

Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 4 2013

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

Головному редактору “Фізіологічного журналу” Сагачу Вадиму Федоровичу – 70 років	3
<i>Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В.</i> Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на функцію серця в умовах ішемії–реперфузії	8
<i>Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Ровенець Р.А., Струтинська Н.А., Ягупольський Ю.Л., Сагач В.Ф., Мойбенко О.О.</i> Дослідження біохімічних механізмів кардіопротекторної дії лікарської форми активатора аденозин-трифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда	16
<i>Луцько О.В., Федоренко О.А., Марченко С.М.</i> Вплив Ca^{2+} на властивості катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани нейронів мозочка	28
<i>Войтенко В.В., Конопельнюк В.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І.</i> Механізми виникнення переддіабетичного стану за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації	33
<i>Льобич Л.Д., Семенова В.М., Лісяний М.І.</i> Порівняльна патоморфологічна оцінка клітинно-тканинних реакцій мозку мишей-реципієнтів на імплантацію сингенних та алогенних нейроклітин	40
<i>Янчій Р.І., Калейнікова О.М., Вознесенська Т.Ю., Блашків Т.В., Бідзіля Ю.П.</i> Скоротливість міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій	51
<i>Андрєєва О.Ю., Солдатов О.О.</i> Функціональна морфологія ядерних еритроцитів в умовах гіпоксії (експерименти <i>in vitro</i>)	56
<i>Шухтін В.В., Гоженко А.І., Левицький А.П.</i> Патогенез уражень шкіри у шурів з імунodefіцитним станом	63
<i>Максимчук О.В., Чащин М.О.</i> Стресіндуковані зміни вмісту цитохрому P450 2E1 в печінці мишей при хронічному психоемоційному перенапруженні	67

<i>Хілько Т.Д., Якубова І.В., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.</i> Глікопротеїни шлункового і дуоденального слизу при ульцерогенезі та при введенні екстракту фенугреку	74
<i>Пархоменко О.М., Гур'єва О.С., Корнацький Ю.В., Кожухов С.М., Сопко О.О.</i> Вплив порушення функції нирок на перебіг інфаркту міокарда, ускладненого серцевою недостатністю з збереженою систолічною функцією лівого шлуночка серця	80
<i>Веселовська Н.М., Веселовська З.Ф., Слободянюк І.М., Слободянюк М.І.</i> Вплив умов професійної діяльності лікарів-мікрохірургів на ризик розвитку судинної патології органа зору	88
ОГЛЯДИ	
<i>Мінченко Д.О., Кубайчук К.І., Губеня О.В., Кривдюк І.В., Хоменко Є.В., Герасименко Р.М., Сулік Р.В., Мурашко Н.К., Мінченко О.Г.</i> Стрес ендоплазматичного ретикулула та ангіогенез	93
ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ	
Зайчик А.М. (до 75-річчя з дня народження)	107
Янчій Р.І. (до 70-річчя з дня народження)	110
Єльський В.М. (до 80-річчя з дня народження)	112



Сагач

ВАДИМ ФЕДОРОВИЧ САГАЧ (до 70-річчя з дня народження)

Видатному вченому в галузі фізіології та патофізіології серцево-судинної системи, заступнику директора Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, завідувачу відділу фізіології кровообігу, головному редактору “Фізіологічного журналу” та “International Journal of Physiology and Pathophysiology”, двічі лауреату Державної премії України та премії ім. О.О. Богомольця НАН України, члену-кореспонденту НАН України, доктору медичних наук, професору Вадиму Федоровичу Сагачу 21 вересня 2013 р. виповнюється 70 років.

В.Ф. Сагач народився в освітянській родині, яка перебувала в евакуації у с. Мала Кандаля Мало-Кандалінського району Ульяновської області. Наступного року родина повернулася до м. Херсон, де він виріс. По закінченні в 1960 р. середньої школи він вступає до Ленінградського медичного інституту. Під час навчання знайомиться та спілкується з відомим патофізіологом, учнем академіка О.О. Богомольця, професором Л.Р. Перельманом. Після закінчення у 1966 р. інституту Вадим Федорович служив в армії, а потім працював лікарем Херсонського морського порту.

У 1970 р. В.Ф. Сагач вступає до аспірантури Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Його науковим керівником став інший видатний учень О.О. Богомольця, всесвітньо відомий патофізіолог і геронтолог, академік АМН СРСР Микола Миколайович Горев. У 1974 р. В.Ф. Сагач захистив кандидатську дисертацію "Моделирование и гемодинамическая характеристика дистрофических повреждений миокарда".

Після захисту дисертації Вадим Федорович працює молодшим, а потім старшим науковим співробітником відділу експериментальної кардіології, який очолює видатний патофізіолог О.О. Мойбенко. У 1986 р. В.Ф. Сагач обирається завідувачем відділу фізіології кровообігу та захищає докторську дисертацію. "Механизмы нарушения кардио-и гемодинамики иммунного генеза". В 1992 р. В.Ф. Сагач призначається заступником директора з наукової роботи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, що дало змогу йому у не простий для української науки час співпрацювати, відчуваючи доброзичливе відношення, з корифеєм української фізіологічної науки, директором Інституту академіком Платоном Григоровичем Костюком.

Основними напрямками діяльності В.Ф. Сагача є вивчення імуногенних змін діяльності серця та системної гемодинаміки; механізми порушень кровообігу при дії екстремальних факторів і пошук шляхів їх корекції; механізми впливу місцевих гормонів (ейкозаноїдів,

тромбоцитарного фактора, оксиду азоту, ендотеліну, сірководню тощо) на гемодинаміку та їх роль у змінах кровообігу у разі екстремальних впливів, значення ендотеліальних факторів у розвитку фундаментальних судинних реакцій і змінах діяльності серця.

Великі дослідження проведено Вадимом Федоровичем зі з'ясування механізмів змін кровообігу імунного походження. Вперше отримано детальні відомості про механізми порушень за цих умов скоротливої функції міокарда, системного та коронарного кровообігу. Показано важливу роль похідних метаболізму арахідонової кислоти, простагландинів і лейкотриєнів у розвитку цих порушень. В.Ф. Сагач виконав значні дослідження зі з'ясування механізмів змін гемодинаміки та діяльності серця при дії екстремальних факторів (гіпертермії, анафілаксії, реперфузії тощо). Ним обґрунтовано центральну роль у розвитку цих змін реакції периферичних венозних судин.

Широко залучаючи методи клітинної біології, біохімії В.Ф. Сагач досяг значних успіхів у своїй галузі і успішно переносить отримані знання в клініку. В його науковому доробку вперше описана низка невідомих раніше явищ і механізмів функціонування організму та розвитку патологічних процесів. Результатом його ранніх досліджень стала розробка оригінальної моделі локального імуногенного ушкодження тканин міокарда. Було вивчено механізми імуногенних порушень діяльності серця та розвитку серцево-судинної недостатності, що супроводжували інфаркт міокарда імунного походження. Вадим Федорович вперше в світі описав явище кардіоваскулярного гуморального впливу, що відбувається при виділенні з клітин серця і впливі на периферичні судини похідних метаболізму мембранних фосфоліпідів – ейкозаноїдів, які призводять до депонування крові в венах і розвитку серцево-судинної недостатності. Ним вперше обґрунтовано використання блокаторів синтезу цих сполук

для кардіопротекції та попередження шоків станів. Проведено ґрунтовні дослідження зі з'ясування ролі оксиду азоту, ендотеліну та тромбоцитарного фактору в змінах функціонального стану серцево-судинної системи і розвитку його порушень. Вперше було показано, що розвиток фундаментальних судинних реакцій – реактивної і функціональної гіперемії є ендотелійзалежним і зумовлений дією оксиду азоту. Вперше було показано залучення оксиду азоту і ендотеліну до центральної регуляції кровообігу нейронами довгастого мозку. В.Ф. Сагач вперше обґрунтував вирішальну роль синтезу оксиду азоту в реалізації фундаментального механізму регуляції скоротливої активності міокарда – механізму Франка – Старлінга – найменш енергозатратного підвищення сили скорочень серця. Таке підвищення ефективності цього механізму описано у адаптованих до фізичного навантаження (тренуваних) тварин і показана його зумовленість збільшенням синтезу оксиду азоту та сірководню. Показано також, що зниження синтезу оксиду азоту та відповідні функціональні наслідки цього – (розвиток діастолічної дисфункції серця) спостерігаються при атеросклерозі, гіпертензії, діабеті, паркінсонізмі та у старих тварин.

Вперше доведено, що стомлення працюючого м'яза зумовлено відкриванням мітохондріальної пори, блокада якої попереджає розвиток останнього. Показано, що чутливість до індукторів її відкривання значно вища у старих організмів і вона залежить від рівнів синтезу оксиду азоту та сірководню, які пригнічують її відкривання. Визначена роль мітохондріальної пори, а також мітохондріальних роз'єднувальних білків та біосинтезу убіхінону в змінах кардіодинаміки при старінні, фізичному тренуванні, гіпертензії та паркінсонізмі. Вперше розроблено метод визначення відкривання мітохондріальної пори в умовах ізольованих органів та цілого організму, що є хорошим маркером пошкодження тканин в умовах клініки та дає можливість з'ясувати ефективність кардіо- та нейропро-

текції. Це підтверджено під час операцій на серці та судинах кінцівок.

В останні роки він досліджує роль ендогенного сірководню в реакціях серцево-судинної системи та розвитку її патологічних змін. Показано зменшення його синтезу в тканинах при старінні, гіпертензії та збільшення при фізичному тренуванні. Показаний його тісний зв'язок зі змінами функції серця при цих станах, а також його значення в реакції на ішемію–реперфузію і в ефективності механізму Франка–Старлінга.

В.Ф. Сагач є автором і співавтором 750 публікацій з яких 2 монографії, 340 статей та 7 патентів, надрукованих у вітчизняних і закордонних наукових виданнях. Його наукові досягнення визнані і відзначені премією ім. О.О. Богомольця НАН України (1994 р.), та двома Державними преміями України в галузі науки та техніки (1996, 2003 рр.). Він доповідав результати своїх досліджень на багатьох міжнародних та українських наукових форумах.

