігали аналогічну тенденцію. До 7-ї доби вміст досліджуваного показника у печінці 3-ї дослідної групи найістотніше знижувався від рівня інтактних тварин на 39,2 %. У плазмі крові вміст відновленого глутатіону у цей термін в щурів із тяжкою травмою зменшувався на 25,7 %, у тварин із додатковим механічним пошкодженням шкіри – на 30 %, а в обпечених тварин – на 32,7 %. У нирках і серці ми спостерігали аналогічні зміни, але вони були менш виражені.

Порівнюючи динаміку вмісту відновленого глутатіону між групами тварин з тяжкою і комбінованою травмою слід відмітити, що статистично достовірні зміни спостерігалися у плазмі крові та печінці. У групі тяжко травмованих обпечених тварин спостерігалось найістотніше зниження відновленого глутатіону у плазмі крові на 3-ю та 7-му добу з моменту моделювання комбінованої травми. У печінці і нирках цих тварин найбільше зниження цього показника зафіксовано на 1-шу добу ($P < 0,05$). У тварин з політравмою з додатковим механічним дефектом ці зміни були статистично недостовірні.

Таким чином, у патогенезі політравматичного ураження (як тяжкої, так і комбінованої травми) важливу роль відіграють порушення функціонування системи антиоксидантного захисту. В умовах нашого експерименту у плазмі крові та в тканині печінки, нирок і серця знижується концентрація відновленого глутатіону. Порівнюючи зміни, що виникають у тварин 1-ї групи (лише тяжка травма) з та-

Зміна вмісту відновленого глутатіону у щурів на тлі тяжкої і комбінованої травми (M±m)

Модель досліджу	Контрольна група (n=10)	Травмовані тварини (n=8)		
		1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба
Плазма крові, ммоль/л				
Тяжка травма		2,21±0,05***	2,12±0,03***	2,02±0,04***
Тяжка травма і рана	2,72±0,09	2,12±0,04*** P>0,05	1,97±0,06*** P<0,05	1,90±0,07** p>0,05
Тяжка травма і опік		2,03±0,05*** P<0,05	1,89±0,08*** P<0,05	1,83±0,08*** P<0,10
Гомогенат печінки, мкмоль/г				
Тяжка травма		3,12±0,07***	2,83±0,12***	2,65±0,14***
Тяжка травма і рана	3,88±0,09	2,79±0,19*** P>0,05	2,61±0,08*** P>0,05	2,45±0,08*** P>0,05
Тяжка травма і опік		2,64±0,03*** P<0,001	2,56±0,06*** P<0,10	2,36±0,09*** P>0,05
Гомогенат нирки, мкмоль/г				
Тяжка травма		2,13±0,04*	2,06±0,04**	1,94±0,15*
Тяжка травма і рана	2,57±0,18	2,01±0,12* P>0,05	1,98±0,16* P>0,05	1,92±0,13** P>0,05
Тяжка травма і опік		1,98±0,07** P<0,10	1,90±0,08** P>0,05	1,81±0,10** P>0,05
Гомогенат серця, мкмоль/г				
Тяжка травма		1,61±0,05*	1,57±0,05*	1,49±0,06**
Тяжка травма і рана	1,97±0,15	1,61±0,05* P>0,05	1,55±0,04* P>0,05	1,47±0,03*** P>0,05
Тяжка травма і опік		1,58±0,06* P>0,05	1,54±0,06* P>0,05	1,45±0,04*** P>0,05

Примітки. *P<0,005; **P<0,01; ***P<0,001 – достовірність відмінностей стосовно контрольної групи. P – достовірність відмінностей стосовно тварин із тяжкою травмою.

кими у тварин 2-ї та 3-ї груп, зумовленими впливом додаткового механічного дефекту та опіку шкіри, слід відмітити, що в останніх порушення функціонального статусу системи антиоксидантового захисту відбуваються значно більшою мірою, ніж у лише тяжко травмованих тварин.

С.Р. Пидручная

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В РАЗНЫХ ТКАНЯХ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТРАВМЕ

Изучали изменения содержания восстановленного глута-

тиона в патогенезе как тяжелой, так и комбинированной травмы. В условиях нашего эксперимента в плазме крови и в ткани печени, почек и сердца значение этого показателя уменьшалось. Нужно отметить, что крысы 2-й и 3-й групп с илиянием дополнительного механического дефекта и ожога кожи нарушения функционального статуса системы антиоксидантной защиты осуществляются в большей степени по сравнению с результатами у животных 1-й группы с тяжелой травмой. Наиболее существенное достоверное снижение (на 34 %) содержания восстановленного глутатиона, на 3-и сутки после травмы мы зафиксировали в печени тяжело травмированных обожженных животных. У крыс 1-й и 2-й опытной групп значение этого показателя в печени уменьшалось на 27 и 33,7 % соответственно. Ключевые слова: травма, ожог, скальпированная рана, антиоксиданты, кровь, крысы.

S.R.Pidruchna

CHANGES IN THE CONTENT OF REDUCED GLUTATHIONE IN SEVERE INJURIES AND COMBINED TRAUMA

We explored the changes in reduced glutathione in pathogenesis of severe and combined trauma. Under conditions of our experiments both in blood plasma and tissue of liver, kidneys and heart the concentration of reduced glutathione is decreased. Comparison of the changes of glutathione that occur in animals of the first experimental group (only severe group) with the same in animals of the second and the third groups, caused by the influence of extra mechanical defect and skin burn, showed that in the last group the disorders of functional status system of antioxidant protection occur more often than in only severely injured animals. The largest significant decrease (34%) in the content of GSH on the 3rd day after injury we found in liver of seriously injured burned animals. In animals of the first and second groups the content of GSH decreased by 27 and 33.7%, respectively.

Key words: burn trauma, scalped wound, antioxidant, blood, rats.

I. YA. Horbachevsky Ternopil State Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Агаджанян В.В. Политравма: проблема и практические вопросы // Политравма. – 2006. – № 1. – С. 5–8.
2. Анкин Л.Н. Политравма (организационные, тактические и методологические проблемы). – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 176 с.
3. Бойко В.В., Рынденко В.Г., Зайцев А.Е. Политравма: патофизиологические и клинические аспекты, лечебная тактика и принципы организации помощи больным // Междунар. мед. журн. – 2002. – 8, № 3. – С. 68–74.
4. Денисенко В.Н., Бурлика В.В., Король С.А., Бондаренко В.В. Оценка тяжести и прогноз травматического шока у пострадавших с сочетанной травмой // Пробл. військ. охорони здоров'я. – К.: Янтар, 2002– С. 8–15.
5. Долгих В.Т., Ларин А.И., Пилипчук И.А. Метаболические нарушения при критических состояниях // Политравма. – 2007. – № 3. – С. 73–86.
6. Ельский В.Н., Кардаш А.М., Городник Г.А. Патофизиология, диагностика и интенсивная терапия тяжелой черепно-мозговой травмы / Под ред. В.И. Черния. – Донецк: Новый мир, 2004. – 200 с.
7. Косинец А.Н., Дейкало В.П., Никольский М.А., Сиротко В.В. Непроизводственный городской травматизм как медико-социальная проблема // Новые технологии в военно-полевой хирургии и хирургии поврежденных мирного времени. – Материалы междунар. конф. – СПб., 2006. – С. 336-337.
8. Пат. на корисну модель 30028 Україна МПК 2006 G 09 В 23/00. Спосіб моделювання політравми / Секела Т.Я. Гудима А.А. – Терноп. мед. ун-т. – № U 2007 10471; Заявл 21.09.2007; опубл. 11.2.08; Бюл. № 3. – 4 с.
9. Плеханов А.Н., Номоконов И.А., Шагдуров В.А. Эпидемиологические, диагностические и лечебные аспекты сочетанной травмы в современных условиях (хирургия сочетанной травмы). Сообщение 1 // Политравма. – 2007. – № 4. – С. 69–74.
10. Aghafabian N., Zsppincoff A. Emergency Medicine: the cove curriculum // Raven Publishers. – 1998. – № 6. – P. 1490.
11. Avery O., Nathens F., Gregoty Maier P. Effectiveness of State Trauma Systems: a National tvolution // Amer. Associat. Surg. Trauma. – 1999. – № 3. – P. 150.
12. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl grups // Arch. Bioch. and Biophys. – 1959. –82. – P. 70–77.
13. Nast-Kolb D., Aufmkolk M., Rucholtz S. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma // J. Trauma. – 2001. – 51, № 5. – P. 835–841.
14. Regas F.C., Ehrlich H.P. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model // J. Trauma. – 1992. – 32, № 5. – P. 557–563.

*ДВНЗ «Терноп. держ. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України»
svetic67@mail.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 02.10.12*

Н.Є. Лаповець

Зміни показників гуморального імунітету при абдомінальному туберкульозі

Визначали вміст інтерлейкіну 1 β (ІЛ-1 β), інтерлейкіну 8 (ІЛ-8) і туморнекротичного фактора α (ТНФ- α), а також показники гуморального імунітету в сироватці крові хворих на абдомінальний туберкульоз до і після проведення імунопровокаційної проби Коха. Після проведення проби вміст ТНФ- α підвищився у 2,5 рази, а вміст ІЛ-8 знизився майже вдвічі порівняно зі значеннями до проведення проби. Концентрація ІЛ-1 β після імунопровокації знизилася втричі. Встановлено, що імунопровокаційна проба Коха загострює патогенетичні прояви хронічного запального процесу, що проявляється змінами цитокінового спектра крові та дає змогу уточнити діагноз абдомінального туберкульозу.
Ключові слова: цитокіни, гуморальний імунітет, абдомінальний туберкульоз.

ВСТУП

Нині туберкульоз займає перше місце серед причин смертності від інфекційних захворювань і стає вагомою причиною інвалідизації та соціальної дезадаптації хворих [9, 11], насамперед абдомінальний туберкульоз (АТ) [1, 2]. Запальні процеси органів черевної порожнини зазвичай поліетіологічні, що визначає особливості окремих механізмів їх перебігу, а отже, потребує відповідної тактики лікування [3, 7]. У цьому контексті дуже важливим для збереження здоров'я пацієнта є вміння лікаря віддиференціювати гострий запальний процес від загострення хронічного запалення, особливо специфічної природи, як туберкульоз [6]. Хронічне запалення туберкульозної етіології перебігає, як правило, на фоні вторинного імунодефіциту, що призводить до прогресування специфічного процесу і залучення нових чинників патогенезу [5, 12].

Збільшення числа хворих на АТ, труднощі діагностики, розширення обсягу оперативних втручань диктують необхідність пошуку нових патогенетично обґрунтованих методів раннього виявлення недуги.

В останні роки для діагностики активного

АТ широко використовують підшкірну пробу Коха у поєднанні з різними лабораторними дослідженнями (біохімічними, імунологічними, бактеріологічними). Ця проба важлива при визначенні прихованої активності специфічного процесу, а також при диференційній діагностиці специфічного і неспецифічного процесу. Поєднання імунопровокаційної проби Коха з іншими методами дослідження дає змогу більш достовірно діагностувати туберкульоз. Цитокіни як медіатори запалення віддзеркалюють тип запального процесу, який розвивається в кожному конкретному випадку [8]. За даними літератури суттєвих змін при хронічних запальних процесах зазнає вміст інтерлейкіну 1 β (ІЛ-1 β), інтерлейкіну 8 (ІЛ-8) і туморнекротичного фактора α (ТНФ- α) [3, 8, 12, 13].

Метою нашої роботи було дослідити зміни вмісту ІЛ-1 β , ІЛ-8 та ТНФ- α і показників гуморального імунітету у сироватці крові хворих на АТ до і після проведення імунопровокаційної проби Коха.

МЕТОДИКА

Обстежуваними були чоловіки та жінки (70 осіб) віком від 18 до 55 років, хворі на АТ, а

також 20 практично здорових осіб. Хворим на АТ здійснювали імунопровокаційну пробу Коха. Венозну кров у них забирали до і через 72 год після проведення проби, яка полягає в підшкірному введенні на спині у проекції лівої лопатки 20 туберкулінових одиниць очищеного туберкуліну.

У сироватці крові визначали вміст ІЛ-1 β , ІЛ-8 та ТНФ- α , а також імуноглобулінів А, G, М (IgA, IgG, IgM) і циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). Вміст інтерлейкінів визначали за допомогою набору реагентів фірми "Diaclone" (Франція). Концентрацію імуноглобулінів IgA, IgG, IgM досліджували за допомогою радіальної імунодифузії в гелі, а вміст ЦІК методом преципітації в поліетиленгліколі [10].

Статистичне опрацювання результатів дослідження виконано з застосуванням методів параметричної (варіаційної) статистики з додержанням умов щодо оцінки типу розподілу. Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм t Стьюдента. Для статистичної обробки матеріалу звикористовували комп'ютерний пакет програм STATISTICA 6 (Statsoft, США) [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що у сироватці крові хворих на АТ вміст інтрелейкінів зазнав вірогідних змін (таблиця). Так, концентрація ІЛ-1 β , ІЛ-8 та ТНФ- α перевищувала ($P < 0,05$) значення контролю в 5,6; 10 і 3,5 раза відповідно.