Вадим Федорович талановитий педагог і вихователь наукових кадрів, підготував 4 доктори (Л.М. Шаповал, М.М. Ткаченко, А.В. Дмитрієва, С.Б. Коваль) і 16 кандидатів медичних та біологічних наук (М.М. Ткаченко, О.С. Хромов, Т.В. Шиманська, А.М. Кіндибалюк, О.І. Бондаренко, О.Я. Андрухов, В.В. Яроцький, С.Б. Надточій, А.Ю. Богуславський, О.В. Рудик, О.Д. Присяжна, Ю.П. Коркач, С.О. Таланов, С.В. Чорна, Ю.В. Гошовська, Н.О. Дорофєєва), керує виконанням 4 кандидатських робіт. Його висококваліфіковані вихованці очолюють кафедри та працюють у провідних лабораторіях США, Великобританії, Бельгії та Австрії. Він сам як професор працював в інститутах Великобританії (1995, 1996 р.), США (2000 р.) та Італії (2002 р.) Протягом останніх 18 років В.Ф. Сагач також професор Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Він висококваліфікований лектор, вимогливий, але доброзичливий наставник молоді, здатний зацікавити слухачів і заохотити їх до вивчення своєї дисципліни, до наукової

праці та пошуків. В.Ф. Сагач щедро ділиться досвідом і знаннями зі своїми учнями та співробітниками.

У 1995 р. В.Ф. Сагача було обрано членом-кореспондентом НАН України зі спеціальності фізіологія людини і тварин. У цьому самому році його призначають головним редактором одного з провідних наукових журналів України – «Фізіологічного журналу» НАН України. Очолюючи журнал, він продовжує славні традиції, започатковані академіками О.Ф. Макарченком і П.М. Серковим. З 2010 р. В.Ф. Сагач засновник і головний редактор “International Journal of Physiology and Pathophysiology” (США), член редколегії журналу “Кровообіг та гемостаз”.

Крім наукової, науково-організаційної та викладацької діяльності В.Ф. Сагач протягом багатьох років бере активну участь в роботі з атестації наукових кадрів. Упродовж 33 років є членом та заступником голови Спеціалізованої вченої ради при Інституті фізіології ім.

О.О. Богомольця НАН України, 6 років був заступником голови експертної ради ВАК з біологічних наук, 4 роки він був членом Президії ВАК України, нині експерт МОН України.

В.Ф. Сагач також багаторічний керівник сектора фізіології вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, голова київської секції фізіологічного товариства України, віце-президент українського фізіологічного та член президії українського патофізіологічного товариства.

Невтомний трудівник, висококваліфікований дослідник, видатний вчений і талановитий організатор наукової справи, яскрава особистість, чуйна і щира людина, Вадим Федорович користується заслуженим авторитетом і пошаною наукової громади. В.Ф. Сагач сповнений творчих сил і задумів – нових наукових ідей і планів.

Від усього серця вітаючи ювіляра, зичимо йому щастя, доброго здоров'я, успіхів у подальшій реалізації творчих задумів.

Редколегія журналу

В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська

Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на функцію серця в умовах ішемії–реперфузії

В дослідженнях на ізольованих серцях щурів, що перфузували за методом Лангендорфа, вивчали ефекти стимуляції синтезу і блокади ендogenous сірководню при ішемії–реперфузії міокарда (20 хв / 40 хв). За 30 хв до початку експерименту внутрішньоочеревинно вводили попередник синтезу ендogenous сірководню L-цистеїну (121 мг / кг). За аналогічною схемою його застосовували через 10 хв після введення DL-пропаргілгліцину (11,3 мг / кг; «Sigma», США) – інгібітора цистатіонін- γ -ліази – ферменту, який синтезує сірководень з L-цистеїну. Ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран – утворення мітохондріальних пор – оцінювали за вивільненням у коронарне русло мітохондріального фактора ($\lambda = 250$ нм). Показано, що стимуляція синтезу ендogenous сірководню за допомогою введення щуром його попередника L-цистеїну зменшує реперфузійні порушення функції серця порівняно з контрольними щурами. Введення L-цистеїну на тлі блокади цистатіонін- γ -ліази за допомогою DL-пропаргілгліцину справляло потужний кардіопротекторний ефект при ішемії–реперфузії, що проявлявся в істотному зменшенні реперфузійних порушень кардіодинаміки і скоротливої функції міокарда, підвищенні ефективності метаболізму кисню. Одним із шляхів позитивного впливу комбінованої дії DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну стало запобігання утворенню мітохондріальних пор.

Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, DL-пропаргілгліцин, ізольоване серце, ішемія–реперфузія, мітохондріальна пора.

ВСТУП

Питання механізмів порушень у серцево-судинній системі при ішемії–реперфузії залишається нез'ясованим, незважаючи на чисельні дослідження останніх десятиліть [8]. Попередження цих порушень надзвичайно актуальне, особливо для хірургічної клініки серцево-судинних захворювань. В останні роки з'явилася можливість подивитися на цю проблему під кутом зору з'ясування ролі нового газового трансмітера – сірководню. Встановлено, що він синтезується в організмі з L-цистеїну за допомогою трьох ферментів – цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, які експресуються в тканинах серцево-судинної, нервової системи та в мітохондріях відпо-

відно. Сірководень відіграє суттєву роль як в фізіологічних реакціях, так і при розвитку багатьох патологічних станів [9, 21], зокрема в порушеннях діяльності серця і судинного тону при ішемії–реперфузії [10, 17]. Показано, що введення донора сірководню істотно попереджує пошкодження міокарда при ішемії–реперфузії [6, 7, 17, 19] за рахунок протиапоптотичної і протизапальної його дії. Підвищення концентрації ендogenous сірководню також можна досягти не тільки введенням його донорів, але і за допомогою застосування попередника його синтезу L-цистеїну [15]. Відомо, що останній здатний зменшувати негативний вплив ішемії–реперфузії на міокард, а саме обмежувати зону інфаркту [11], збільшувати активність супероксиддисмутази та пригнічувати продукцію

активних форм кисню (АФК) [20]. Отже, L-цистеїн може використовуватися клітиною для синтезу сірководню, який відіграє роль тригера у кардіопротекторних механізмах міокарда.

Мета нашої роботи – з'ясувати ефекти стимуляції та блокади синтезу ендogenous сірководню на функцію серця в умовах ішемії–реперфузії.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Кардіодинаміка ізольованого серця. На ізольованих серцях щурів лінії Вістар масою 350–400 г здійснювали ретроградну перфузію коронарних судин при постійному тиску 75 мм рт. ст., 37°C, аерації карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂) розчином Кребса-Хензелейта такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5. Тиск, що розвивається в порожнині лівого шлуночка (ТЛШ), його першу похідну dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцево-діастолічний тиск (КДТ) вимірювали тензодатчиком 746 («Мінгограф-82», Elema, Швеція) і реєстрували цифровий сигнал за допомогою програмного забезпечення Global Lab 2.0. Коронарний потік визначали як об'єм розчину, що відтікав від серця за 1 хв. Розраховували інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) як добуток тиску, що розвивається в лівому шлуночку, і частоти серцевих скорочень (ЧСС). Для розрахунку споживання кисню міокардом на газоаналізаторі BMS 3 Mk 2 (Данія) електродом Кларка вимірювали напруження кисню у пробах розчину, що притікав до серця і відтікав від нього через катетер у легеневому стовбурі. Кисневу вартість роботи серця розраховували як співвідношення споживання кисню до ІСФ.

Ішемію–реперфузію серця моделювали за допомогою повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв. Під час іше-

мії серця занурювали у перфузійний розчин (t=37°C). Зміни досліджуваних показників реєстрували до ішемії і протягом 40 хв після відновлення перфузії коронарних судин.

Для оцінки ступеня проникності мітохондріальних мембран і виявлення мітохондріального фактора, який зумовлює характерний пік екстинкції при довжині хвилі 245–250 нм і може бути маркером відкривання мітохондріальних пор в умовах *in situ* та *in vivo*, за допомогою спектрофотометра ($\lambda = 230\text{--}260$ нм) реєстрували оптичну густину розчину, що відтікав від серця до ішемії і за 1 хв реперфузії [2].

Проводили наступні серії експериментів: I. – контрольна ішемія–реперфузія, II – ішемія–реперфузія на фоні внутрішньоочеревинного введення L-цистеїну («Sigma», США) у концентрації 121 мг/кг, III – ішемія–реперфузія на фоні послідовного внутрішньоочеревинного введення водного розчину DL-пропаргілгліцину («Sigma», США) – інгібітора цистатіонін- γ -ліази – у концентрації 11,3 мг/кг і через 10 хв L-цистеїну. Через 30 хв після останнього введення препаратів продовжували експеримент в умовах ізольованого серця.

Статистичну обробку результатів здійснювали за програмою Origin 6.1 і виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших досліджень свідчили, що ізольовані серця щурів, яким за 30 хв до початку експерименту вводили L-цистеїн, легше долали ішемічно–реперфузійне навантаження, ніж серця контрольних тварин. При цьому характер змін досліджуваних показників в обох серіях експериментів був практично ідентичним (рис. 1). Максимальний позитивний ефект L-цистеїну відмічали на 10-й хвилині реперфузії, коли ступінь зниження ТЛШ (див. рис. 1, а) і скоротливої активності міокарда (див. рис. 1, в) був

меншим, ніж у контрольній серії. На відміну від донора сірководню NaHS [6] L-цистеїн в наших експериментах знижував вихідний рівень коронарного потоку (див.рис. 1, б), однак споживання кисню міокардом при цьому достовірно не змінювалося, що свідчило про інтенсифікацію процесів утилізації кисню. Тобто при введенні L-цистеїну спостерігали більш ефективне використання кисню, що підтверджувалося зменшенням кисневої вартості роботи серця на 20 %. Цей ефект зберігався і протягом реперфузії (рис. 2).

Ми припустили, що за аналогією з NaHS оптимізація кисневого обміну зумовлена впливом L-цистеїну на проникність мітохондріальних мембран. Відомо, що NaHS сприяє запобіганню процесу утворення мітохондрі-

альних пор і зменшує чутливість мітохондріальних мембран до індуктора їх відкриття – іонів кальцію [4, 6, 7]. В експериментах на суспензії мітохондрій серця Струтинською та співавт. [4] було показано, що в порівнянні з NaHS дія L-цистеїну була більш ефективною щодо запобігання кальційіндукованого відкриття мітохондріальної пори: спостерігали збільшення на порядок концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці шурів. Це пов'язують з можливим залученням L-цистеїну в ендogenous шляхи синтезу сірководню, а також з його антиоксидантними властивостями.

Таким чином, внутрішньоочеревинне введення L-цистеїну справляло певний позитивний вплив на функціонування серця, який

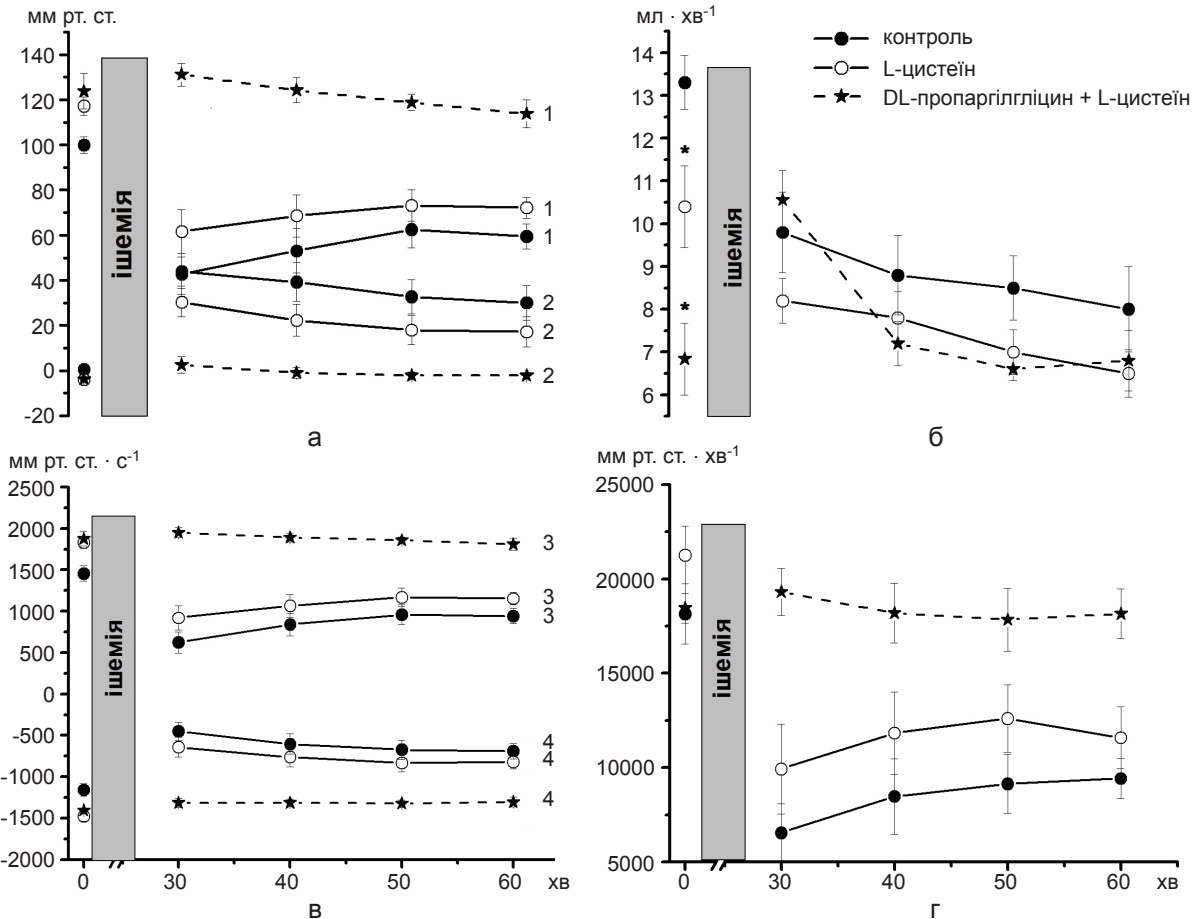


Рис. 1. Зміни показників кардіодинаміки при реперфузії міокарда у контрольних умовах і після застосування L-цистеїну при комбінації з DL-пропаргілгліцином і без нього: а – розвинутий (1) і кінцево-діастолічний тиск (2) у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення (3) і розслаблення (4) міокарда; г – інтенсивність скоротливої функції серця

проявлявся у зменшенні ішемічно-реперфузійних порушень його роботи.

Для підтвердження кардіопротекторного ефекту L-цистеїну на наступному етапі роботи використовували інгібітор цистатіонін- γ -ліази DL-пропаргілгліцин. Несподіваним для нас було те, що застосування L-цистеїну на фоні DL-пропаргілгліцину перед ішемією-реперфузією мало потужний захисний вплив на міокард, що істотно перевищував такий після введення самого L-цистеїну (див. рис. 1). Спостерігали значне попередження реперфузійних порушень усіх досліджуваних показників функціонального стану серця. До кінця реперфузійного періоду була зареєстрована достовірна різниця між серіями експериментів щодо змін ТЛШ ($92 \pm 5,3$ % вихідного рівня порівняно з $30 \pm 9,4$ % у контрольній серії, див. рис. 1, а), швидкості скорочення ($96,0 \pm 4,0$ % щодо $64,7 \pm 9,8$ % у контрольній серії) і розслаблення міокарда ($92,95 \pm 4,5$ % порівняно з $59,6 \pm 13,3$ % у контролі, $P < 0,01$ див. рис. 1, в). КДТ практично не змінювався, а ІСФ через 40 хв реперфузії відновлювалася до $98,3 \pm 7,2$ % (див. рис. 1, г).

Найбільший інтерес становила динаміка коронарного потоку протягом реперфузії. На відміну від контрольної серії, коли спостерігалось лавиноподібне зменшення коронарного потоку після відновлення перфузії,

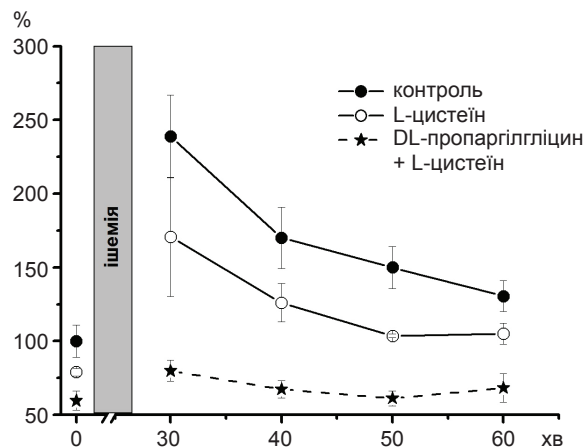


Рис. 2. Вплив L-цистеїну і DL-пропаргілгліцину на зміни кисневої вартості роботи серця при ішемії-реперфузії

спільна дія L-цистеїну і DL-пропаргілгліцину супроводжувалася істотним його підвищенням до 10-ї хвилини реперфузії порівняно з вихідним рівнем (див. рис. 1, б). Ми виявили, що L-цистеїн як сам по собі, так і на тлі дії DL-пропаргілгліцину зменшував вихідний рівень коронарного потоку. Цілком імовірно, що підвищення тону коронарних судин при блокаді синтезу сірководню стимулювало запуск механізмів розслаблення, одним з яких може бути активація синтезу оксиду азоту. У такому разі останній відіграє роль прекондиторера при ішемії-реперфузії. Раніше нами було показано, що оксид азоту не тільки модулює тонус судин, але і впливає на роботу дихального ланцюга мітохондрій, виступає інгібітором утворення мітохондріальних пор, які багато в чому зумовлюють ступінь реперфузійних порушень функції міокарда [5]. Дійсно, після послідовного введення DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну киснева вартість роботи серця тварин під час реперфузії практично не змінювалася, в той час як у контрольній групі цей показник зростав у 2,4 рази (див. рис. 2). Це свідчило про більш ефективне використання кисню міокардом тварин, що отримали запропоновану комбінацію сполук.

Зниження реперфузійних порушень функції серця під впливом DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну корелювало з кількістю мітохондріального фактора, який вивільнювався у коронарне русло і опосередковано свідчив про ступінь проникності мітохондріальних мембран. Приріст густини поглинання відтікаючого від серця під час реперфузії розчину був удвічі меншим, ніж у контрольній серії, що підтверджує протекторний вплив DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну при ішемії-реперфузії (рис. 3).

Таким чином, результати досліджень свідчили, що блокада перетворення L-цистеїну у сірководень за допомогою DL-пропаргілгліцину призводила до істотного зменшення ступеня реперфузійних порушень функції серця та його кисневого обміну.

Застосування цих сполук перед ішемією–реперфузією сприяло зменшенню проникності мітохондріальних мембран у міокарді тварин при реперфузії, що давало можливість серцю ефективніше використовувати кисень, зберегти енергосинтезувальну функцію мітохондрій і протистояти руйнівним наслідкам окисного стресу.

Утворення надмірної кількості активних форм кисню при різкому відновленні кровопостачання ішемізованих ділянок міокарда є основним пошкоджувальним фактором при реперфузії, що супроводжується розвитком оксидативного стресу [17]. При цьому значно порушується тканинне дихання і АТФ-синтезувальна функція мітохондрій, а відтак погіршується скоротлива активність серця [8]. Це відбувається внаслідок відкривання під впливом АФК або іонів кальцію мітохондріальної пори, що як відомо супроводжується вивільненням з мітохондрій значної кількості вільних радикалів і розвитком оксидативного стресу і підтверджується кардіопротективною дією сполук, які мають інгібуючий вплив на неї [3, 18].