У хворих на АТ спостерігається активація гуморальної ланки імунітету. У них вірогідно вищий вміст IgA, IgG та існує тенденція до зростання концентрації IgM (див. таблицю), порівняно зі значеннями у практично здорових людей. Вміст ЦІК практично залишається в межах норми, що пов'язано, на нашу думку, із знаходженням їх в уражених органах черевної порожнини. Ми виявили наявність вторинної імунної відповіді у хворих на АТ, що вказує на загострення хронічного запального процесу та корелює з клінічною картиною захворювання.

Дуже цікавий розподіл досліджуваного вмісту інтерлейкінів (ІЛ-1 β , ІЛ-8, ТНФ- α) спостерігався після проведення імунопровокаційної проби Коха. Вміст ТНФ- α істотно підвищився у 2,5 раза. Цей інтерлейкін продукується клітинами тільки у відповідь

Показники гуморального імунітету та вмісту інтерлейкінів 1 β , 8 та туморнекротичного фактору α у сироватці крові хворих на абдомінальний туберкульоз до і після проведення проби Коха (M \pm m)

Показник	Контрольна Група	Хворі на абдомінальний туберкульоз	
		до проведення проби Коха	після проведення проби Коха
Інтерлейкін 1 β , пг/мл	4,86 \pm 0,9	27,42 \pm 1,8*	9,00 \pm 0,8**
Інтерлейкін 8, пг/мл	2,0 \pm 0,2	20,39 \pm 2,3*	12,17 \pm 1,05**
Тумор некротичний фактор α , пг/мл	4,97 \pm 1,18	17,57 \pm 0,95*	49,85 \pm 1,2**
Імуноглобулін А, г/л	1,98 \pm 0,06	3,16 \pm 0,16*	3,17 \pm 0,15*
Імуноглобулін G, г/л	13,49 \pm 0,34	18,06 \pm 1,74*	20,62 \pm 0,95*
Імуноглобулін М, г/л	1,44 \pm 0,06	2,48 \pm 0,29	1,95 \pm 0,15
Циркулюючі імунні комплекси, ум.од.	85,28 \pm 6,0	94,91 \pm 5,29	92,63 \pm 8,8

* $P < 0,05$ – вірогідність відмінності в порівнянні з контролем; ** $P < 0,05$ – в порівнянні з показниками у хворих до проведення проби Коха.

на дію індуктора [13]. Туберкулінова імунопровокація (проба Коха) і є тим індуктором, що спричинив значне зростання вмісту цього інтерлейкіну. Водночас вміст ІЛ-8 знизився майже вдвічі, що пов'язано, на нашу думку, з його місцевим використанням, оскільки він здатний активувати клітини у вогнищі запалення. Після проби Коха вміст ІЛ-1 β , який був значно вищим від значень у здорових осіб, знизився втричі. Відомо що основна його біологічна роль є медіаторною, він забезпечує взаємодії різних захисних запальних механізмів на рівні цілісного організму.

Показники гуморального імунітету після проведення проби Коха практично не зазнали змін.

Таким чином, для виявлення прихованої активності АТ у поєднанні з пробю Коха краще проводити визначення цитокінового спектра сироватки крові.

ВИСНОВКИ

1. Імунопровокаційна проба Коха загострює патогенетичні вияви хронічного запального процесу, що проявляється зміною цитокінового спектра крові і дає змогу уточнити діагноз АТ.

2. Дослідження цитокінового профілю сироватки крові хворих на АТ є перспективним для покращення діагностики.

Н.Е. Лаповец

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ АБДОМИНАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Определяли содержания интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина 8 (ИЛ-8) и туморнекротического фактора (ТНФ- α), а также показатели гуморального иммунитета в сыворотке крови больных абдоминальным туберкулезом до и после проведения иммунопровокационной пробы Коха. После проведения пробы содержание ТНФ- α повысилось в 2,5 раза, а ИЛ-8 снизилось почти вдвое в сравнении со значением до проведения пробы. Концентрация ИЛ-1 β после иммунопровокации уменьшилась втрое. Установлено, что иммунопровокационная проба Коха обостряет патогенетические проявления хронического воспалительного процесса, что проявляется изменениями цитокінового спектра крові и позволяет уточнить диаг-

ностику абдоминального туберкулеза.

Ключевые слова: цитокины, гуморальный иммунитет, абдоминальный туберкулез.

N.E. Lapovets

CHANGES IN THE LEVELS OF INTERLEUKINS AND HUMORAL IMMUNITY BEFORE AND AFTER KOCH'S TEST IN PATIENTS WITH ABDOMINAL TUBERCULOSIS

We measured the levels of IL-1 β , IL-8, and TNF- α , as well as humoral immunity in blood serum of patients with abdominal tuberculosis before and after Koch's test. The content of TNF- α increased 2.5 times, the content of IL-8 decreased almost twice, and concentration of IL-1 β decreased three times compared to the controls. We found that Koch's test exacerbates pathogenic manifestations of chronic inflammation which shows changes in cytokine spectrum of blood and allows us to refine diagnosis of abdominal tuberculosis.

Key words: cytokines, humoral immunity, abdominal tuberculosis.

Danylo Halytskyy National Medical University, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Армякина О.Л., Савоненкова Л.Н. Выявление абдоминального туберкулеза в лечебных учреждениях общей сети и специализированной службы // Клин. медицина. – 2010. – №2. – С.53–57.
2. Батыров Ф.А., Матросов М.В., Скопин М.С. Сложный случай диагностики и лечения абдоминального туберкулеза // Рос. мед. журн. – 2009. – № 1. – С. 56.
3. Бехало В.А. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления (обзор литературы) // Иммунология. – 2009. – № 3. – С.184–189.
4. Боровиков В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов – СПб: Питер, 2001. – 656 с.
5. Бурухина Л.В. Случай внелегочного полиорганного туберкулеза // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 3. – С. 61–63.
6. Галієнко Л.І. Медико-соціальні аспекти проблеми туберкульозу в Україні і країнах Європейського регіону ВООЗ // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця. – 2008. – № 2/3. – С. 72–76.
7. Зинчук А.Н., Герасун В.А., Шевченко Л.Ю. Случай абдоминального туберкулеза: сложности диагностики // Пробл. туберкулеза. – 2002. – №8. – С.56–57.
8. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины.– СПб.: ООО «ИЗ-ВО ФОЛИАНТ», 2008. – С. 117–123.
9. Кондратьева М.Е., Стаханов В.А. Влияние социальной поддержки на эффективность лечения больных туберкулезом // Рос. мед. журн. – 2009. – № 1. – С. 17–19.

10. Лаповець Л.Є., Луцик Б.Д., Лебедь Г.Б., Акімова В.М. Посібник з лабораторної імунології. – Львів: ФОП Сорока С.В., 2008. – 268 с.
11. Фещенко Ю.І., Мельник В.М. Медичні аспекти боротьби з туберкульозом // Укр. пульмонол. журн. – 2005. – №2. – С.5–8.
12. Ширинский В.С., Старостина И.М., Сенникова Ю.А., Малышева О.А. Проблемы диагностики и классификация вторичных иммунодефицитов // Аллергология и иммунология. – 2002. – **10**, № 1. – С. 62–71.
13. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more // Ann Rheum Dis. – 2005. – **64**, № 4. – P. 24–28.

Нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького, Львів
E-mail: natla@ukr.net

Матеріал надійшов
до редакції 01.10.2012

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

Корекція порушень кардіодинаміки при експериментальному діабеті за допомогою ω -3 поліненасичених жирних кислот

В експериментах на серцях щурів in vivo за допомогою системи реєстрації тиску–об'єму «Millar Instruments» вивчали порушення кардіодинаміки при експериментальному діабеті за їх корекцію ω -3 поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК). Виявлено, що застосування ω -3 ПНЖК у тварин з цукровим діабетом може покращувати показники кардіодинаміки – насосну та діастолічну функції. Ключові слова: кардіогемодинаміка, цукровий діабет, ω -3 ПНЖК.

ВСТУП

Термін «діабетична кардіоміопатія», що був уперше запропонований Rubler у 1972 р., описує порушення функцій міокарда за відсутності гіпертензії, ішемічної хвороби чи клапанних вад серця. Водночас з 70-х років ХХ ст. відомо про ω -3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), які вважаються потужними кардіопротекторами. Незважаючи на успіхи діабетології, досі нерозкритими залишаються механізми впливів ω -3 ПНЖК на порушення діяльності серця за умов цукрового діабету (ЦД).

Мета нашої роботи – оцінити ефекти ω -3 ПНЖК на показники кардіогемодинаміки щурів при експериментальному ЦД.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 140–200 г, віком 3 міс. ЦД моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину («Sigma», США). Препарат розводили 0,1-молярним цитратним буфером (рН 4,5) і вводили тваринам внутрішньоочеревинно із розрахунку 50 мг/кг. Розвиток гіперглікемії контролювали за підвищенням

© А.С. Жуковська, А.М. Шиш, М.О. Кузьменко

вмісту глюкози в крові, який вимірювали за допомогою стандартного набору (глюкометр і тест-смужки Accu-Chek Active, «Roche», Німеччина). Експерименти виконані на тваринах, у крові яких вміст глюкози 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 підвищення вмісту глюкози в крові почали давати препарат епадол протягом 4 тиж у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла (n=18). Епадол містить 45 % ω -3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру). Через 4 тиж після досліду тварин зважували та декапітували.

Щурів наркотизували за допомогою уретану, фіксували та препарували праву сонну артерію. Калібрували стандартний 2F-катетер для реєстрації тиску (SPR-838; «Millar Instruments», США) за об'ємом, за допомогою занурення його до кювети (P/N 910-1048), залитою кров'ю щура з додаванням гепарину. Ультрамініатюрний катетер вводили через праву сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок (ЛШ), що давало змогу одночасно реєструвати тиск і об'єм ЛШ з візуалізацією кривих залежності цих показників протягом серцевого циклу. Для

запису показників гемодинаміки в умовах закритої грудної порожнини використовували програмне забезпечення Chart™ v.5.4.2 (ADInstruments, “Millar Instruments”, США) [4]. Співвідношення тиск–об’єм ЛШ аналізували за допомогою пакета програм PVAN 3.6 (ADInstruments, «Millar Instruments”, США). Розрахунки велися, враховуючи початкові і повторні значення калібрування катетера приладу MPVS 400 Systems. Було записано показники базової гемодинаміки в реальному часі, а саме максимальний і мінімальний тиск, частоту серцевих скорочень (ЧСС), об’єм ЛШ, а також перша похідна тиску – dP/dt_{max} на основі розшифрування кривих, що описують залежність тиску та об’єму протягом кожного серцевого циклу.

Основні гемодинамічні показники для зручності було згруповано і, таким чином, проаналізовано насосну, діастолічну функцію, скоротливість, перед- та постнавантаження серця. Також зроблено висновки про зміни кінцево-систоличного (КСТ) та кінцево-діастолічного тиску (КДТ), кінцево-систоличного (КСО) та кінцево-діастолічного об’єму (КДО).

Для дослідження незалежних від навантаження показників кардіодинаміки було проведено тимчасову оклюзію *vena porta* через невеликий розріз черевної порожнини, нижче мечоподібного відростка. Ця операція дала можливість проаналізувати значення жорсткості міокарда (JM_{max}), максимальний резерв скоротливої активності серця, використовуючи відносно незалежні від перед- та постнавантаження індекси.

За допомогою газохроматографічного методу визначали жирнокислотний склад клітинних мембран [1]. Вірогідність різниці середніх значень ($P < 0,05$) визначено за критерієм *t* Стьюдента та тесту ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При розвитку експериментального ЦД концентрація глюкози у крові щурів достовірно

збільшувалася (у щурів II групи вона становила $33 \pm 0,01$, а у контрольних – $7,8$ ммоль/л $\pm 0,2$ ммоль/л, $P < 0,05$). Застосування ω -3 ПНЖК (III група) «пом’яксувало» гіперглікемію ($19,2$ ммоль/л $\pm 2,7$ ммоль/л, $P < 0,05$). Слід відмітити, що у тварин з розвиненим ЦД знижувалася маса тіла ($177,5$ г ± 8 г, $P < 0,05$ щодо контролю – $232,85$ г $\pm 6,15$ г), а застосування ω -3 ПНЖК запобігало цьому ($219,7$ г $\pm 12,65$ г, $P < 0,05$).

Розвиток ЦД (II група) призводив до суттєвого збільшення вмісту арахідонової кислоти (на 71 %, $P < 0,05$) та деякого зменшення вмісту α -ліноленої кислоти порівняно з контролем. Застосування епадолу у тварин III групи поряд зі збільшенням вмісту α -ліноленої кислоти більше ніж удвічі (на 157,2 %) значно зменшувало вміст арахідонової кислоти (на 28,8 %, $P < 0,05$).

Експериментально встановлено, що розвиток ЦД негативно впливає на насосну функцію серця. Нами показано (таблиця) вірогідне зниження ударного об’єму (УО) на 35,65 % у тварин через 4 тиж після ін’єкції стрептозоточину порівняно з контролем. Під впливом ω -3 ПНЖК відмічено достовірне збільшення УО на 40,76 % порівняно з II групою. За умов ЦД спостерігалась тенденція до зростання ЧСС і вірогідне зменшення фракції викиду (ФВ) на 29,12 % ($18,774$ % $\pm 1,94$ %). Вживання ω -3 ПНЖК викликає достовірне зниження ЧСС на 19,76 % і підвищення ФВ на 35,37 %. Логічним результатом зменшення УО став нижчий показник хвилинного об’єму крові (ХОК), його значення при ЦД були зниженими на 36,78 % порівняно з контролем.