Одним із шляхів захисного ефекту блокади синтезу сірководню може бути стимуляція утворення оксиду азоту або спрямування перетворення L-цистеїну за іншими метаболічними шляхами, а саме підвищення синтезу

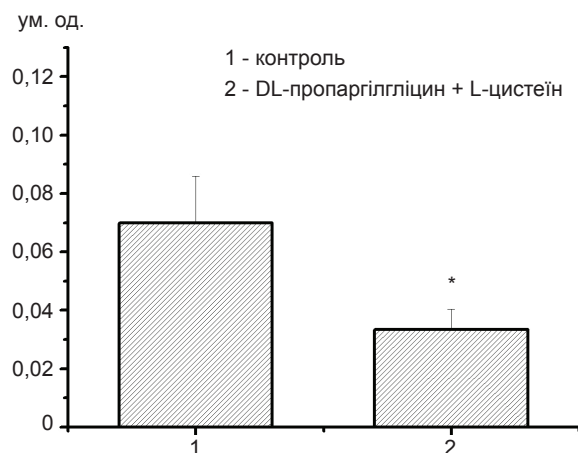


Рис. 3. Вплив L-цистеїну і DL-пропаргілглїцину на оптичне поглинання розчину, що відтікав від серця за 1-шу хвилину реперфузії. * $P < 0,05$

сірководню в мітохондріях або утворення глутатіону. Отримані нами результати підтверджують припущення про участь оксиду азоту в реалізації кардіопротекторного ефекту при застосуванні DL-пропаргілглїцину і L-цистеїну. Літературні дані свідчать, що сірководень може взаємодіяти з оксидом азоту з утворенням тіолчутливої молекули типу HNO і розвитком позитивного інотропного ефекту [22]. Однак існують повідомлення, що оксид азоту не задіяний у реакціях релаксації, зумовлених впливом сірководню [16].

Не виключена можливість саме такого перебігу подій: цілком імовірно, що в разі пригнічення активності цистатіонін- γ -ліази DL-пропаргілглїцином, під дією якої з L-цистеїну утворюється сірководень, стимулюється активність іншого ферменту синтезу сірководню – 3-меркаптопіруватамінотрансферази (3MST), і саме синтезований цим шляхом сірководень зумовлює захисний ефект. Виявлено, що H_2S , який продукується 3MST, що локалізована головним чином в мітохондріях, зменшує генерацію активних форм кисню в цих органелах [13]. Це питання потребує подальших досліджень.

Вживання клітин і відновлення їх функцій при окисному стресі багато в чому залежить від активності антиоксидантної системи. Сучасні наукові дані та результати власних досліджень свідчать, що використання тролоксу, мелатоніну, коензиму Q_{10} , які мають антиоксидантні властивості і виступають блокаторами утворення мітохондріальних пор, зменшує реперфузійні порушення функції серця, але не до повного її відновлення, що практично спостерігалось в наших експериментах з L-цистеїном [1, 3]. Більш важливим є стимуляція власної антиоксидантної системи кардіоміоцитів, яка може забезпечити повноцінне відновлення скоротливої функції серця в реперфузійний період.

Ми припускаємо, що застосування L-цистеїну на тлі попереднього введення DL-пропаргілглїцину давало змогу активізувати захисні властивості міокарда через спряму-

вання метаболічних шляхів перетворення L-цистеїну в антиоксидантні сполуки, а саме – глутатіон. Підтвердженням цього є повідомлення про H_2S -опосередкований захист клітин, пов'язаний з поліпшенням балансу між відновним і окисненим глутатіоном (GSH /GSSG) [12, 14]. Крім того, на моделі ішемії-реперфузії печінки показано, що H_2S інгібує апоптоз за допомогою збільшення експресії білка теплового шоку (HSP-90) і Bcl-2, антиапоптотичного протеїну, який запобігає вивільненню цитохрому c. Автори свідчать, що сірководень захищає клітини активацією антиоксидантних і антиапоптотичних сигнальних шляхів [12]. Отже, на наш погляд, введення L-цистеїну на фоні інгібування цистатіонін- γ -ліази перед ішемією–реперфузією запускає у клітинах потужний захисний механізм, в якому можуть брати участь оксид азоту, глутатіон і сірководень, синтезований 3MST.

Таким чином, стимуляція синтезу ендogenous сірководню за допомогою застосування його попередника L-цистеїну, призвела до зменшення реперфузійних порушень функції міокарда. L-цистеїн, що вводився на тлі блокади цистатіонін- γ -ліази – одного з ферментів його синтезу – за допомогою DL-пропаргілгліцину, активізував такі метаболічні шляхи, що давало можливість серцю з легкістю справлятися з ішемічно-реперфузійним навантаженням.

ВИСНОВКИ

1. Стимуляція синтезу ендogenous сірководню через внутрішньоочеревинне введення шурам його попередника L-цистеїну зменшувала ступінь реперфузійних порушень функції серця порівняно з контрольними шурами.

2. Введення L-цистеїну на тлі блокади цистатіонін- γ -ліази - одного з ферментів його синтезу - за допомогою DL-пропаргілгліцину мало ще потужніший кардіопротекторний ефект при ішемії-реперфузії, що проявлявся в істотному зменшенні реперфузійних порушень кардіодинаміки та скоротливої функції

міокарда, а також збільшувало ефективність кисневого метаболізму.

3. Одним зі шляхів позитивного впливу комбінованої дії DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну було запобігання утворенню мітохондріальних пор.

В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманская, Ю.В. Гошовская

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ И БЛОКАДЫ СИНТЕЗА ЭНДОГЕННОГО СЕРОВОДОРОДА НА ФУНКЦИЮ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

В опытах на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа, изучали эффекты стимуляции синтеза и блокады эндогенного сероводорода при ишемии-реперфузии миокарда (20 мин / 40 мин). За 30 мин до начала эксперимента внутривенно вводили предшественник синтеза эндогенного сероводорода L-цистеин (121 мг/кг). По аналогичной схеме L-цистеин применяли через 10 мин после введения DL-пропаргилглицина (11,3 мг/кг; «Sigma», США) – ингибитора цистатіонін- γ -ліази – фермента, синтезирующего сероводород из L-цистеина. Степень нарушения проницаемости митохондриальных мембран – образование митохондриальных пор – оценивали по высвобождению в коронарное русло митохондриального фактора ($\lambda = 250$ нм). Показано, что стимуляция синтеза эндогенного сероводорода путем введения крысам его предшественника L-цистеина уменьшала реперфузионные нарушения функции сердца по сравнению с контрольными крысами. Введение L-цистеина на фоне блокады цистатіонін- γ -ліази с помощью DL-пропаргилглицина оказывало мощный кардиопротекторный эффект при ишемии-реперфузии, выражавшийся в существенном уменьшении степени реперфузионных нарушений кардиодинамики и сократительной функции миокарда, повышении эффективности метаболизма кислорода. Одним из путей позитивного влияния комбинированного действия DL-пропаргилглицина и L-цистеина явилось предотвращение образования митохондриальных пор.

Ключевые слова: сероводород, L-цистеин, DL-пропаргилглицин, изолированное сердце, ишемия–реперфузия, митохондриальная пора.

V.F. Sagach, T.V. Shimanskaya, Y.V. Goshovska

EFFECTS OF STIMULATION AND BLOCKADE OF THE SYNTHESIS OF ENDOGENOUS HYDROGEN SULFIDE AT MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION

In experiments on isolated rat hearts, perfused according to Langendorff method, the effects of stimulation of the synthesis

and blockade of endogenous hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion (20min/40min) was studied. L-cysteine (121 mg / kg), precursor of endogenous hydrogen sulfide was injected intraperitoneally 30 minutes before the experiment without and within 10 minutes after administration of DL-propargylglycine (11.3 mg / kg) ("Sigma", USA) - inhibitor of cystathionine- γ -lyase. The heart function was assessed by measuring the LVDP, dP/dt, coronary flow, heart rate. The opening of mitochondria permeability transition (MPT) pore was estimated by releasing of a stable factor with UV absorbance (λ_{\max} 250 nm) into the coronary outflow probes during the initial phase of reperfusion. Administration L-cysteine was accompanied by a decrease of reperfusion disorders in cardiac function compared to control rats. The results showed that L-cysteine pretreated hearts against the blockade of cystathionine- γ -lyase with DL-propargylglycine exerted a powerful cardioprotective effect in ischemia-reperfusion injury. Significant post-ischemic recover of heart function and improving the efficiency of oxygen metabolism was accompanied with tiny quantity of mitochondrial factor releasing comparing to I/R group. Positive influence of the combined DL-propargylglycine and L-cysteine action was the prevention of MPT pore opening.

Key words: hydrogen sulfide, L-cysteine, DL-propargylglycine, isolated heart, ischemia-reperfusion, mitochondrial permeability transition pore.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів мітохондріальної пори // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №6. – С. 3–9.
- Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Там само.* – 2003. – **49**, №4. – С. 6–12.
- Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Рудик О.В., Добровольський Ф.В., Шиманська Т.В., Медведєв О.С. Інгібування мітохондріальної пори як один із механізмів кардіопротекторної дії коензиму Q10 // *Там само.* – 2007. – **53**, №4. – С. 34–41.
- 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 щурів // *Там само.* – 2011. – **57**, №6. – С. 3–13.
- Шиманская Т.В., Ф.В.Добровольский, Г.Л.Вавилова, Н.А.Струтинская, Е.В.Рудик, Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии-реперфузии изолированного сердца // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2009. – **95**, №1. – С.28–37.
- Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Вплив сірководню на реакції ізолюваного серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії-реперфузії // *Фізіол. журн.* – 2012. – **58**, № 6. – С.57–66.
- Шиманская Т.В., Струтинская Н.А., Вавилова Г.Л., Гошовская Ю.В., Семенихіна Е.Н., Сагач В.Ф. Циклоспорин А-чувствительная митохондриальная пора как мишень кардиопротекторного действия донора сероводорода // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2013. – **99**, №2. – С.261–272.
- Camara A.K.S., Bienengraeber M., Stowe D.F. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury // *Front Physiol.* – 2011. – P.2–13.
- Dongo E., Hornyak I., Benko Z., Kiss L. The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury // *Acta Physiol. Hung.* – 2011. – **98**, №4. – P.369–381.
- 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., Lefler D.J. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P.15560–15565.
- Elsej D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F. L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2010. – **15**, №1. – P. 53–59.
- Jha S., Calvert J.W., Duranski M.R., Ramachandran A., Lefler D.J. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – **295**, №2. – P.H801–H806.
- Kimura H. Hydrogen sulfide: Its production and functions // *Exp. Physiol.* – 2011. – **96**, №9. – P. 833–835.
- Kimura, Y., Goto, Y., Kimura, H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – **12**. – P.1–13.
- Lefler C.W., Parfenova H., Basuroy S., Umstor E.S., Fedinec A.L. Hydrogen sulfide and cerebral microvascular tone in newborn pigs // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2011. – **300**. – P.H440–H447.
- Monjok E.M., Kulkarni K.H., Kouamou G., McKoy M., Opere C.A., Bongmba O.N., Njie Y.F., Ohia S.E. Inhibitory action of hydrogen sulfide on muscarinic receptor-induced contraction of isolated porcine irides // *Exp. Eye Res.* – 2008. – **87**, № 6. – P. 612–616.
- Moody B.F., Calvert J.W. Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury // *Med. Gas Res.* – 2011. – **1**, №1. – P. 3.
- Sagach VF, Scrosati M, Fielding J, Rossoni G, Galli C, Visioli F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E // *Pharmacol Res.* – 2002. – **45**, № 6. – P.435–439.
- Simon F., Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P,

- Calzia E. Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury // Shock. – 2008. – **30**, №4. – P.359–364.
20. Xue M., Cui J., Xia W., Li Y., Qian L.B., Ye Z.G., Wang H.P., Xia Q. Effect of S-allyl-L-cysteine on isolate heart subject to ischemia/reperfusion // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. – 2011. – **27**, №1. – P. 13–17.
21. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // Physiol.Rev. – 2012. – **92**. – P.791–896.
22. Yong Q.C., Hu L-F., Wang S., Huang D., Bian J.S. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl // Cardiovasc Res. – 2010. – **88**, №3. – P.482–491.

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

Матеріал надійшов
до редакції 27.06.2013

Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюрuba, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська,
Ю.Л. Ягупольський, В.Ф. Сагач, О.О. Мойбенко

Дослідження біохімічних механізмів кардіопротекторної дії лікарської форми активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда

*У досліджах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) міокарда вивчено зміни біохімічних показників в артеріальній крові при внутрішньошлунковому введенні лікарської форми (таблетки) фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих (K_{ATP}) каналів флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Аналіз отриманих даних дозволив окреслити декілька можливих механізмів кардіопротекторної дії флокаліну. Вони полягають, з одного боку, в активації конститутивного *de novo* біосинтезу NO (зокрема, підвищення у 1,6 раза у кінці реперфузії) та обмеженні (у 3,74 та у 11,48 раза на кінець ішемії та реперфузії відповідно) деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для конститутивної NO-синтази. З другого боку, в пригніченні індукцйбельного *de novo* синтезу NO ферментом індукцйбельною NO-синтазою (зменшується у 2,36 раза на 60 хв ішемії та у 5 разів при реперфузії). Підвищення вмісту нітрит-аніона (у 1,32 раза на 60-й хвилині ішемії та у 1,69 раза на 120-й хвилині реперфузії) може свідчити про потужну антиішемічну дію флокаліну, адже він утворюється спонтанно при окисленні оксиду азоту лише в окисгенованих розчинах. Ще одним кардіопротекторним механізмом слід вважати значне обмеження генерації активних форм кисню та азоту (оксидативного та нітрозативного стресу). До захисної дії відкриття K_{ATP} -каналів можна віднести зменшення утворення патогенних в умовах ішемії міокарда пептидолейкотриєну C_4 (більш ніж у 2 рази протягом ішемії та у 1,4 раза під час другої години реперфузії) та тромбоксану B_2 (більш ніж у 2,3 та 3 рази протягом ішемії та реперфузії відповідно). А також, пригніченні деградації АТФ та стимуляції гемоксигеназної реакції. Зменшення вмісту в артеріальній крові вільної арахідонової кислоти (у 3 та 2 рази протягом ішемії та реперфузії відповідно) може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, можливо в результаті пригнічення активності фосфоліпази A_2 , та вказує на можливу мембраностабілізуючу дію активації K_{ATP} -каналів за ішемії–реперфузії міокарда.*

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

ВСТУП

Відкриття АТФ-залежних калієвих (K_{ATP}) каналів є одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при гіпоксії та ішемії міокарда, особливістю яких є швидка реакція на зниження вмісту АТФ в кардіоміоциті – невминучий наслідок порушення кровообігу серця. З нашої точки зору, порушення енергозабезпечення і скорочувальної функції

міокарда призводить до двох типів кардіопротекторних реакцій, спрямованих на збереження енергетичного потенціалу міокарда і його функції. З одного боку, це відбувається за рахунок зменшення навантаження на пошкоджене, ішемізоване серце, з іншого – витрат АТФ. Серед останніх важливу роль відіграють саме K_{ATP} -канали, які реалізують взаємозв'язок між вмістом останнього, електричною та скорочувальною функцією серця

© Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюрuba, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська, Ю.Л. Ягупольський, В.Ф. Сагач, О.О. Мойбенко

(його роботою). Фармакологічне відкриття цих каналів призводить до дозозалежного зниження скоротливої активності міокарда (збереження високоенергетичних фосфатів), загального та коронарного судинного опору (посилене постачання кисню та енергоресурсів) [6]. Наслідком цього за ішемії–реперфузії є відносно збереження показників скоротливої функції міокарда ішемізованого серця, помірне зниження артеріального тиску, попередження підвищення загально-периферичного опору та констрикторних реакцій у коронарних судинах у період реперфузії [7, 18]. Це наразі один з небагатьох прикладів зв'язку між молекулярними механізмами і ендогенним захистом серця при порушенні його функції. Суть такого захисту полягає в тому, що відкриття цих каналів зміщує мембранний потенціал кардіоміоцитів у бік гіперполяризації та зменшує тривалість потенціалу дії внаслідок прискорення рефрактерного періоду, під час якого кальцій надходить в клітину та, відповідно, його внутрішньоклітинну концентрацію. Останній, є одним із головних вторинних посередників численних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [13, 21]. Це, по-перше, повинно гальмувати метаболічні процеси в клітині і, знову, зменшувати її потреби в кисні та призводити до економії енергетичних матеріалів, що дуже важливо в умовах дефіциту кровопостачання серця, та зменшувати вільнорадикальні процеси. По-друге, зумовлює дилататорні реакції коронарних та інших судин та зменшує постнавантаження на ішемізоване, пошкоджене серце. По-третє, попереджує розвиток перенавантаження кардіоміоцита іонами кальція, що повинно запобігати такому небажаному наслідку, як контрактири міофібрил, що приводять до некротичних пошкоджень міокарда. По-четверте, активація $K_{\text{ATФ}}$ -каналів мітохондріальної мембрани запобігає перенавантаженню мітохондрій Ca^{2+} , інгібує відкриття мітохондріальної транспортної пори, попереджує процеси апоптозу та некрозу [13–15].

Метою нашої роботи було вивчення впливу лікарської форми (таблеток) вітчизняного активатора $K_{\text{ATФ}}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну на зміну біохімічних показників артеріальної крові як на можливий механізм його кардіопротекторної дії при ішемії–реперфузії в експериментах *in vivo*.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 24 безпородних собаках масою від 15 до 24 кг, під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 та 0,7 г/кг, внутрішньовенно). Використано метод ретроградної катетеризації, аутоперфузії та прицільної емболізації гілки лівої коронарної артерії, який дає змогу відтворювати локальну ішемію (1,5 год) та реперфузію (3 год) міокарда без розтину грудної порожнини та зі збереженням спонтанного дихання [7]. Тварини були поділені на дві групи по 12 тварин у кожній – контрольну і дослідну. Тваринам обох груп моделювали регіональну ішемію міокарда та наступну реперфузію. Собакам лише дослідної групи за 60 хв до початку ішемії за допомогою зонда внутрішлунково вводили лікарську форму (таблетки) флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Протягом експерименту здійснювали багаторазовий відбір артеріальної крові, в якій досліджували біохімічні показники, що характеризують можливі механізми дії флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда – окисний метаболізм (пули H_2O_2 , сечової кислоти, дієнових кон'югатів – ДК, ейкозаноїдів – пептидолейкотриєну C_4 – LTC_4 та тромбоксану B_2 – TxB_2 , біосинтез NO різними шляхами – активність індукцибельної iNOS і конститутивної cNOS NO-синтаз, пули стабільних метаболітів NO (нітрит- та нітрат-аніони), неорганічний фосфат та сумарні (інозит, гіпоксантин і ксантин) продукти деградації АТФ і ГТФ, зміни в гемоксигеназній реакції (пули загального білірубину і заліза), неокисний катаболізм L-аргініну (активність аргінази) і вміст вільної арахідонової кислоти (як маркер активності фосфоліпази A2).

Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом пероксиду водню і ДК-продуктів вільнорадикальної ланцюгової реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), [1, 11]. Концентрацію сечової кислоти визначали в колориметричній реакції в аліквотах плазми крові за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст ейкозаноїдів LTC₄ та TxV₂ вимірювали в спиртових екстрактах крові за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham» (Англія). Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman» (Німеччина). Концентрацію арахідонової кислоти вимірювали методом тонкошарової хроматографії. Активність кальційзалежних конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацією класичного методу [16] та сучасної його модифікації [10], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Останній визначали високочутливим колориметричним методом [9]. Вміст нітрит- (NO₂⁻) та нітрат-аніона (NO₃⁻) визначали в безбілкових аліквотах крові в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [12] та бруциновим методом [8]. Базальну аргіназну активність оцінювали за утворенням сечовини [8]. Сумарні продукти деградації АТФ і ГТФ визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання безбілкових аліквот крові при довжині хвилі 254 нм (D₂₅₄) на спектрофотометрі СФ-26 ЛОМО у кварцевих кюветах. Зміни вмісту неорганічного фосфату, що утворюється при послідовній деградації як АТФ, так і ГТФ, фіксували колориметричним методом Островського [3]. Активність деградації гему захисним ферментом гемоксигеназою оцінювали за змінами вмісту загального білірубину і заліза. Білірубін визначали методом Яндрашика з використанням стандартної добірки реактивів (АТ «Реагент», Україна), залізо – фотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми

«Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст загального білка визначали методом Бредфорд з використанням барвника Сumassi G-250 (“Ferrak”, Німеччина).