Таким чином, суттєве зменшення насосної функції серця при ЦД значною мірою коригується у тварин за допомогою модифікації клітинних мембран ω -3 ПНЖК. Порушення насосної функції ЛШ могло бути пов’язано як зі змінами діастолічного розслаблення, так і систолічного скорочувального процесу. Дані літератури з цього приводу неоднозначні [5, 7].

Для аналізу змін діастолічної функції серця було використано значення dP/dt_{min} ,

КДТ, КДО, їх відношення, константу тривалості періоду ізovolюмічного розслаблення τ , розраховану за методом Weiss (τ -W) [6], показник жорсткості міокарда (JM_{\max}). Всі показники діастолічної функції серця свідчили на користь значного її порушення при ЦД: зростання КДТ (в 2,2 раза) поряд зі зменшенням КДО, що свідчило про збільшення жорсткості міокарда (КДТ/КДО), і зменшення заповнення ЛШ в період діастолі. На користь саме таких даних діастолічної функції – значне зменшення значення τ -W та зростання JM_{\max} (див. таблицю).

Водночас зміни показників скоротливості міокарда свідчили про її збереження, або навіть збільшення при ЦД, а саме: значне зменшення КСО поряд зі збільшенням КСТ і JM_{\max} , а також збільшення максимальної швидкості підвищення тиску в систолі (dP/dt_{\max}). Такі ха-

рактеристики показників скоротливої функції, з нашої точки зору, свідчили про включення компенсаторних процесів, спрямованих на підтримання серцевого викиду в умовах значного погіршення діастолічної функції. Можливим механізмом такої реакції є підвищення тону симпатичної нервової системи та стимуляція адренергічних впливів. Слід зауважити, що подібні зміни деяких значень скоротливості міокарда спостерігалися при моделюванні діастолічної дисфункції серця при його тампонаді [2], а також при ремоделюванні серця за допомогою ізопротеренолу [3]. Цікаво, що ефективність підвищення скоротливості міокарда вірогідно залежить не тільки від ізотропних впливів, а й від ступеня діастолічної дисфункції, зокрема жорсткості міокарда [2].

Як видно з таблиці, порушення кардіодинаміки при ЦД тією чи іншою мірою норма-

Показники кардіогемодинаміки у щурів дослідних груп

Показники	Контроль (n=5)	Цукровий діабет (n=5)	Цукровий діабет і ω -3 ПНЖК (n=6)
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	406,885±8,3	416,455±3,6	334,172±9,166**
Кінцево-систолічний об'єм, мкл	474,986±16,755	404,995±12,571*	401,106±12,152
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	571,014±17,819	463,748±22,482*	504,580±22,595
Кінцево-систолічний тиск, мм рт.ст.	108,955± 4,168	114,4168±2,578	124,69±6,083
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	2,675± 1,178	6,02±0,615*	2,185±0,665**
Ударний об'єм, мкл	157,341±7,287	101,249±12,826*	142,522±13,753**
Фракція викиду, %	26,487±0,567	18,774±1,944*	25,414±1,832**
Хвилинний об'єм крові, мл/хв	65236,150±4053,991	41237,844±5024,439*	47557,601±4912,056
Швидкість скорочення міокарда, dP/dt_{\max} , мм рт.ст./с	11972,2307±1121,057	13175,454±539,022	13070,965±666,105
Швидкість розслаблення міокарда, dP/dt_{\min} , мм рт.ст./с	-9609,577±462,349	-10395,864±410,493	-9767,345±401,818
Константа тривалості періоду ізovolюмічного розслаблення τ -W	10,359±1,449	5,114±0,652*	8,407±0,403**
Максимальна жорсткість міокарда, мм рт.ст./мкл	1,339±0,27	2,606±0,455*	2,209±0,34

* достовірні відмінності показників порівняно з контролем ($P<0,05$); ** – зі щурами з цукровим діабетом ($P<0,05$).

лізувались у тварин III групи, які отримували ω -3 ПНЖК. Отже, застосування ω -3 ПНЖК може покращувати стан кардіогемодинаміки щурів внаслідок поліпшення насосної, діастолічної функції при розвитку ЦД.

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

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ КАРДИОДИНАМИКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ С ПОМОЩЬЮ ω -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В экспериментах на сердцах крыс *in vivo* с помощью системы регистрации давления–объема «Millar Instruments» изучали нарушения кардиодинамики при экспериментальном диабете и их коррекцию ω -3 полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК). Выявлено, что применение ω -3 ПНЖК у животных с сахарным диабетом может улучшать показатели кардиодинамики – насосную и диастолическую функции.

Ключевые слова: кардиогемодинамика, сахарный диабет, ω -3 ПНЖК.

**A.S. Zhukovska, A.M. Shysh,
M.O. Kuzmenko**

CORRECTION OF CARDIODYNAMICS IN EXPERIMENTAL DIABETES BY ω -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

In experiments on rat hearts *in vivo* with the system for pressure-volume registration «Millar Instruments» cardiodynamic disorders were studied in experimental diabetes for their correction with ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The application of ω -3 PUFAs in animals with

diabetes may improve cardiodynamic parameters - pump and diastolic function.

Key words: cardiohaemodynamics, diabetes, ω -3 PUFAs.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жуковська А.С., Шиш А.М., Мойбенко О.О. Вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот на дихання та набухання мітохондрій серця при експериментальному цукровому діабеті // Фізіол. журн. – 2012. – **58**, №2. – С. 16–26.
2. Казьмин С.Г., Мойбенко А.А. Изменение показателей насосной функции сердца и сократимости миокарда при экспериментальной тампонаде сердца // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1981. – № 2. – С. 651–653.
3. Кузьменко М.О., Павлюченко В.Б., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. Співвідношення порушення насосної функції міокарда та його скоротливості за умов β -адренергічної гіперстимуляції серця щурів // Фізіол. журн. – 2011. – **57**, №2. – С. 3–13.
4. Pacher P., Nagayama T., Mukhopadhyay P., Bátkai S., Kass D.A. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats // Nat. Protoc. – 2008. – **3**, № 9. – P. 1422–1434.
5. Poornima I.G., P. Parikh, R.P. Shannon. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis // Circ. Res. – 2006. – **98**, № 5. – P. 596–605.
6. Weiss J.L., Frederiksen J.W., Weisfeldt M.L. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure // J. Clin. Invest. – 1976. – **58**. – P. 751–760.
7. Wichi R., Malfitano C., Rosa K., De Souza S. B., Salemi V., Mostarda C., De Angelis K., Irigoyen M.C. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents // Cardiovasc. Diabetol. – 2007. – **26**, № 6. – P. 1–7.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 22.03.2013*

Н.С. Петренко, О.О. Кришталь

Десенситизація P2X3-рецепторів як альтернативний механізм анальгезії

У цьому огляді описано та проаналізовано ефективність і перспективи використання препаратів, що впливають на десенситизацію P2X3-рецепторів на противагу їхнім конкурентним антагоністам. Ключові слова: P2X3-рецептор, хронічний біль, антагоністи, десенситизація.

ВСТУП

Одним з найбільш актуальних медичних питань на сьогоднішній день є синтез таких речовин, які б могли вгамувати патологічний біль. Незважаючи на доступність багатьох ліків, які спрямовані на полегшення больових відчуттів, їм бракує ефективності, селективності та безпечності [17]. Нині існує декілька класів протибольових препаратів-анальгетиків. Головними чотирма класами є опіоїди, NSAIDs – нестероїдні протизапальні препарати (разом з COX (циклооксигеназа)–2-інгібіторами), антиконвульсанти та антидепресанти [11, 51]. Такі додаткові класи, як місцеві анестетики, триптани мають менш обмежену специфічну дію та використовуються здебільшого в умовах гострого болю та пов'язаного з ним стану. Усі відомі класи ліків мають низку надзвичайно негативних ефектів при їх клінічному використанні. Серед них патологічне звикання, пригнічення дихання, негативні впливи на травну, кровоносну (NSAIDs), та центральну нервову систему (антиконвульсанти та антидепресанти). Крім того, до недоліків слід додати невисоку ефективність, розвиток толерантності (опіоїди), необхідність вживати великі дози та недовготривалість дії препаратів (антиконвульсанти).

Невирішеною проблемою залишається відсутність способу пригнічення хронічного болю. Гострий біль, що виникає внаслідок гострої інфекції, забоїв, переломів чи операції, може перетворитися у запальний, а згодом у хронічний чи нейропатичний (або патологічний). Тому одним з головних завдань для вчених усього світу є інгібування процесів, які призводять до зміни сенсорних відчуттів від нормальних до патологічних. До того ж, дуже важливо у процесі пригнічення шкідливих больових відчуттів не вплинути на захисні механізми сприйняття больових стимулів, тобто навчитися вгамовувати лише ті елементи, які специфічно відповідають за підвищену чутливість тканин і органів [17, 18].

Аденозинтрифосфат (АТФ) відіграє важливу роль у ініціації та передачі больових відчуттів за допомогою активації пуринергічних рецепторів P2X [5, 28]. P2X-рецептори – це іонотропні канали. Наразі ідентифіковано сім різних субодиниць цього рецептора – P2X1–7 [9, 33, 42, 50]. Вважається, що функціональний рецептор складається з трьох субодиниць одного чи різного типів. P2X3- та P2X2/3-рецептори експресуються у ноцицептивних сенсорних нейронах та є перспективними мішенями для анальгетичних препаратів [1, 26, 29,

32]. Тонічне вивільнення АТФ зі зруйнованих клітин чи з самих сенсорних нервів активує нейрональні P2X3-рецептори, далі виникає потенціал дії, що спрямовується до нейронів центральної нервової системи після чого виникає больове відчуття [37]. Експерименти, проведені на нокаутних за P2X3-рецептором мишах показали, що ці рецептори відіграють ключову роль у сигналюванні хронічного запального, нейропатичного болю, а також болю, пов'язаного з онкозахворюваннями [2, 7, 9, 10, 12, 20, 25, 26, 31, 41, 49].

Існує декілька потенційних стратегій, щоб протидіяти активності P2X3-рецепторів. Попередні дослідження показали, що їхні антагоністи та генетичні делеції можуть мати анальгетичний ефект у запальних і нейропатичних моделях болю [8, 26, 30]. Характерною особливістю P2X3-рецепторів є десенситизація. Це відновлювальна інактивація рецептора за наявності агоніста. P2X3-рецептори схильні до швидкої за розвитком та довготривалої десенситизації, і ця властивість може бути альтернативним і перспективним методом для зменшення АТФ-опосередкованого відчуття хронічного болю [40, 13, 48].

КОНКУРЕНТНІ БЛОКАТОРИ P2X3- I P2X2/3-РЕЦЕПТОРІВ

До 2000-го року ще не було відомостей про фармакологічні агенти, які б були селективними антагоністами АТФ-активованих P2X3-рецепторів. Такі малоспецифічні антагоністи, як сурамін [26], PPADS [23] чи нуклеотидні антагоністи (ТНФ-АТФ – 2'3'-О-(2,4,6-тринітрофеніл)-АТФ) неперспективні для застосування в медичній практиці.

Так, наприклад, ТНФ-АТФ – антагоніст з IC50 3-6 нмоль/л для hP2X2/3- та rP2X2/3-рецепторів, має швидкий зворотний вплив та взаємодіє з недесенситизованим рецептором. Але, незважаючи на те, що ТНФ-АТФ інгібує швидко компоненту АТФ-індукованих струмів і є конкурентним антагоністом для

P2X3- та P2X2/3-рецепторів, він не пройшов клінічних досліджень [3, 6, 52].

Кращі прогнози передбачалися для конкурентного блокатора А-317491 (“Abbott”) з субмікромолярною ефективністю та селективністю до P2X3- та P2X2/3-рецепторів при використанні у нейропатичних і запальних тваринних моделях болю. А-317491 ефективно пригнічував термальну гіперальгезію та механічну алодинію після травм нервів, але був неефективним у разі гострого, а також післяопераційного вісцерального болю [26]. Інші вчені також показали, що спільне застосування АТФ та А-317491 (30 нмоль/л) значно зменшувало АТФ-індуковану алодинію [39]. Проте А-317491 міг зв'язуватися лише з протейнами, тому не всмоктувався у кишковому тракті та не передавався через кровотік до місця безпосередньої дії. На жаль, незважаючи на численні спроби модифікації цього агента, він лише втрачав активність та ефективність, його хімічний синтез не вдалося довести до промислових масштабів [34].

AF-353 – нещодавно синтезована (“Roche Palo Alto”) речовина, що є селективним і високоефективним антагоністом для P2X3- та P2X2/3-рецепторів та належить до класу діамінопіримідинів. На противагу А-317491, AF-353 може застосовуватися per os, стабільний у експериментах in vivo і наразі проходить клінічні дослідження [19]. Крім того, AF-353 має лише невеликий або жодного впливу на інші P2X-рецептори, а на відміну від А-317491 та ТНФ-АТФ проявляє себе як неконкурентний антагоніст.