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії та реперфузії вперше вивчено зміни біохімічних показників в артеріальній крові при активації K_{АТФ}-каналів лікарською формою флокаліну. Аналіз результатів дав змогу окреслити можливі кардіопротекторні механізми, що розвиваються при активації цих каналів. Отже, одним з них є потужний вплив на систему оксиду азоту. Виявлено, що в контрольних експериментах протягом ішемії–реперфузії міокарда значно зростає активність ферменту Ca²⁺-незалежної iNOS, з максимальним збільшенням у 7,46 раза на кінець реперфузії (рис. 1,а). Натомість швидкість сумарного конститутивного Ca²⁺-залежного синтезу оксиду азоту (в основному цитозольним ізоферментом eNOS і ізоферментом nNOS у мітохондріях), навпаки, пригнічена, з максимальним зменшенням у 2,88 раза на кінець ішемії (див. рис. 1,б). Зростає також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, з максимальним збільшенням у 17,49 раза на 120-й хвилині реперфузії (див. рис. 1,в), що, за рахунок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації супероксид-аніона і оксиду азоту всіма ізоферментами NOS і, тим самим, утворення пероксинітриду і реалізації його пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця в цілому.

Водночас передішемічне активування K_{АТФ}-каналів за допомогою флокаліну інгібує

стимульовані ішемією-реперфузією біохімічні реакції в міокарді. Так, активність ферменту iNOS за його дії суттєво не відрізняється від вихідного рівня (умови нормоксії) та істотно зменшується порівняно з ішемією-реперфузією без введення флокаліну, з максимумом у 2,36 раза на 60-й хвилині ішемії та у 5 разів на 3-й годині реперфузії (див. рис. 1,а). Слід зауважити, що через годину після введення, ще до початку ішемії, флокалін знижував активність ферменту iNOS у 1,31 раза. Аналогічні зміни протягом ішемії-реперфузії відбуваються і з активністю аргінази (див. рис. 1,в). В дослідях з флокаліном вона була значно зменшеною порівняно з експеримента-

ми без нього, з найбільшим значенням у 3,74 раза на 90-й хвилині ішемії та у 11,48 раза на кінець реперфузії. Натомість активність ферментів cNOS без активації K_{ATP} -каналів дещо пригнічена, особливо під час ішемії. Проте через годину після введення флокаліну, ще до початку ішемії, вона підвищувалася у 1,28 раза (порівняно з умовами нормоксії) та була такою протягом першої години ішемії. Значно посилювалася активність ферментів cNOS і у кінці реперфузії – у 1,6 раза. Відповідно, вона є збільшеною порівняно з експериментами без флокаліну у 2,72 та 2,93 раза на 10-й та 90-й хвилині ішемії, та у 1,78 раза на 180-й хвилині реперфузії (див. рис. 1,б).

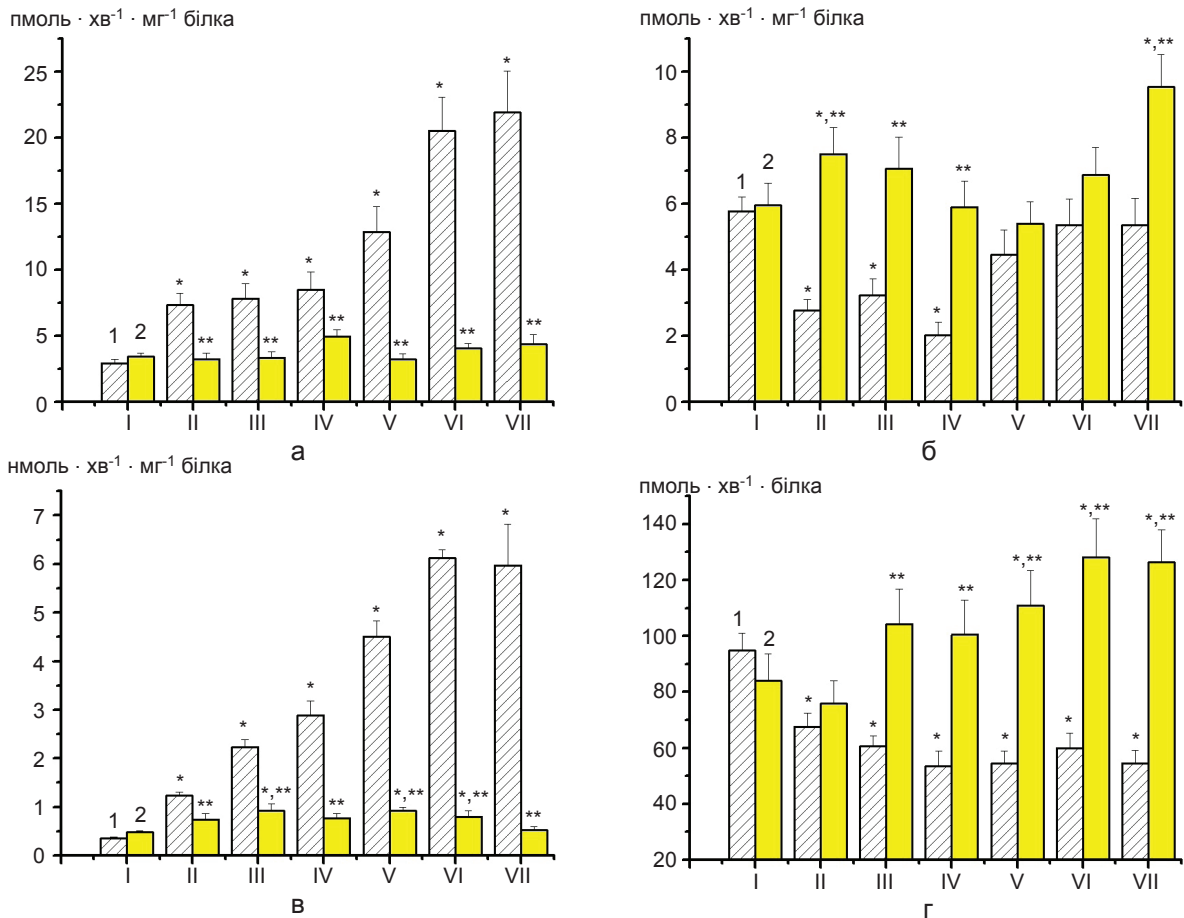


Рис. 1. Дія флокаліну на активність ферментів індукцибельної (а) та конститутивної NO-синтази (б), аргінази (в) та вміст нітрит-аніона (г) в артеріальній крові собак за ішемії-реперфузії міокарда в дослідях *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну: I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія-реперфузія, II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 60, 120 та 180 хв реперфузії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія-реперфузія без флокаліну)

Таким чином, одним із можливих кардіопротекторних механізмів дії флокаліну можна вважати інгібування надлишкового індукцйбельного синтезу оксиду азоту і деградації L-аргініну аргіназою, що забезпечує збереження субстрату для конститутивного синтезу оксиду азоту та, водночас, посилення синтезу останнього. Крім того, як нами було показано раніше, флокалін істотно пригнічує реутилізаційний синтез оксиду азоту (зменшення активності ферменту нітратредуктази) в різних зонах ішемізованого міокарда, який спостерігається винятково в умовах ішемії [4], що також може свідчити про його потужну антиішемічну дію.

Показником останньої може бути і вміст в артеріальній крові NO_2^- , який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в оксигенованих розчинах (рис. 1,г). В контрольних експериментах протягом усієї ішемії–реперфузії міокарда він значно зменшується щодо вихідного рівня з максимальними значеннями у 2,23 раза на 90-й хвилині ішемії та у 2,17 раза на 60-й та 180-й хвилині реперфузії. Водночас активація $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів флокаліном призводила до підвищення вмісту NO_2^- в артеріальній крові у 1,34 раза (через годину після введення). З початком ішемії він продовжував триматися збільшеним, зокрема у 1,32 та 1,26 раза на 60-й та 90-й хвилині ішемії відповідно, порівняно з контрольними цифрами. З початком реперфузії він продовжував зростати та сягав максимальних значень на 3-тю годину реперфузії – у 1,69 та 1,66 раза на 120- та 180-й хвилині відповідно (див. рис. 1,г).

Ще одним проявом кардіопротекції за активації $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів флокаліном можна вважати значне зниження вільнорадикальних процесів та попередження зниження активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [17]. Про обмеження як оксидативного (генерація активних форм кисню – АФК), так і нітрозативного (утворення пероксинітриду) стресу за дії флокаліну можуть свідчити зміни вміс-

ту стабільної активної форми кисню (H_2O_2) і продуктів неферментативного дієнові кон'югати (ДК) та ферментативного [пептидолейкотриєни C_4 і тромбокساني B_2 (LTC_4 і TxB_2)] окиснення ліпідів (див. рис. 2, 3). Пероксид водню утворюється, в основному, ферментативно із супероксид-аніона ($\cdot\text{O}_2^-$) за дії супероксиддисмутази (СОД) і є маркером на окисний стрес, який розвивається за ішемії–реперфузії. Зокрема, в контрольних експериментах вміст H_2O_2 під час ішемії та реперфузії значно збільшується з максимальними значеннями у 11,76 та 7,59 раза протягом ішемії та реперфузії відповідно (див. рис. 2,а), вказуючи на значне зростання генерації супероксид-аніона. Водночас введення флокаліну достовірно зменшувало пули пероксиду водню, а, отже, і генерацію супероксиданіону. Зокрема, порівняно з результатами за ішемії–реперфузії на 10-й і 60-й хвилині ішемії пули були зменшеними відповідно у 4 та 3,47 раза. Протягом реперфузії вони були зниженими у 2 рази зі ще більшим зменшенням у 2,5 раза на 180-й хвилині.

Підтвердженням антиоксидантної дії активації $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів може бути зменшений порівняно з контрольними експериментами (ішемія–реперфузія) вміст продуктів ПОЛ ДК (див. рис. 2,б). В експериментах без флокаліну вміст ДК в артеріальній крові порівняно з вихідним рівнем практично протягом всієї ішемії–реперфузії був збільшений у 5,5 раза, з максимальним підвищенням у першу годину реперфузії у 7,4 раза (див. рис. 2,б). Активація цих каналів попереджувала утворення ДК – протягом ішемії у 1,3 та реперфузії у 1,8 раза, з подальшим зниженням у кінці реперфузії – у 2,4 раза. ДК утворюються при неферментативному окисненні ліпідів, а зниження їх вмісту свідчить про потужну антиоксидантну дію флокаліну та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ: *ОН-радикала (при перетворенні H_2O_2 в реакціях Фентона і Хабер-Вайса за наявності заліза) та $\cdot\text{OH}$ і $\cdot\text{NO}_2$ -радикалів, що утворюються при розпаді пероксинітриду. Відкриття $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів

чинить виражену антиоксидантну дію інгібуючи ПОЛ через зменшення пулів супероксид-аніона (O_2^-) пригнічуючи активність таких його генераторів, як ксантиноксидаза (про що свідчить зниження вмісту сечової кислоти, див. рис. 2,в), ліпоксигеназа (зниження вмісту LTC_4 , див. рис. 3,б) та циклооксигеназа (зниження вмісту TxB_2 , див. рис. 3,в). Сечова кислота утворюється в ксантиноксидазній реакції, коли одночасно з нею генерується супероксид-аніон і, таким чином, вона є тестом на активність цього процесу. Вміст сечової кислоти в артеріальній крові

протягом ішемії–реперфузії постійно зростає, з піком на 2-гу годину реперфузії – у 9,6 та 8 разів на 90-й та 120-й хвилині відповідно від вихідного рівня. Активування калієвих каналів значно зменшувало її утворення (див. рис. 2,в). Це є дуже важливим з огляду на те, що за ішемії–реперфузії одночасно активується не лише генерація супероксид-аніона, але і інтенсивний синтез NO ізоферментом iNOS (див. рис. 1,а), що є передумовою для утворення пероксинітриду ($\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$). Підтвердженням зменшення продукції останнього при активації K_{ATP} -каналів за ішемії–

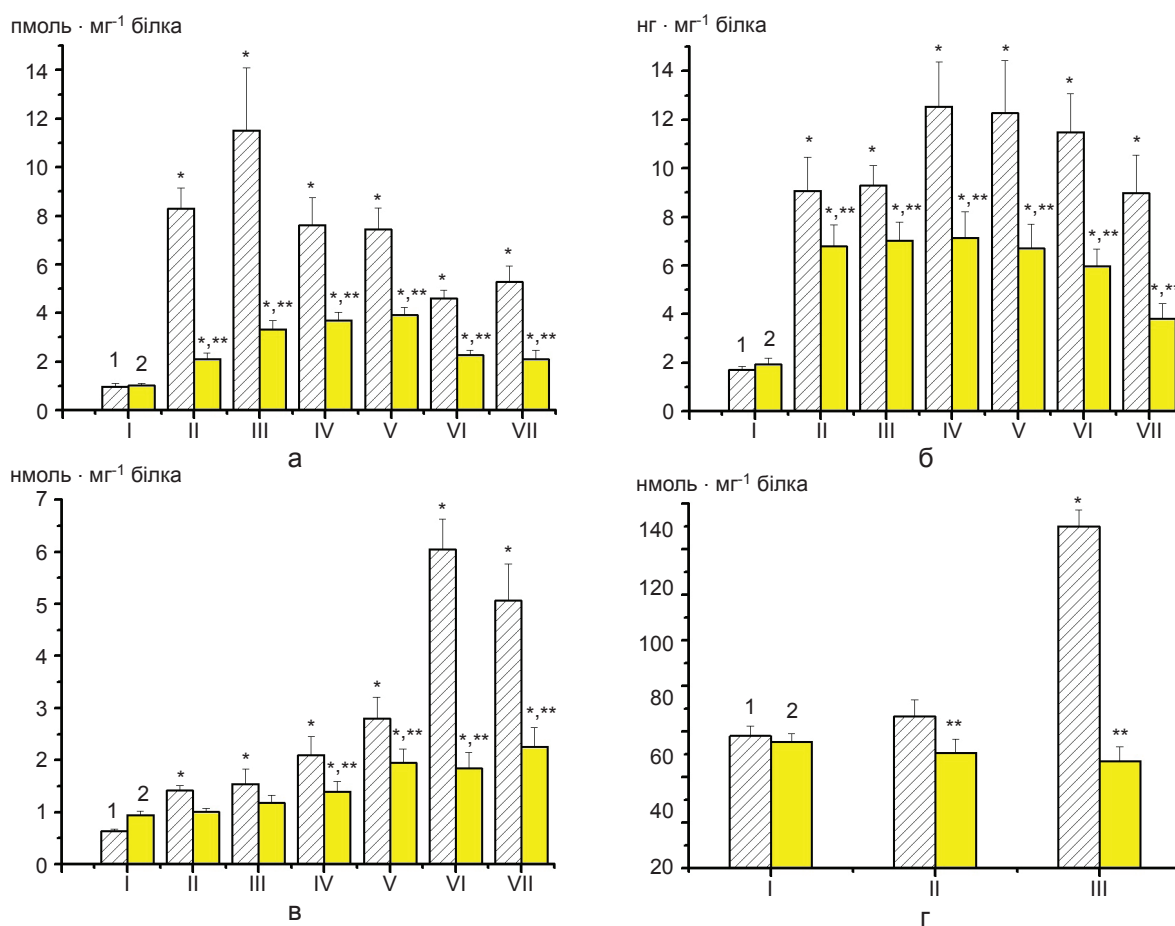


Рис. 2. Вплив флокаліну на вміст пероксиду водню (а), дієнових кон'югатів (ДК; б), сечової кислоти (в) та продукту деградації пероксинітриту – нітрат-аніона (г) в артеріальній крові собак за ішемії–реперфузії міокарда в досліді in vivo: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія–реперфузія, для пероксиду водню – II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 10, 120 та 180 хв реперфузії; для ДК та сечової кислоти II та III – 60 та 90 хв ішемії; IV–VII – реперфузія (для ДК – 10, 60, 90 та 180 хв, для сечової кислоти – 10, 60, 90 та 120 хв); для нітрат-аніона – II та III – 120 та 180 хв реперфузії. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, **P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

реперфузії може бути деяке зниження вмісту нітрат-аніона. Пули останнього утворюються ферментативно за дії гемвісних ферментів (міоглобіном у кардіоміоцитах, гемоглобіном в еритроцитах), або неферментативно при розпаді пероксинітриду, який утворюється із NO і O_2^- в умовах окисного стресу, що виникає за ішемії-реперфузії. В контрольних експериментах ми спостерігали значне підвищення у 2,6 раза вмісту нітрат-аніона в плазмі крові в останню годину реперфузії. Водночас введення флокаліну зменшувало їх вміст у 3,2 раза. Наномольні пули нітрат-аніона є найбільш вираженим показником інгібування надлишкового синтезу оксиду азоту нітратредуктазним шляхом при ферментативному відновленні нітрат-аніона NADH- і NADPH-залежними нітратредуктазами, активність яких значно підвищується за ішемії. Крім

того, в низьких концентраціях сечова кислота є водорозчинним антиоксидантом за рахунок зв'язування пероксинітриду і $OH\cdot$ та інгібування ксантиноксидазної реакції за механізмом зворотного зв'язку. У високих концентраціях вона є токсичною і тому зниження її вмісту за активування калієвих каналів є одним із механізмів їх кардіопротекторної дії.

За ішемії-реперфузії значно зростає вміст $LT C_4$, з найвищими значеннями при ішемії у 5,6 та 6,4 раза на 60-й та 90-й хвилині, та у 3,6 та 3,7 раза на 10-й та 90-й хвилині реперфузії відповідно. Аналогічно збільшується і вміст $T x B_2$ – з максимумом у 3 та 3,5 раза на 60-й та 90-й хвилині ішемії, та у 3,1 та 4,7 раза у той самий час реперфузії відповідно (див. рис. 3,б,в). Це може свідчити про збільшення активності ферментів ліпоксигенази, циклооксигенази та, відповідно, утворення супе-