Отже, нині тестуються такі блокатори P2X3- та P2X2/3-рецепторів, як діамінопіримідини (DAPs) та заміщені ариламиди (SAAs) [17]. Вони показують непогані результати при вгамування суглобного, вісцерального болю, хронічного кашлю тощо. Незважаючи на те, що конкурентні блокатори P2X3- та P2X2/3-рецепторів досліджуються вже багато років, ефективного анальгетичного препарату, що працював би саме як конкурентний антагоніст ще досі не синтезовано.

АГЕНТИ, ЩО ДІЮТЬ ЧЕРЕЗ ДЕСЕНСИТИЗОВАНИЙ P2X3-РЕЦЕПТОР

Відомо, що для P2X3-рецепторів властива швидка за розвитком і довготривала за відновленням десенситизація. Доведено, що відновлення P2X3-рецептора з десенситизації залежить від ліганду. Цей факт може бути використано у фармакологічних цілях для уникнення десенситизації, або ж навпаки, щоб її збільшити [47]. Відомо, що P2X3-гомотримери – дуже чутливі до інгібувальної дії агоністів у концентраціях наномолярного порядку, що опосередковано з явищем високоафінної десенситизації [47, 48], яке майже відсутнє у гомотримерних P2X2- та гетеромерних P2X2/P2X3-рецепторах.

Припускають, що у десенситизованому рецепторі наявний високоафінний сайт зв'язування. Присднання речовини до цього сайту ефективно “заморожує” рецептор у такому стані [45]. Відновлення рецептора залежить від афінності ліганду до десенситизованого рецептора та від інтенсивності вивільнення агоніста з високоафінного сайту. Таким чином, десенситизований рецептор приєднує одні агоністи краще за інші, і високоафінний сайт доступний лише після десенситизації. Найбільш просте пояснення цього полягає в тому, що канал має 2 умовних сайти. Один сайт є низькоафінним (для активації потрібні концентрації ліганду порядку мікромолів), і він генерує відкривання каналу. Другий сайт активується під час десенситизації і є високоафінним (для активації потрібні концентрації ліганду порядку наномолів). Цю властивість можна використовувати для пригнічення патологічного болю [46–48].

Головною умовою для потенціальних анальгетиків, що діють через десенситизацію, є мінімальна агоністична активність і стабільний ефект. Ендогенні діаденозинові поліфосфати АрnAs зустрічаються в різних тканинах. Ар4А і Ар5А наявні у високих концентраціях у секреторних хромафінових клітинах та у синаптичних терміналях мозку

щурів [38, 44]. Діаденозинові поліфосфати (АрnAs, де n – кількість фосфатних залишків) є природними пуринергічними лігандами, що складаються з двох аденозинових фрагментів, з'єднаних ланцюгом з двох чи більше фосфатних залишків у позиції 5 кожного рибозного кільця [38, 14, 43]. Незважаючи на те, що діаденозинові поліфосфати вже давно відомі [35], усі функції АрnAs було важко визначити через їх швидке ферментативне розщеплення. Молекулярна структура АрnAs може бути потенційною основою для синтезу нових лігандів, які б могли селективно активувати чи інактивувати АТФ-керовані рецептори. Проте ендогенні АрnAs нестабільні, що обмежує їх терапевтичне використання. На відміну від ендогенних АрnAs, синтезовані аналоги можуть бути виготовлені з модифікаціями, які дають змогу уникнути дуже високої гідролізувальної активності різноманітних нуклеаз. Так, аналог діаденозинового поліфосфата, що не гідролізується АррСН2ррА, в якому оксо-мости було замінено на карбогенові, показав анальгетичні властивості у деяких моделях болю [36]. Нещодавно синтезований аналог, що не гідролізується, з азотним залишком (АррNH2ррА) спричинив пригнічення α , β -meАТФ-індукованого P2X3-рецепторопосередкованого струму, діючи саме через процес високоафінної десенситизації. Дослідження у цьому напрямку ще тривають.

Напроксен – один з препаратів, який найбільше використовують для лікування нападів мігрені [4]. Оскільки напроксен – нестероїдний протизапальний препарат (NSAID), що належить до групи профенів, які є неспецифічними інгібіторами обох типів циклооксигенази (COX-1/2) [16], головним механізмом його анальгетичної дії вважається інгібування COX-залежного синтезу протизапальних простагландинів та ендоканабіоїдів. Проте відомо, що NSAID мають ще інші механізми дії. Наприклад, диклофенак та ібупрофен інгібують ASICs-канали у гіпокампальних інтернейронах і сенсорних нейронах [15, 53]. Тому нещодавно вчені

задалися питанням, що напроксен, можливо, має паралельні механізми дії на ноцицептивну систему поряд з механізмом COX-інгібування. Дійсно, було показано, що він інгібує агоністіндуковані P2X3-рецепторопосередковані струми через високоафінні механізми зв'язування [24]. Препарат пригнічував трансмембранний рецепторопосередкований струм в залежності від способу використання, взаємодіючи лише з десенситизованим рецептором. Ефект був пропорційний до активності P2X3-рецепторів, індукованої АТФ. Напроксен прискорював перехід P2X3-рецептора у десенситизований стан і не мав жодного впливу на рецептор у стані спокою. Ці результати показали новий механізм дії напроксену. Отже, така депресивна його дія є мінімальною при низькій активності сенсорних нейронів, але повинна бути природно більшою при інтенсивній активації чи сенситизації, коли частина рецепторів знаходиться у десенситизованому стані. Припускається, що напроксен пришвидшує розвиток швидкої десенситизації та працює у комплексі з уже дослідженим механізмом інгібування COX. Ці дані показують, що використання агентів для інгібування P2X3-рецепторів, що впливали б на сповільнення процесів відновлення від десенситизації, є досить ефективними у боротьбі з больовими відчуттями.

Декілька років тому наші колеги опублікували дуже цікаві дані щодо ідентифікації так званого пуротоксину-1, виділеного з яду павука *Geolycosa spp*, що специфічно інгібує P2X3-рецептори у концентраціях порядку наномолів. Антиноцицептивний ефект спостерігався як у нейронах, так і в запальних тваринних моделях болю. Цей ліганд має невеликий потенціюючий ефект на АТФ-струми, але, що важливо, надзвичайно пригнічує P2X3-рецепторопосередковані струми, впливаючи тільки на десенситизований рецептор. Алостеричний механізм дії пуротоксину полягає в уже відомому процесі «замороження» десенситизації за допомогою

приєднання до високоафінного сайту зв'язування [22, 36, 27].

Отже, з моменту обґрунтування феномена високоафінного зв'язування ліганду з P2X3-рецептором [21, 45], стала можливою нова стратегія для синтезу потенційних анальгетиків, яка полягає у взаємодії агента з десенситизованим рецептором, уповільненні процесів відновлення з десенситизації та пригніченні рецепторопосередкованого трансмембранного струму, що швидко десенситизується. У стані хронічного болю, коли АТФ вивільняється у зовнішньоклітинний простір з епіцентру запалення, частина P2X3-рецепторів є активованими, а, відповідно, і десенситизованими. Це означає, що у такому стані агенти, які діють через десенситизований рецептор, зможуть впливати на канал і сповільнювати його роботу, тим самим блокуючи ноцицепцію. Незважаючи на теоретичні передбачення щодо успіху агентів, які б діяли за запропонованим механізмом, невирішеними залишаються багато питань: чи впливатиме запропонований агент на інші класи рецепторів, окрім P2X3- та P2X2/3-рецепторів; чи будуть вони здатні всмоктуватися у кишковому тракті та потрапляти у кровотік; чи будуть вони проникними через гематоенцефалічний бар'єр тощо.

Багато що відомо про фундаментальні процеси функціонування P2X-рецепторів. Найбільш актуальним питанням сьогодення є власне ідентифікація, синтез та оптимізація таких лігандів, які б стали справжнім засобом у боротьбі з хронічним і нейропатичним болем за допомогою специфічного пригнічення АТФ-індукованого P2X3-рецепторопосередкованого трансмембранного струму.

Н.С. Петренко, О.А. Крышталь

ДЕСЕНСИТИЗАЦИЯ P2X3-РЕЦЕПТОРОВ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ АНАЛЬГЕЗИИ

В данном обзоре описаны и проанализированы эффективность и перспективы использования препаратов, влияющих на десенситизацию P2X3-рецепторов в противовес

их конкурентним антагоністам.

Ключевые слова: P2X3-рецептор, хроническая боль, антагонисты, десенситизация.

N.S. Petrenko, O.A. Krishtal

P2X3-RECEPTOR DESENSITIZATION AS AN ALTERNATIVE MECHANISM OF ANALGESIA

One of the most important current medical problems is the synthesis of substances that could suppress pathological pain. It has not been yet invented any method for chronic pain inhibition. Chronic pain is largely mediated by the activation of purinergic P2X3- and P2X2/3-receptors. They are expressed in nociceptive sensory neurons and are the prospective targets for analgesic drugs. There are several potential strategies to prevent P2X3 receptor activation. Recent studies have shown that P2X3-receptor antagonists and genetic deletion may have analgesic effects in inflammatory and neuropathic models. P2X3-receptors have fast and persistent desensitization. By influencing this property it could serve to reduce the ATP-mediated sensation of chronic pain. Therefore, in this review we outline and analyze the effectiveness and prospects of pharmacological agents acting through desensitization of P2X3-receptor versus its competitive antagonists.

Key words: P2X3-receptor, chronic pain, antagonists, desensitization.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhatsky A., Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview // *Trends Neurosci.* – 2009. – №32. – P.19–29.
2. Barclay J., Patel S., Dorn G., Wotherspoon G., Moffatt S., Eunson L., Abdel'al S., Natt F., Hall J., Winter J., Bevan S., Wishart W., Fox A., Ganju P. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain // *J.Neurosci.* – 2002. – №22. – P.8139–8147.
3. Bradbury E.J., Burnstock G., McMahon S.B. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor // *Mol.Cell Neurosci.* – 1998. – №12. – P.256–268.
4. Brandes J.L., Kudrow D., Stark S.R., O'Carroll C.P., Adelman J.U., O'Donnell F.J., Alexander W.J., Spruill S.E., Barrett P.S., Lener S.E. Sumatriptan-naproxen for acute treatment of migraine: a randomized trial // *JAMA.* – 2007. – №297. – P.1443–1454.
5. Browne L.E., Jiang L.H., North R.A. New structure enlivens interest in P2X receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2010. – №31. – P.229–237.
6. Burgard E.C., Niforatos W., van'Biesen T., Lynch K.J., Kage K.L., Touma E., Kowaluk E.A., Jarvis M.F.

- Competitive antagonism of recombinant P2X(2/3) receptors by 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP) // *Mol.Pharmacol.* – 2000. – №58. – P.1502–1510.
7. Burnstock G. P2X receptors in sensory neurones // *Brit.J.Anaesth.* – 2000. – №84. – P.476–488.
8. Burnstock G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics // *Pharmacol.Therap.* – 2006. – №110. – P.433–454.
9. Burnstock G., Wood J.N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission // *Curr.Opin.Neurobiol.* – 1996. – №6. – P.526–532.
10. Chizh B.A., Illes P. P2X receptors and nociception // *Pharmacol.Rev.* – 2001. – №53. – P.553–568.
11. Chronicle E., Mulleners W. Anticonvulsant drugs for migraine prophylaxis // *Cochrane.Database.Syst.Rev.* – 2004. – P.CD003226.
12. Cockayne D.A., Hamilton S.G., Zhu Q.M., Dunn P.M., Zhong Y., Novakovic S., Malmberg A.B., Cain G., Berson A., Kassotakis L., Hedley L., Lachnit W.G., Burnstock G., McMahon S.B., Ford A.P. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice // *Nature.* – 2000. – №407. – P.1011–1015.
13. Cook S.P., McCleskey E.W. Desensitization, recovery and Ca(2+)-dependent modulation of ATP-gated P2X receptors in nociceptors // *Neuropharmacology.* – 1997. – №36. – P.1303–1308.
14. Delicado E.G., Miras-Portugal M.T., Carrasquero L.M., Leon D., Perez-Sen R., Gualix J. Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways // *Pflug. Arch.* – 2006. – №452. – P.563–572.
15. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A., Bolshakov K.V., Magazanik L.G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons // *J.Neurochem.* – 2008. – №106. – P.429–441.
16. Duggan K.C., Walters M.J., Musee J., Harp J.M., Kiefer J.R., Oates J.A., Marnett L.J. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen // *J.Biol.Chem.* – 2010. – №285. – P.34950–34959.
17. Ford A.P. In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization // *Purinergic.Signal.* – 2012. – №8. – P.3–26.
18. Ford A.P., Cockayne D.A. ATP and P2X purinoreceptors in urinary tract disorders // *Handb.Exp.Pharmacol.* – 2011. – P.485–526.
19. Gever J.R., Soto R., Henningsen R.A., Martin R.S., Hackos D.H., Panicker S., Rubas W., Oglesby I.B., Dillon M.P., Milla M.E., Burnstock G., Ford A.P. AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist // *Brit.J.Pharmacol.* – 2010. – №160. – P.1387–1398.
20. Giniatullin R., Nistri A., Fabbretti E. Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X3 receptors by the migraine mediators CGRP and NGF //

- Mol.Neurobiol. – 2008. – №37. – P.83–90.
21. Giniatullin R., Nistri A., Yakel J.L. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling // Trends Neurosci. – 2005. – №28. – P.371–378.
 22. Grishin E.V., Savchenko G.A., Vassilevski A.A., Korolkova Y.V., Boychuk Y.A., Viatchenko-Karpinski V.Y., Nadezhdin K.D., Arseniev A.S., Pluzhnikov K.A., Kulyk V.B., Voitenko N.V., Krishtal O.O. Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain // Ann.Neurol. – 2010. – №67. – P.680–683.
 23. Hausmann R., Rettinger J., Gerevich Z., Meis S., Kassack M.U., Illes P., Lambrecht G., Schmalzing G. The suramin analog 4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino)tetra-kis-benzenesulfonic acid (NF110) potently blocks P2X3 receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups // Mol.Pharmacol. – 2006. – №69. – P.2058–2067.
 24. Hautaniemi T., Petrenko N., Skorinkin A., Giniatullin R. The inhibitory action of the antimigraine nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen on P2X3 receptor-mediated responses in rat trigeminal neurons // Neuroscience. – 2012. – №209. – P.32–38.
 25. Honore P., Kage K., Mikusa J., Watt A.T., Johnston J.F., Wyatt J.R., Faltynek P.R., Jarvis M.F., Lynch K. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats // Pain. – 2002. – №99. – P.11–19.
 26. Jarvis M.F., Burgard E.C., McGaraughty S., Honore P., Lynch K., Brennan T.J., Subieta A., van Biesen T., Cartmell J., Bianchi B., Niforatos W., Kage K., Yu H., Mikusa J., Wismer C.T., Zhu C.Z., Chu K., Lee C.H., Stewart A.O., Polakowski J., Cox B.F., Kowaluk E., Williams M., Sullivan J., Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. – 2002. – №99. – P.17179–17184.
 27. Kabanova N.V., Vassilevski A.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Korolkova Y.V., Pluzhnikov K.A., Romanov R.A., Grishin E.V., Kolesnikov S.S. Modulation of P2X3 receptors by spider toxins // Biochim.and Biophys.Acta. – 2012. – №1818. – P.2868–2875.
 28. Kawate T., Michel J.C., Birdsong W.T., Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state // Nature. – 2009. – №460. – P.592–598.
 29. Kennedy C. P2X receptors: targets for novel analgesics? // Neuroscientist. – 2005. – №11. – P.345–356.
 30. Kennedy C., Assis T.S., Currie A.J., Rowan E.G. Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics // J.Physiol. – 2003. – №553. – P.683–694.
 31. Kennedy C., Leff P. Painful connection for ATP // Nature. – 1995. – №377. – P.385–386.
 32. Khakh B.S., North R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease // Ibid. – 2006. – №442. – P.527–532.
 33. Krishtal O.A., Marchenko S.M., Pidoplichko V.I. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones // Neurosci.Lett. – 1983. – №35. – P.41–45.
 34. Lee C.H., Perner R.J., Larson D.P., Koenig J.R., Gomtsyan A.R., Zheng G.Z., Didomenico Stewart A.O., Bayburt E.K. Abbott Laboratories. Preparation of trisubstituted N-[(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl] benzamides as inhibitors of P2X3 and P2X2/P2X3 containing receptors for treating pain, urinary incontinence and bladder overactivity // 2002. – Patent 129513-93-5.
 35. McLennan A. Ap4A and Other Dinucleoside Polyphosphates // Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1992. – 368 p.
 36. Melnik S., Wright M., Tanner J.A., Tsintsadze T., Tsintsadze V., Miller A.D., Lozovaya N. Diadenosine polyphosphate analog controls postsynaptic excitation in CA3–CA1 synapses via a nitric oxide-dependent mechanism // J.Pharmacol.Exp.Therap. – 2006. – №318. – P.579–588.
 37. Millan M.J. Descending control of pain // Prog.Neurobiol. – 2002. – №66. – P.355–474.
 38. Miras-Portugal M.T., Gualix J., Pintor J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates // FEBS Lett. – 1998. – №430. – P.78–82.
 39. Nakagawa T., Wakamatsu K., Zhang N., Maeda S., Minami M., Satoh M., Kaneko S. Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats: differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance // Neuroscience. – 2007. – №147. – P.445–455.
 40. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // Physiol Rev. – 2002. – №82. – P.1013–1067.
 41. North R.A. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms // J.Physiol. – 2004. – №554. – P.301–308.
 42. North R.A., Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors // Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. – 2000. – №40. – P.563–580.
 43. Pintor J., Diaz-Hernandez M., Gualix J., Gomez-Villafuertes R., Hernando F., Miras-Portugal M.T. Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system // Pharmacol. Therap. – 2000. – №87. – P.103–115.
 44. Pintor J., Diaz-Rey M.A., Torres M., Miras-Portugal M.T. Presence of diadenosine polyphosphates Ap4A and Ap5A in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine // Neurosci. Lett. – 1992. – №136. – P.141–144.
 45. Pratt E.B., Brink T.S., Bergson P., Voigt M.M., Cook S.P. Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist // J.Neurosci. – 2005. – №25. – P.7359–7365.
 46. Sokolova E., Nistri A., Giniatullin R. Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons // Ibid. – 2001. – №21. – P.4958–4968.
 47. Sokolova E., Skorinkin A., Fabbretti E., Masten L., Nistri A., Giniatullin R. Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation // Brit. J.Pharmacol. – 2004. – №141. – P.1048–1058.
 48. Sokolova E., Skorinkin A., Moiseev I., Agrachev A., Nistri

- A., Giniatullin R. Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors // *Mol.Pharmacol.* – 2006. – №70. – P.373–382.
49. Souslova V., Cesare P., Ding Y., Akopian A. N., Stanfa L., Suzuki R., Carpenter K., Dickenson A., Boyce S., Hill R., Nebenius-Oosthuizen D., Smith A. J., Kidd E. J., Wood J. N. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors // *Nature.* – 2000. – №407. – P.1015–1017.
50. Trang T., Beggs S., Salter M.W. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain // *Exp.Neurol.* – 2012. – №234. – P.354–361.
51. Servellen G., Heise B.A., Ellis R. Factors associated with antidepressant medication adherence and adherence-enhancement programmes: a systematic literature review // *Ment.Health Fam.Med.* – 2011. – №8. – P.255–271.
52. Virginio C., Robertson G., Surprenant A., North R.A. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors // *Mol.Pharmacol.* – 1998. – №53. – P.969–973.
53. Voilley N., de'Weille J., Mamet J., Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors // *J.Neurosci.* – 2001. – №21. – P.8026–8033.

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

Матеріал надійшов до редакції 10.12.2012

О.А.Рибачук, Т.А. Півнева

Роль нейральних стовбурових клітин в регенерації центральної нервової системи

Центральна нервова система (ЦНС) дорослих ссавців, а також і людей, є типовим прикладом органів, які не відновлюються. Проте нині зростає інтерес до розвитку інноваційних методів лікування, які спрямовані на регенерацію пошкодженої тканини ЦНС, основою яких є досягнення в галузі стовбурових клітин та неврології. Відновлення нормального розвитку нервової системи стало життєво важливою стратегією регенерації ЦНС. Нормальний розвиток ЦНС ініціюється індукцією стовбурових клітин у ній, тобто нейральних стовбурових клітин (НСК). Таким чином, введення або мобілізація НСК, як очікується, може регенерувати ЦНС активацією як ендогенної регенерації, так і трансплантацією НСК. Огляд висвітлює останні дані вивчення фундаментальної біології стовбурових клітин, механізми онтогенетичного розвитку, перспективи ідентифікації, потенціал диференціації, а також їх терапевтичне застосування.

Ключові слова: ембріональні стовбурові клітини, нейральні стовбурові клітини, нейрогенез, нейросфери, індукція плюрипотентних стовбурових клітин.

ВСТУП

Нейральні стовбурові клітини (НСК), чи стовбурові клітини центральної нервової системи (ЦНС) – клітини, що мають потенціал диференціюватися у нейрони, астроцити та олігодендроцити, а також самовідновлюватися для забезпечення потрібної кількості клітин у мозку [35, 42]. Мозок традиційно не розглядався як система, що містить стовбурові клітини (СК), через парадигму про те, що ця тканина не здатна до регенерації. Більше як 80 років тому Ramon y Cajal [48] написав: “коли розвиток було закінчено, першоджерело росту та регенерації ... зникло безповоротно”. Цей постулат називається “догма Cajal”. Отже, дослідники намагаються спростувати цю догму, користуючись останніми досягненнями біонауки та медицини, особливо у галузі стовбурових клітинних технологій [39, 40]

Нейроонтогенез нейральних стовбурових клітин. Не так давно були знову переглянуті оригінальні спостереження про те, що у деяких ділянках мозку дорослого організму

відбувається нейрогенез, та доповнені дослідженнями з ідентифікації прогеніторних клітин, відповідальних за ембріональний і постнатальний розвиток нейронів. Нині у ЦНС хребетних мультипотентні клітини ідентифіковані як *in vitro*, так і *in vivo*. Лінійні експерименти *in vitro* показали, що нейрони та глія можуть бути отримані із спільного ембріонального попередника; ЦНС дорослого організму також містить мультипотентні попередники для нейронів, астроцитів та олігодендроцитів [5, 31] (рисунок).

На ранньому етапі ембріонального розвитку НСК представлені як нейроепітеліальні (чи клітини матриці) в нервовій трубці, яка симетрично ділиться [17]. Згодом, на початку нейрогенезу, вони існують у вигляді радіальної глії (чи як клітини матриці) у вентрикулярній зоні (VZ) нервової трубки [47]. Останні дослідження показали, що НСК продовжують нейрогенез у дорослих ссавців [29, 57] та у людини [16, 46]. Результати цих досліджень (наявність НСК у ЦНС дорослого організму) дали змогу припустити потенційну терапев-

тичну стратегію з використанням НСК для регенерації пошкоджених тканин ЦНС [41].

Дослідники показують, що нервова тканина ссавців (у тому числі і людини) протягом I триместра вагітності на 90 % складається із нейральних стовбурових та прогеніторних клітин. НСК наявні у вентрикулярній зоні, стріатумі та корі ембріонального мозку. Нейральні прогеніторні клітини наявні у постнатальному мозку людини та ссавців, завдяки їм може здійснюватися оновлення / або відновлення тканин і органів, проте кількість зон мозку, в яких відбувається регенерація нейронів, є лімітованою [1–3, 64].

Стосовно нейроонтогенезу, то вже на ранніх етапах ембріонального розвитку клітинний склад нервової тканини є неоднорідним у відношенні генетичної експресії. При подальшому розвитку клітини поступово диференціюються в окремі типи та види. Певні зміни відбуваються і в популяції нейральних стовбурових та прогеніторних клітин ЦНС. Як різні типи нейронів і глії диференціюються (генеруються) з НСК чи прогеніторних клітин протягом розвитку ЦНС – є найважливішим питанням вивчення нейробіології [43]. Потенціал диференціації НСК, як відомо,

контролюється просторовими та часовими регулювальними механізмами під час онтогенетичного розвитку ЦНС [58].

На стадії одношарового призматичного нейроепітелію відбувається функціональне відокремлення СК, які здатні підтримувати свій прогеніторний потенціал. Ці клітини і є НСК. Точно невідомо, скільки поколінь відділяє первинні НСК від прогеніторів нервової тканини. Іншими словами, чи існують частково детерміновані СК і в чому виражається така детермінація?

Як показали дослідження особливостей росту СК у культурі ізольованих на різних ділянках ЦНС зародків щура, НСК розвиваються в зрілі нейроти [58]. Більше того, нейросфери, отримані при культивуванні різнотопічних варіантів НСК, експресують специфічні регіональні маркери [59].

Проводилися дослідження проліферативної активності та нейрального потенціалу НСК, ізольованих з рострального кінця нервової трубки 9-тижневого зародка людини. Спостерігали активне утворення нейросфер, клітини яких давали ріст нейронам, астроцитам та олігодендроцитам, тобто проявляли мультипотентність. При цьому

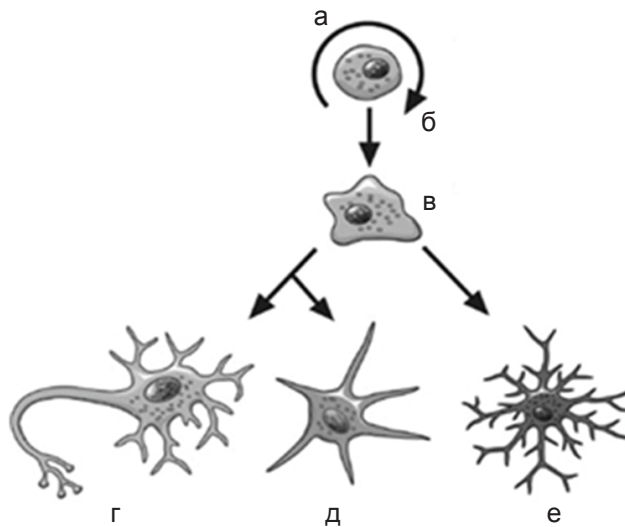


Схема диференціації загального ембріонального мультипотентного попередника в центральній нервовій системі: а – клітинний родовід; б – власне поновлювальні стовбурові клітини; в – ранні прогеніторні клітини; г – нейрон; д – олігодендроцит; е – астроцит

вдалося встановити дві суттєві відмінності між СК різних відділів головного мозку. По-перше, НСК, ізольовані із ростральних ділянок нервової трубки, проявляли більшу проліферативну активність, ніж нейральні клітини каудальних відділів головного мозку [55]. По-друге, в однакових умовах культивування серед нейронального потомства нейральних клітин середнього та проміжного мозку більшою мірою визначалися нейрони, які експресують тирозингідроксилазу (ТН). При цьому ТН-позитивні нейрони, отримані із нейральних клітин проміжного та середнього мозку, характеризувалися великим розміром, мультиполярністю та відсутністю експресії гама-аміномасляної кислоти, тобто бути дофамінергічними нейронами [23]. Таким чином, зберігаючи широту лінійної диференціації, НСК під час нейроонтогенезу підлягають просторовій специфікації.

Кількість НСК у загальній масі клітин нейроепітеліального типу під час ембріогенезу прогресивно зменшується. Топологія їхнього розташування на початку нейруляції, а також здатність НСК до міграції між різними ділянками ЦНС в більш пізні періоди нейроонтогенезу залишається невивченими. Проте на сьогодні відомо, що міграція НСК тісно пов'язана з їх мультипотентним статусом. Встановлено, що висока активність промотору гена нестину корелює з активністю експресії $\alpha 5\beta 1$ -інтегрину [65]. Це означає, що останній є специфічним для НСК фактором поверхневої адгезії і може брати участь у забезпеченні їх міграції. Відомо, що НСК експресують також і інший фактор адгезії – білок PSA-NCAM, який визначає їх міграцію і, можливо, відіграє роль у стабілізації потентного статусу цих клітин [18].

Можливо, що НСК на стадіях спеціалізації нейронів під час нейроонтогенезу набувають певний досвід відносно реалізації різних варіантів топологічної інформації, завдяки чому поступово розширюється набір варіантів топологічних перебудов тканини мозку. Слід зазначити, що інтенсивний нейро-

генез у різних ділянках кори великих півкуль людини продовжується до 7-го року життя. Протягом цього періоду число кіркових нейронів збільшується майже удвічі.

Докази нейрогенезу в ЦНС дорослих особин. Уперше явище нейрогенезу у мозку дорослих ссавців вказав Altman [4], який за допомогою методу тимідинової гістоавтордіографії виявив НСК у передньому мозку мишей та їх міграцію у нюхову цибулину з наступним формуванням у ній зрілих нейронів. Пізніше, у 1990-ті роки, ці дані були підтверджені в експериментальних роботах з використанням нових методів мічення проліферуючих клітин нервової системи (ретровірус, бромдезоксипуридин – маркер S-фази клітинного циклу). Так, після ін'єкції ретровірусної мітки у різні ділянки субвентрикулярної зони мозку ссавців імуногістохімічно визначали експресію β -галактидази у нащадків інфікованих клітин [33]. Це означає, що окремі регіони передньої частини субвентрикулярної зони генерують велику кількість НСК, які цілеспрямовано мігрують у нюхову цибулину і диференціюються там у локальні гранулярні та перигранулярні нейрони – два важливі типи інтернейронів нюхової цибулини. Інші дослідники вказують, що після ретровірусного мічення НСК субвентрикулярної зони мозку щурів з застосуванням відеомікроскопії зрізів на різних рівнях було виявлено два напрямки міграції прогеніторних мічених клітин: 1 – радіальний – в білу речовину та кору мозку з диференціацією у астроцити та олігодендроцити; 2 – рострально-каудальний – у нюхову цибулину з трансформацією у інтернейрони [56]. Таким чином, була доведена різноспрямована міграція із субвентрикулярної зони клітин-попередників глії та нейронів.

Крім того, був також встановлений факт утворення нових нейронів у зубчастій звивині гіпокампа дорослих ссавців [13].

Накопичені дані різносторонніх експериментальних досліджень підтвердили наявність регіональних НСК та їх попе-

редників у різних відділах нервової системи дорослих ссавців і людини та довели, що вони є джерелом трьох диференційованих типів спеціалізованих клітин як *in vitro*, так і *in vivo*. Розробка методів виділення, ідентифікації та клонування регіональних НСК і клітин-попередників нейронів і глії відкрила широкі можливості для проведення численних експериментів з їх внутрішньомозковою трансплантацією та сприяла поглибленню і накопиченню знань про біологію цих клітин [10, 11, 15, 21, 62]. Нині ці дослідження стали одними з найбільш перспективних в експериментальній і клінічній нейротрансплантології, які стрімко розвиваються.

Уперше клітини ЦНС дорослих особин, що мали здатність диференціюватися *in vitro* у три основні фенотипи клітин, були виділені зі стріаторної зони мозку мишей та названі клітинами-попередниками нервових клітин [49]. Вони виявились імунореактивними відносно нестину – унікального маркера білка проміжних нейрофіламентів і показали здатність диференціюватися у нейрони, астроцити та олігодендроцити *in vitro*. Таким чином, нестин був названим маркером недиференційованих НСК у ЦНС. Були також ідентифіковані інші селективні маркери молекул НСК, зокрема Musashi1, що належать Sox-антитілам, які експресуються у недиференційованих НСК у ЦНС. Musashi1 – білок, який специфічно експресується в НСК як в ембріональній, так і в постнатальній ЦНС та ідентифікований як білок, що еволюційно належить до RNA-зв'язаних білків [19, 28, 37, 38, 51, 52].

Надалі попередники нервових клітин були виділені також і з інших зон ЦНС дорослих гризунів: з головного мозку мишей [50]; із субвентрикулярної зони мишей [36] і щурів [45]; із гіпокампа щурів [8]; із перегородки та стріатума щурів [45]; з нюхової цибулини і рострального подовження субвентрикулярної зони мозку мишей [20], а також із різних відділів спинного мозку мишей і щурів, у тому числі із перивентрикулярної зони [27].

Виявлення НСК у ЦНС дорослої людини становить особливий інтерес. НСК знайдені у субвентрикулярній зоні мозку [8], у гіпокампі [12], в корі головного мозку [8], в нюховій цибулині [44]. Таким чином, виявлення СК та клітин-попередників у різних ділянках ЦНС дорослих індивідуумів було безсумнівним доказом того, що процеси нейрогенезу та гліогенезу здійснюються протягом усього постнатального життя людини.

Ці дослідження дали змогу багато дізнатися про резервні можливості ЦНС та по-новому поглянути на патофізіологію ЦНС. Вони стимулювали розгортання широкомасштабних експериментальних досліджень з вивчення регуляторних механізмів проліферації НСК, особливостей їх просторової міграції та кінцевої диференціації у різних відділах мозку, а також дали можливість виявити такі унікальні властивості НСК, як пластичність і трансдиференціація.

Таким чином, показано, що НСК, будучи ендогенними попередниками нейрональних та гліальних клітинних типів ЦНС, можуть відігравати певну роль у цитогенезі та гістогенезі головного мозку дорослих індивідуумів. Водночас вплив різних позаклітинних факторів локального мікрооточення через каскадні системи передачі сигналів зумовлює життєзабезпечення, самовідновлення, спрямовану міграцію та термінальну диференціацію у нейрони та специфічні види глії, які поповнюють відповідні клітинні пули в ембріональному та дорослому мозку ссавців і людини. Проте регуляторні молекулярні механізми самовідновлення та диференціації ендогенних НСК, а також позаклітинні фактори їх активації та інгібування поки що до кінця не розкриті та інтенсивно досліджуються.

Як відомо, НСК мають три основні ознаки, патогнологічні для СК: здатність до самовідновлення у постмітотичному поколінні, до міграції та до трансмітотичної термінальної диференціації. Проте, на відміну від СК, у НСК менший проліферативний потенціал та обмежене число поділів [18].

Відомо, що НСК відносяться до мультипотентних регіональних СК, які при симетричному поділі самовідновлюються, а при асиметричному – здатні відновлювати різні типи клітин однієї лінії диференціації – нейрональні та гліальні клітини. У цьому разі, одна із дочірніх клітин залишається стовбуровою, а інша комітується та входить у диференціацію під впливом локальних медіаторів міжклітинної взаємодії (цитокінів) та факторів росту. Безпосередніми нащадками мультипотентних НСК є клітини-прогенітори, з певним та обмеженим сектором диференціації, формуючи однотипово диференційований пул клітин – нейронів чи глії.

Нейральні стовбурові клітини при старінні. Наявність НСК у тканині головного мозку протягом усього життя людини є неспростовним фактом. Проте поки що, з незрозумілих причин, швидкість нейрогенезу у SVZ-бічних шлуночках та SGZ зубчастої фасції головного мозку ссавців з віком поступово зменшується [32]. НСК, які ізолювали з SVZ-бічних шлуночків старих щурів, за культуральними властивостями нічим не відрізнялись від НСК переднього мозку молодих тварин.

Деякі вчені вважають, що зниження проліферативної та нейральної активності зубчастої фасції старих тварин пов'язано з порушенням гормонального балансу в період старіння [35]. Інші ж показують, що зниження нейрогенезу в похилому віці може бути пов'язано зі зменшенням кількості НСК головного мозку, подовженням тривалості клітинного циклу комітованих нейрональних і гліальних попередників, а також зі збільшенням концентрації клітинних інгібіторів проліферації прогеніторів. Дослідники показали, що як специфічний маркер G₁-періоду клітинного циклу може використовуватися фактор реплікації MCM2. Виявилось, що прогенітори SVZ-бічних шлуночків мозку молодих і старих мишей, які мали фенотип нестин (+) / Musashi (+), відрізнялися майже вдвічі зниженою проліферативною активністю. Схожу тенденцію автори спостерігали і у здатності давати ріст клітинним нейросферам [34].

Було також продемонстровано, що після 90 хв оклюзії середньої мозкової артерії щура, пік збільшення експресії PSA-NCAM у SVZ-бічного шлуночка іпсилатеральної півкулі у молодих і зрілих тварин спостерігався на 1-шу добу після ішемії, а у старих тварин – на 3-тю добу. У контролі максимальну експресію PSA-NCAM дослідники знайшли у вентро-дорсальній частині SVZ-бічного шлуночка старих тварин і в дорсальній частині SVZ – молодих тварин [53].

Цікаво відмітити, що вік тварин не впливає на постішемичну активацію потенціалу нейральних прогеніторів гіпокампа; ймовірніше, вік накладає певні обмеження на життєздатність молодих нейронів [63].

Схожі зміни проліферативної активності були виявлені і в нейральних клітинах периферичних відділів нервової системи. Наприклад, встановлено, що з віком проліферативна активність нейральних прогеніторів нюхового епітелію гвінейських свинок зменшується, тоді як кількість TUNEL – позитивних апоптотичних клітин залишається стабільним [22]. У свою чергу інші дослідники довели, що з віком нейронпродукуюча активність пігментоцитів сітківки ока людини *in vitro* зменшується [7].

Під час старіння відбуваються зміни геному НСК, показано, що в клітинах нейросфер, отриманих при культивуванні НСК головного мозку старих тварин, втрачається гетерозиготність за деякими хромосомами, що пояснюється виникненням хромосомних аберацій. При цьому, на думку авторів, протягом усього життя відбувається відбір клітин, які проявляють підвищену здатність до виживання в тканині старіючого мозку [9].

Отже, активність нейрогенезу за участі НСК і регенераційні можливості нервової тканини ссавців після народження низькі та зменшується з віком. Це супроводжується неухильним прогресуванням дегенеративних змін структури тканини головного та спинного мозку, а також периферичних відділів нервової тканини.

Вплив факторів мікрооточення на диференціацію НСК дорослого мозку *in vivo* та *in vitro*. Нині накопичено багато даних про цитотипову пластичність НСК, трансплантованих у різні відділи мозку дорослих тварин [6, 14, 30]. При цьому підтверджується вплив локальних факторів мікрооточення на процеси направленої та фенотипової термінальної диференціації трансплантованих нейроклітин [26]. Так, показано, що НСК гіпокампа, імплантовані в гіпокамп, формували нейрони, подібні нейронам зубчастої фасції гіпокампа [60]. На відміну від цього, при трансплантації у ділянках рострального міграційного тракту такі клітини мігрували у нюхову цибулину та перетворювалися там у нейрони, які експресували тирозингідроксилазу, типові для нюхової цибулини, але не для гіпокампа [61]. При трансплантації НСК у прозору перетинку та діагональну смугу формувалися холінергічні нейрони, характерні для цієї зони. Водночас НСК стріатума, імплантовані в кору головного мозку, диференціювались у типові кіркові нейрони з наявністю характерних аксональних зв'язків.

Встановлено регуляторний і вибірковий вплив факторів росту на потенційні властивості НСК як *in vivo*, так і *in vitro*. Так, введення у бічні шлуночки мозку рекомбінантного фактора росту EGF стимулювало підвищення проліферативної активності НСК у субвентрикулярній зоні. Водночас у субгранулярній ділянці зубчастої звивини кількість клітинних елементів у цих умовах не змінювалася при чіткому зміщенні наявних популяцій клітин у бік гліального типу. Але після введення в порожнину бічних шлуночків фактора росту фібробластів-2 (FGF2) збільшувалася кількість нейроклітин в обох регенераційних системах [32]. При цьому показано, що основний фактор росту фібробластів (bFGF) не має індукуючого впливу на проліферацію НСК, ізольованих зі стріатума дорослого мозку. Проте після попереднього субкультивування з bFGF вони набували здатності до самовідновлення та проліферували за наявності згаданого фактора.

Визначена направленість зрушень у співвідношенні нейрональних і гліальних популяцій під впливом факторів росту прослідковується і в умовах культивування НСК. Відомо, що EGF проявляє мітогенний вплив на довготривалі культури стовбурових клітин-попередників, стимулюючи проліферацію мультипотентних НСК як ембріонального, так і постнатального дорослого мозку з обмеженням потенціалу до диференціації.

За наявності таких факторів росту, як FGF2, а також сумісної дії факторів росту EGF і FGF2, культивовані НСК проліферують, не вступаючи у диференціацію, тоді як при видаленні цих факторів з поживного середовища культур НСК диференціюються в олігодендроцити та астроцити.

Таким чином, нейрональну диференціацію НСК в клоні забезпечує в основному родина факторів росту фібробластів. Астроцитарну диференціацію індукують циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), а диференціацію в олігодендроцити викликає тиреотропний гормон трийодтиронін. Отримані *in vitro* дані показують, що центральним механізмом формування фенотипових клітинних типів термінальної диференціації є дія певних екстрацелюлярних інструктивних сигналів епігенетичної стимуляції на той чи інший клас мультипотентних НСК, що і визначає подальшу долю цих клітин.

Слід зазначити, що НСК наявні також у спинному мозку дорослих індивідуумів [24]. Проте в умовах *in situ* клітини проліферують та диференціюються виключно в астроцити, але не у нейрони навіть після пошкодження спинного мозку. На відміну від цього, в умовах *in vitro* та при трансплантації у зубчасту звивину гіпокампа, НСК спинного мозку здатні диференціюватися в нейрони [54]. У той час прогеніторні нейральні клітини спинного мозку, трансплантовані в субвентрикулярну зону переднього мозку, радіально мігрують до фронтальної та окципітальної кори і у нюхову цибулину, але не у гіпокамп. Незалежно від кінцевої ланки міграції ці

клітини не диференціюються у глію. А, отже, міграційні властивості потенціалу до диференціації нейральних прогеніторів спинного мозку відрізняються від аналогічних клітин у субвентрикулярній зоні головного мозку [25].

Нейральні стовбурові клітини – стратегія регенерації тканини ЦНС. Джерелом НСК у дорослих особин є: 1) субвентрикулярна зона головного мозку (нейрональні та гліальні попередники); 2) епітелій нюхового тракту та нюхова цибулина (НЦ); 3) зубчасте ядро гіпокампа; 4) асоціативна кора (маври); 5) мозочок; 6) голосові центри кори стріатума (птахи).

Мозок дорослих ссавців має дуже обмежену здатність генерувати нові клітинні елементи при різних видах пошкодження. Тому трансплантація НСК у мозок може поповнити втрачені популяції нейронів і глії [2]. У своїх дослідженнях учені отримували НСК з 8–12-тижневих плодів людини, культивували у середовищі NPBM з додаванням hFGF, HEGFNSF-1 протягом 14 діб. Перед трансплантацією культивовані клітини були пофарбовані бісбензидом (Hoehst 33342), а потім ін'єкційовані у різні відділи мозку дорослих щурів. Результати мікроскопічного дослідження, проведеного через 10 та 20 діб після трансплантації, показали, що у мозку всіх щурів-реципієнтів знаходилися трансплантати НСК людини. Кластери трансплантованих клітин локалізувалися у корі мозку, білій речовині, латеральному шлуночку, хвостатому ядрі та у всіх шарах мозочка, тобто розташовувалися по ходу ін'єкції. Донорські клітини, що мігрували, розподілялися серед нейронів мозку реципієнта і не виділялися від оточуючої тканини бар'єром, крім того, вони зберігали проліферативний потенціал. Частина НСК людини мігрувала вздовж капілярів мозку реципієнта та по поверхні волокнистих пучків. Така локалізація передбачала їх диференціацію у астроцити, що підтвердилася при імуногістохімічній реакції на маркер GFAP. Фарбування антитілами проти віментину та нестину свідчило про те, що у трансплантатах НСК людини

знаходилися клітини прогеніторного типу, які ще не перейшли до диференціації [27].

Відомо, що донорські нейробласти, імплантовані у різне тканинне середовище, здатні перетворюватися в спеціалізовані клони нейронів і нейроглії, причому фактори навколишнього середовища контролювали напрямок спеціалізації клітин.

Міграція дозріваючих нейронів з вентрикулярної зони у відповідні ділянки головного мозку направляється радіальною глією, яка не функціонує у постнатальний період. У дорослих реципієнтів донорські клітини із зони інокуляції у місце пошкодження переміщуються послідовно – тобто низкою компактно взаємоприлягаючих клітин, які обгортаються глією. Вважають, що основним регулятором таких клітинних взаємодій є полісїальована молекула адгезії нервових клітин (PSA-NCAM). Існування нерадіальних форм міграції дає змогу розробити стратегію адресної доставки трансплантованих нейральних попередників у зрілу нервову систему [18].

Отримані численні експериментальні дані, які підтверджують можливість трансплантації у головний мозок функціонально повноцінних клонів диференційованих нервових клітин. Так, щурам з пошкодженими дофамінергічними нейронами вводили клітини гліальної лінії, яка продукує нейротрофічний фактор (GDNF). Показано, що при трансплантації клітин у мозок щура краще відновлювалася пошкоджена сенсомоторна зона.

При трансплантації НСК мишам з пошкодженим спинним мозком функція спинного мозку відновлювалася на 9-ту добу після пошкодження. Через 2–5 тиж було встановлено, що частина трансплантованих клітин вижила і диференціювалася у астроцити, олігодендроцити та нейрони. Показано, що НСК людини зберігали життєздатність не менше трьох місяців, мігрували та диференціювалися у нейрони та глію в тканинах пошкодженого спинного мозку дорослих мишей [14]. Трансплантовані культивовані НСК мозку людини успішно виживали, зберігали

мультипотентний статус і виявляли нейропротекторний вплив на дегенеруючі нейрони у мозку дорослих щурів після гіпоксії.

Таким чином, трансплантація НСК є перспективною для лікування пошкоджень головного та спинного мозку як через заміщення втрачених клітинних елементів, так і за рахунок відновлення пошкоджених нервових ділянок. Завдяки здатності генерувати всі клітинні типи у нервовій системі, НСК є багатообіцяючими «кандидатами» для розвитку клітинної та генної терапії захворювань нервової системи, зокрема нейродегенеративних захворювань.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Починаючи з кінця 80-х років минулого століття реалізується міжнародна програма присвячена актуальній проблемі клітинної біології – вивченню потенціалу СК зокрема нейральних, що може сприяти значному прогресу у лікуванні багатьох хвороб людини та тварин, клонуванню органів і тканин, і, як результат, новим можливостям у вирішенні проблем трансплантації.

Відкриття НСК і виявлення їх у мозку ембріонів і дорослих особин трансформувало уявлення про пластичність ЦНС. На зміну постулату, що нервові клітини не діляться і не відновлюються, прийшло твердження, що у дорослому організмі за рахунок НСК відновлюються функції пошкоджених нейронів. НСК стали об'єктом інтенсивного вивчення в усьому світі та в Україні зокрема, і нині накопичено вже достатньо експериментального та клінічного матеріалу з їх застосування при різних захворюваннях, зокрема, при ішемії.

У зв'язку з цим вивчення властивостей НСК, розробка методів отримання, виділення, збагачення та їх диференціації повинні випереджати їх клінічне застосування. Слід також вивчити питання практичного застосування, а саме, показання до застосування, значення дози, місця та кратність введення, характер супутньої терапії, значення стадії розвитку захворювання.

Незважаючи на перші успіхи у вивченні НСК, залишається ще багато питань і проблем, які потребують широких комплексних досліджень. Серед головних є такі: 1 – онкогенність – здатність СК при введенні в організм реципієнта викликати розвиток злоякісних пухлин, 2 – здатність СК до непередбаченої диференціації та важкості отримання поки що направленої їх диференціації, 3 – імунологічна несумісність СК з організмом реципієнта у разі їх ксеногенного походження.

Без адекватного вирішення цих проблем, пов'язаних з біологією НСК, ефективного застосування цих клітин у клінічній практиці неможливе.

О.А. Рыбачук, Т.А. Пивнева

РОЛЬ НЕЙРАЛЬНЫХ СТОЛОВОХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Центральная нервная система (ЦНС) взрослых млекопитающих и, в частности, людей, является типичным примером органов, которые не восстанавливаются. Тем не менее, растущий интерес к развитию инновационных методов лечения, которые направлены на регенерацию поврежденной ткани ЦНС, основывается на последних достижениях исследований в области стволовых клеток и неврологии. Восстановление нормального развития нервной системы стало жизненно важной стратегией ее регенерации. Нормальное развитие ЦНС инициируется индукцией стволовых клеток в ЦНС, т.е. нейральных стволовых клеток (НСК). Таким образом, введение или мобилизация НСК, как ожидается, может привести к регенерации ЦНС путем активации как эндогенной регенерации, так и трансплантацией НСК. В обзоре приведены последние данные изучения фундаментальной биологии стволовых клеток; механизмы онтогенетического развития; перспективы идентификации; потенциал дифференциации, а также их терапевтическое применение.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, нейральные стволовые клетки, нейрогенез, нейросферы, индуцированные плюрипотентные клетки.

О.А. Rybachuk, T.A. Pivneva

NEURAL STEM CELLS – STRATEGIES OF REGENERATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Central nervous system (CNS) of adult mammalian and, in particular of people, is a typical example of organs that are not

restored. However, the growing interest in the development of innovative treatments that are aimed at the regeneration damaged tissue CNS is based on the latest research in the field of stem cells and neurology. The recapitulation of normal neural development has become a vital strategy for CNS regeneration. Normal CNS development is initiated by the induction of stem cells in the CNS, i.e., neural stem cells (NSCs). Thus, the introduction or mobilization of NSCs could be expected to lead to CNS regeneration by recapitulating normal CNS development, in terms of the activation of the endogenous regenerative capacity and cell transplantation therapy. In this review we summarized the recent progress in study of basic stem cell biology, on the prospective identification of NSCs, the elucidation of the mechanisms of ontogenic changes, potential differentiation, and their therapeutic applications. Keywords: embryonic stem cells, neural stem cells, neurogenesis, neurosphere, induced pluripotent stem cells.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Запорожан В.Н., Бажора Ю.И. Стволовые клетки. – К.: Одесса: Одес. гос. мед. ун-т. – 2004 – 228 с.
2. Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Цымбалюк В.И., Семенова В.М. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. – К.: УИПК “ЕксОб”. – 2005. – 368 с.
3. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. – К.: ”Коваль”. – 2005. – 596 с.
4. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // *J. Comp. Neurol.* – 1965. – **124**, № 3. – P. 319–335.
5. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M., Tramontin A.D. An unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – **2**. – P. 287–293.
6. Amarglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W., Cohen Y., Loewenthal R., Trakhtenbrot L., Paz N., Koren-Michowitz M., Waldman D., Leider-Trejo L., Toren A., Constantini S., Rechavi G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient // *PLoS Med.* – 2009. – **6**, № 2. – Suppl.
7. Amemiya K., Haruta M., Eguchi G. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **316**, № 1. – P. 1–5.
8. Arsenijevic Y., Villemure J. G., Brunet J. F., Bloch J. J., Deglon N., Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult brain // *Exp. Neurol.* – 2001. – **170**, №1. – P. 48–62.
9. Bailey K. J., Maslov A. Y., Pruitt S. C. Accumulation of mutations and somatic selection in aging neural stem/progenitor cells // *Aging Cell.* – 2004. – **3**, № 6. – P. 391–397.
10. Bakogiannis C., Tousoulis D., Androulakis E., Briasoulis A., Papageorgiou N., Vogiatzi G., Kampoli A.M., Charakida M., Siasos G., Latsios G., Antoniadis C., Stefanadis C. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes // *Curr Med. Chem.* – 2012. – **19**, № 16. – P. 2597–2604.
11. Bandyopadhyay A., Dong Q., Sun L.Z. Stem/progenitor cells in murine mammary gland: isolation and functional characterization // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – **879**. – P. 179–193.
12. Cameron H.A., McKay R.D. Restoring production of hippocampal neurons in old age // *Nat. Neurosci.* – 1999. – **2**, №10. – P. 894–897.
13. Corotto F.S., Henegar J.A., Maruniak J.A. Neurogenesis persist in the subependymal layer of the adult mouse brain // *Neurosci. Lett.* – 1993. – **149**, № 2. – P. 111–114.
14. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., Salazar D.L., Hooshmand M., Summers R., Gage F.H., Anderson A.J. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**, № 39. – P. 14069–14074.
15. Day R.M. Epithelial stem cells and tissue engineered intestine // *Curr. Stem. Cell Res Ther.* – 2006. – **1**, № 1. – P. 113–120
16. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus // *Nat. Med.* – 1998. – **4**, № 11. – P. 1313–1317.
17. Fujita S. The matrix cell and cytotogenesis in the developing central nervous system // *J. Comp. Neurol.* – 1963. – **120**. – P. 37–42.
18. Gage F. N. Mammalian neural stem cell // *Science.* – 2000. – **287**, № 5457. – P. 1433–1438.
19. Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, Ikeuchi T, Tsuji S, Satoh H, Okano H. The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells // *Genomics.* – 1998. – **52**, № 3. – P. 382–384
20. Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F., Caille I., Vescovi A.L. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**, № 2. – P. 437–445.
21. Harkness L., Prokhorova T.A., Kassem M., Blagoev B. Stable isotope labelling with amino acids in cell culture for human embryonic stem cell proteomic analysis // *Methods Mol Biol.* – 2012. – **873**. – P.297–305.
22. Higushi Y., Nakamura H., Takahashi S. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 2004. – **43**. – P. 148–153.
23. Horiguchi S., Takahashi J., Kishi Y., Hashimoto N. Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – **75**, № 6. – P. 817–824.
24. Horner P., Power A., Palmer T., Gage F. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the infact adult rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**, № 6. – P. 2218–2228.

25. Jang Y., Park J., Lee M., Yoon B., Kim S. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord hematopoietic stem cells // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – **75**, № 4. – P. 573–584.
26. Jenny B., Kanemitsu M., Tsupykov O., Potter G., Salmon P., Zraggen E., Gascon E., Skibo G., Dayer A.G., Kiss J.Z. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential // *Stem Cells.* – 2009. – **27**, № 6. – P. 1309–1317.
27. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // *Cell.* – 1999. – **96**, № 1. – P. 25–34.
28. Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y., Sawamoto K., Ogawa Y., Toyama Y., Miyata T., Okano H. Musashi-1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells // *Dev. Neurosci.* – 2000. – **22**, № 1–2. – P. 138–152.
29. Kempermann G., Gage F.H. New nerve cells for the adult brain // *Sci. Amer.* – 1999. – **280**. – P. 48–53.
30. Koch P., Kokaia Z., Lindvall O., Bruestle O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling // *Lancet Neurol.* – 2009. – **8**, №9. – P. 819–829.
31. Kriegstein A., Noctor S., Martinez-Cerdeno V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – **7**. – P. 883–890.
32. Limke T.L., Rao M.S. Neural stem cell therapy in the aging brain: pitfalls and possibilities // *J. Hematother. Stem. Cell.* – 2003. – **12**, № 6. – P. 615–623.
33. Luskin M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone // *Neuron.* – 1993. – **11**. – P. 173–189.
34. Maslov A.Y., Barone T.A., Pruitt S. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice // *J. Neurosci.* – 2004. – **24**, № 7. – P. 1726–1733.
35. McKay R. Stem cells in the central nervous system // *Science.* – 1999. – **276**, № 5309. – P. 66–71.
36. Morshead C.M., Kooy D. v. d. Disguising adult neural stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2004. – **14**, № 1. – P. 125–131.
37. Okano H., Imai T., Okabe M. (2002) Musashi: a translational regulator of cell fates // *J. Cell Sci.* – 2002. – **115**, № (Pt 7). – P. 1355–1359.
38. Okano H., Kawahara H., Toriya M., Nakao K., Shibata S., Takao I. Function of RNA binding protein Musashi-1 in stem cells // *Exp. Cell Res.* – 2005. – **306**. – P. 349–356.
39. Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86. – 2010. – **86**. – P. 438–450.
40. Okano H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application // *Keio J. Med.* – 2002. – **51**. – P. 115–128.
41. Okano H., Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair // *Phil. Trans. R. Soc.* – 2008. – **363**. – P. 2111–2122.
42. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – **69**, № 6. – P. 698–707.
43. Okano H., Temple S. Cell types to order: Temporal specification of CNS stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2009. – **19**. – P. 112–119.
44. Pagano S., Impagnatiello F., Girelli M., Cova L., Grioni E., Onofri M. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb // *Stem Cell.* – 2000. – **18**, № 4. – P. 295–300.
45. Palmer T.D., Ray J., Gage F.H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain // *Mol. Cell. Neurosci.* – 1995. – **6**, № 5. – P. 474–486.
46. Pincus D., Keyoung H., Restelli C., Sakakibara S., Okano H., Goodman R. FGF2/BDNF-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells // *Ann. Neurol.* – 1998. – **43**. – P. 576–585.
47. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – **10**. – P. 724–735.
48. Ramon y Cajal, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. (Translated by RM Day from the 1913 Spanish edition). – Oxford, University Press, Oxford. – 1928.
49. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // *Science.* – 1992. – **255**, № 5052. – P. 1707–1710.
50. Richards L.J., Kilpatrick T.J., Bartlett P.F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain // *PNAS USA.* – 1992. – **89**, № 18. – P. 8591–8595.
51. Sakakibara S., Imai T., Hamaguchi K., Okabe M., Aruga J., Nakajima K., Yasutomi D., Nagata T., Kurihara Y., Uesugi S., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Okano H. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell // *Dev Biol.* – 1996. – **176**, № 2. – P. 230–242.
52. Sakakibara S., Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the post-natal CNS: implication of their roles in neural and glial cells development // *J. Neurosci.* – 1997. – **17**, № 21. – P. 8300–8312.
53. Sato K., Hayashi T., Abe K. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression of neural markers in human umbilical cord blood // *Exp. Neurol.* – 2001. – **922**, № 1. – P. 135–139.
54. Shihabuddin L., Horner P., Ray J., Gage F. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**, № 23. – P. 8727–8735.
55. Smith R., Bagga V., Fricker-Gates R. Embryonic neural progenitor cells: the effects of species, region, and culture conditions on long-term proliferation and neuronal differentiation // *J. Hematother. Stem Cell Res.* – 2003. – **12**, №6. – P. 713–725.
56. Suzuki S.O., Goldman J.E. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone have distinct mi-

- gratory migratory pathways: adynamic study of glial and neuronal progenitor migration // *J. Neurosci.* – 2003. – **23**, №10. – P. 4240–4250.
57. Temple S., Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1999. – **9**. – P. 135–141.
58. Temple S. The development of neural stem cells // *Nature.* – 2001. – **414**, № 6859. – P. 112–117.
59. Tropepe V., Hitoshi S., Ekker M. Neural stem cells and their progeny express region-specific gene in the developing CNS, but this expression is not irreversible and can be altered by lokal inductive cues // *Soc. Neurosci. Abstr.* – 2000. – **23**, № 1. – P. 107–121.
60. Tsupykov O. M., Pivneva T. A., Poddubna A. O., Kyryk V. M., Kuchuk O. V, Butenko G. M., Skibo G.G. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals // *IJPP.* – 2010. – **1**, № 1. – P. 25–34.
61. van Praag H., Schinder A., Gage F. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature.* – 2002. – **415**, № 6875. – P. 1030–1034.
62. Wright N.A. Stem cell identification--in vivo lineage analysis versus in vitro isolation and clonal expansion. // *J. Pathol.* – 2012. – **227**, № 3. – P. 255–266.
63. Yagita Y., Kitagawa K., Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus // *Stroke.* – 2001. – **32**, № 8. – P. 1890–1896.
64. Yao J., Mu Y., Gage F.H. Neural stem cells: mechanisms and modeling // *Protein Cell.* – 2012. – **3**, №7. – P. 559.
65. Yoshida N., Hishuyama S., Hisatsune T. Decrease in expression of $\alpha 5\beta 1$ -integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells // *Exp. Cell. Res.* – 2003. – **287**, № 1. – P. 240–254.

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

Матеріал надійшов до редакції 19.12.2012

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

Катерина Олегівна Богомолець

20 лютого 2013 р. на 74-му році життя після важкої хвороби померла вчений-патолог і громадський діяч, професор кафедри патологічної анатомії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця Богомолець Катерина Олегівна.

Катерина Олегівна пройшла славний життєвий шлях. У 1963 р. закінчила Київський медичний інститут ім. О.О. Богомольця за фахом «Лікарська справа» і почала трудову діяльність лікарем НДІ туберкульозу та грудної хірургії в м. Києві.

З 1966 до 1969 рр. – аспірант, а з 1969 р. до 1973 р. – молодший науковий співробітник відділу морфології та гістохімії НДІ ендокринології та обміну речовин. У 1970 р. захистила кандидатську дисертацію. З 1973 р. – асистент кафедри патологічної анатомії Київського медінституту ім. О.О. Богомольця, з 1979 р. – доцент, а з 2001 р. – професор цієї кафедри.

К.О. Богомолець обиралась членом вченої ради «Морфологія людини» та вченої ради педіатричного факультету Київського медичного інституту ім. О.О. Богомольця. Була рецензентом часописів «Лікарська справа» та «Український журнал патології». Здійснювала кураторство патологоанато-

мічних служб Чернігівської та Черкаської областей. Очолювала клінічну базу кафедри у об'єднаній прозектурі дитячого віку при ДСКЛ №14 м. Києва. Була куратором з підготовки науково-педагогічних кадрів для вищих медичних наукових закладів України на ФПК Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; науковим керівником кандидатських і консультантом докторських дисертацій за фахом «Патологічна анатомія».

За сумлінну працю та заслуги в підготовці науково-медичних кадрів К.О.Богомолець нагороджена знаком «Відмінник охорони здоров'я», медаллю «Ветеран праці», мала подяки ректора Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця.

Професор К.О. Богомолець – онука засновника Інституту фізіології НАН України. Була членом патофізіологічного товариства України, брала активну участь у його засіданнях і конгресах.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та Наукове товариство патофізіологів України висловлюють глибоке співчуття рідним і близьким покійної та розділяють з ними біль цієї тяжкої втрати.

CONTENTS

K.I. Kuznetsov, N.N. Veselovskaya, V.Y.Maslov, S.A.Fedulova, M.S. Veselovsky. Electrical properties of retinal ganglionic cells of the rats with streptozotocine-induced diabetes	3
O.M. Semenykhina, N.A. Strutynska, A. Yu. Budko, G.L. Vavilova, V.F. Sagach. Effect of hydrogen sulfide donor NaHS on the functional state of the respiratory chain of rat heart mitochondria	9
M.R. Khara, S.I. Pavlovych, V.M. Mykhailyuk. Sex difference of functional and structural alterations in rat myocardium under hypothyroidism	18
M. Ya. Spivak, L.M. Lazarenko, T.M. Falalyeyeva, O.V. Virchenko, K.S. Neporada. Prophylactic influence of probiotic strains bifidobacterium animalis VKL and VKB on stress-induced lesions in the gastric mucosa of rats	23
P.I. Yanchuk, O.V. Bondzyk, E.M. Reshetnik, S.P. Veselsky. Effect of L-arginine on the oxygen balance of the liver and its bile secretion function	31
E.O. Asanov, E.D. Osmak, L.A. Kuzminskaya. Peculiarities of the response of the sympathoadrenal system to psychoemotional stress under hypoxic conditions in aged people with physiological and accelerated aging of respiratory system	39
V.A. Berezovskiy, T.M.Zamorska, R.V. Yanko. The effects of oxygen partial pressure changes on the osteometric markers of bone tissue in rats	47
L.V. Garmanchuk, A.N.Makarenko, N.N. Khranovskaya, T.V. Nikolayenko, V.V. Nikulina, K.D. Nepiyvoda, L.I. Ostapchenko, S.G. Morozov, N.S. Kositsyn. Mitokorrekcin stimulates angiogenesis in vitro	52
M.M. Kondro, T.I. Galenova, M.U. Kyznecova, O.M. Savchyk. Expression changes in insulin receptor in subcellular fractions of muscular and adipose tissue as the factor of the tissue insulin resistance development in rats under conditions of the high-energy diet	59
O.P. Dolaychuk, R.S.Fedoruk, I.I. Kovalchuk. The impact of components conventional and genetically modified soybeans on parameters of the immune and reproductive systems female rats	65
Yu.A. Koryak. Influence of physical training UNDER conditions of 120-day simulated microgravity on contractile properties and musculo-tendinous stiffness of the human triceps surae muscle	71
I.E. Sergeieva. Pathogenetic conditioning of peptidases assignments in the treatment of patients with generalized periodontitis	85
S.R.Pidruchna. Changes in the content of reduced glutathione in severe injuries and combined trauma	92
N.E. Lapovets. Changes in the levels of interleukins and humoral immunity before and after Koch's test in patients with abdominal tuberculosis	96
A.S. Zhukovska, A.M. Shysh, M.O. Kuzmenko. Correction of cardiodynamics in experimental diabetes by ω -3 polyunsaturated fatty acids	100
REVIEWS	
N.S. Petrenko, O.A. Krishtal. P2X3-receptor desensitization as an alternative mechanism of analgesia	104
O.A. Rybachuk, T.A. Pivneva. Neural stem cells – strategies of regeneration of central nervous system	111