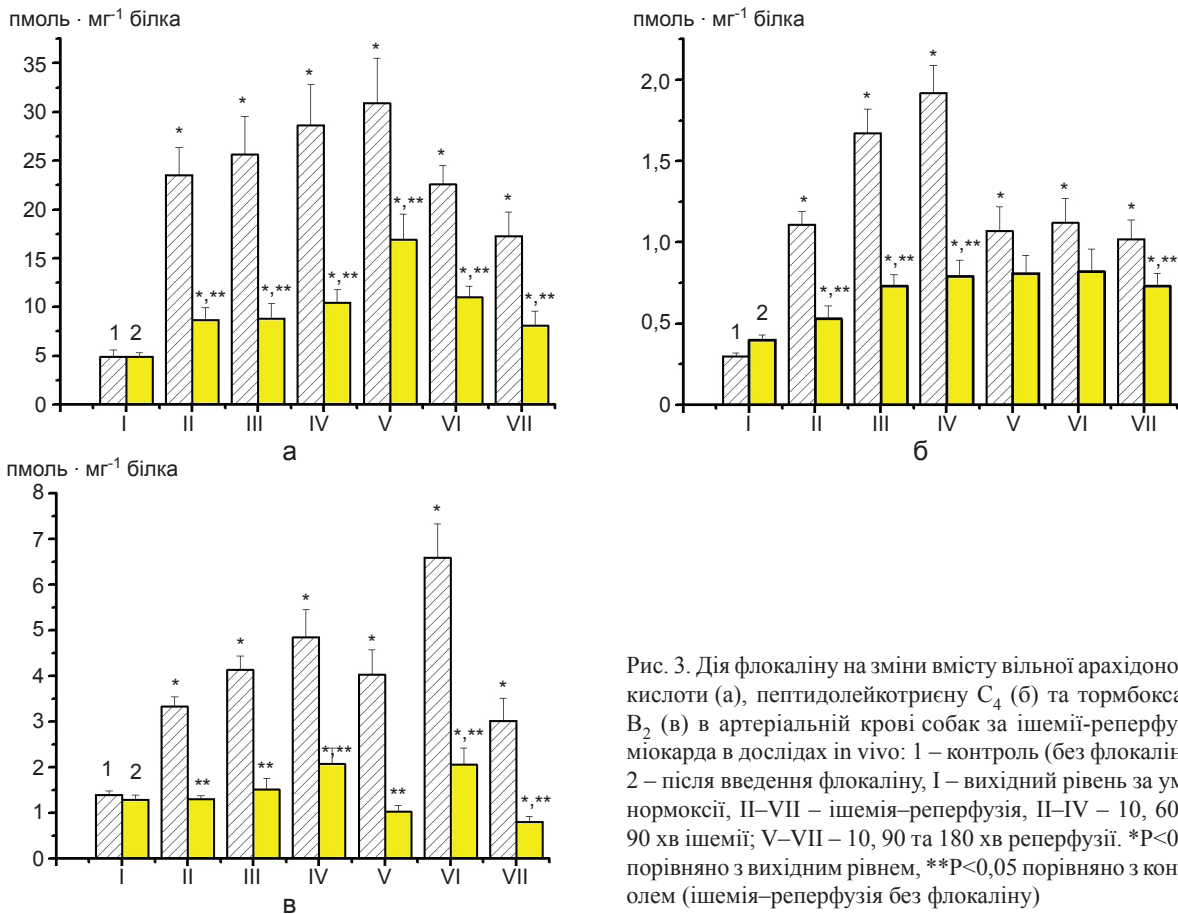


Рис. 3. Дія флокаліну на зміни вмісту вільної арахідонової кислоти (а), пептидолейкотриєну C_4 (б) та тромбоксану B_2 (в) в артеріальній крові собак за ішемії-реперфузії міокарда в досліді *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія-реперфузія, II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 10, 90 та 180 хв реперфузії. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія-реперфузія без флокаліну)

роксид-аніона. Передішемічне активування K_{ATP} -каналів флокаліном значно зменшувало утворення як $LTС_4$, так і TxB_2 . Зокрема, вміст $LTС_4$ протягом ішемії був зменшеним більш ніж удвічі з максимумом у 2,4 раза на 90-й хвилині. Найбільше зниження його вмісту в крові під час реперфузії – у 1,4 раза відбувалося протягом 2-ї години (див. рис. 3,б). Подібним чином під час ішемії змінювався і вміст TxB_2 – зменшення більш ніж у 2,3 раза, з максимальним значенням на 60-й хвилині у 2,7 раза. Протягом реперфузії цей показник був зменшеним більш ніж у 3 рази з найбільшими значеннями у 3,9 та 3,7 раза на 10-й та 180-й хвилині відповідно (див. рис. 3,в). Це може говорити про зниження активності вищезгаданих ферментів при активації K_{ATP} -каналів за ішемії–реперфузії міокарда та, як наслідок, зменшення утворення супероксид-аніона. Добре відомо про патогенну роль в умовах ішемії міокарда цих ейкозаноїдів. Вони мають коронарострикторну та аритмогенну дію, крім того, лейкотриєни є одним з найбільш потужних хемоатрактантів для нейтрофілів [19]. Тобто при гальмуванні продукції $LTС_4$ та TxB_2 слід чекати усунення констрикторних реакцій судин серця, що ми спостерігали раніше [4, 18], протидію порушенням ритму [2, 18] та прооксидантним явищам, пов'язаним з акумуляцією нейтрофілів вогнищі інфаркту [4, 17]. Повністю підтверджує це передбачення отримане нами зменшення вмісту пероксиду водню, ДК та малонового діальдегіду в різних зонах ішемізованого серця в експериментах *in vivo* [4, 17].

Зменшення утворення окиснених метаболітів арахідонової кислоти, можливо, відбувається не тільки за рахунок пригнічення ліпоксигеназного та циклооксигеназного шляхів її метаболізму, а і внаслідок зменшення вмісту в артеріальній крові самої вільної кислоти. Під час ішемії–реперфузії спостерігали, як завжди, значне збільшення пулів вільної арахідонової кислоти з максимальними значеннями на 90-й хвилині ішемії та 10-й хвилині реперфузії – у 5,9 та 6,4 раза

відповідно (див. рис. 3,а). При цьому лікарська форма флокаліну через активування K_{ATP} -каналів запобігала підвищенню вмісту вільної арахідонової кислоти: протягом ішемії він був зменшений порівняно з контрольними значеннями майже у 3 рази, під час реперфузії вдвічі. Зниження вмісту вільної арахідонової кислоти може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, а оскільки наслідком відкриття K_{ATP} -каналів є зменшення входу кальцію в клітину то вірогідним є пригнічення за дії флокаліну активності Ca^{2+} -залежних ферментів, зокрема і Ca^{2+} -залежної фосфоліпази A_2 . Властивість інгібувати високопорогові кальцієві канали була недавно описана нами для флокаліну [20]. Ці дані можуть свідчити про його мембраностабілізуючу дію та добре співвідносяться з електронноморфологічними даними про корекцію порушень проникності мембран кардіоміоцитів та збереження структури внутрішньоклітинних органел, що були отримані нами при ішемії–реперфузії ізольованого серця морської свинки [5].

За ішемії–реперфузії зростає деградація гему, яка здійснюється захисним стрес-ферментом гемоксигеназою (гем \rightarrow білірубін + $CO + Fe$), про що може свідчити підвищення вмісту в артеріальній крові продуктів його розпаду – білірубіну та заліза (рис. 4). Зокрема на кінець періоду ішемії їх вміст зростав у 1,4 та 1,6 раза відповідно. На 3-ю годину реперфузії у 16 (180 хв) та 2,1 (120 хв) раза відповідно. Водночас флокалін посилював цей процес (див. рис. 4). За активації K_{ATP} -каналів ці показники під час ішемії були вищими вже у 1,7 та 3 рази, при реперфузії у 25 та у тричі відповідно. Це збільшення продуктів деградації гему (особливо вільного гемоглобіну, що виходить із еритроцитів при гемолізі) може носити захисний характер, оскільки відомо про нейро- і кардіопротекторну дію білірубіну і оксиду вуглецю, що утворюються при його деградації.

При ішемії–реперфузії міокарда також значно зростає вміст сумарних продуктів

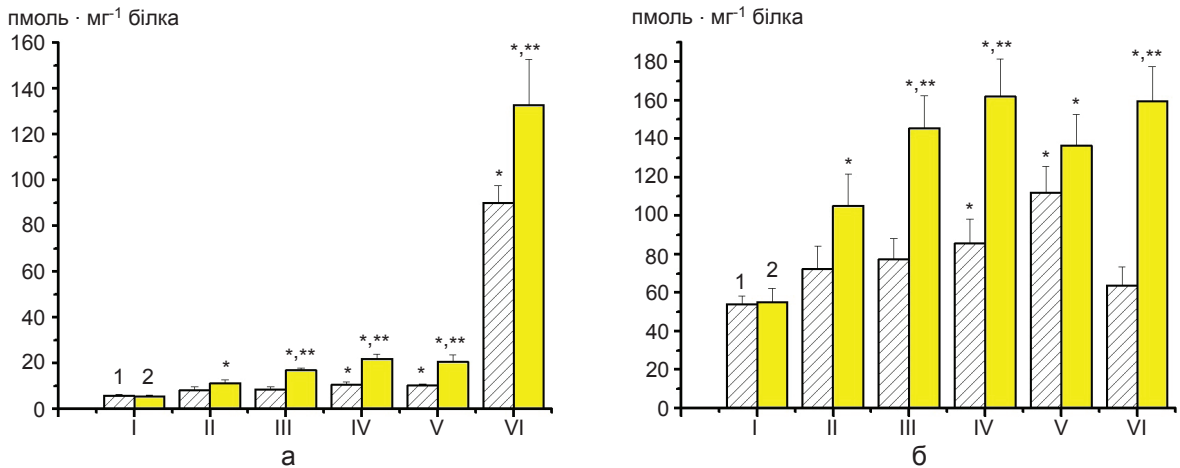


Рис. 4. Вплив флокаліну на вміст продуктів деградації гемі білірубину (а) та заліза (б) в артеріальній крові собак при ішемії–реперфузії міокарда *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, для білірубину – II–VI – 10, 60, 90, 120 та 180 хв реперфузії; для заліза II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VI – 120 та 180 хв реперфузії. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, **P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

деградації пуринових нуклеотидів (АТФ і ГТФ) – неорганічного фосфату та суми ксантину, гіпоксантину і інозину. Максимальне збільшення ΔD (довжина хвилі 254 нм) ми зафіксували в артеріальній крові контрольних тварин на 90-й хвилині ішемії та реперфузії (у 4,6 та 14 разів відповідно). Водночас флокалін значно пригнічує це зростання, порівняно з контролем воно є зменшеним у 2,8 раза на

90-й хвилині ішемії, та у 5,7 та 6,2 раза на 120-й та 180-й хвилині реперфузії відповідно (рис. 5,а). Аналогічні зміни відбувалися і з пулами фосфату, максимальне зростання яких ми зафіксували на 90-й хвилині ішемії (у 6,4 раза) та реперфузії (у 11,6 раза). Активація калієвих каналів флокаліном зменшувала зростання пулів фосфату з максимальним значенням у 5 разів на 90-й хвилині ішемії,

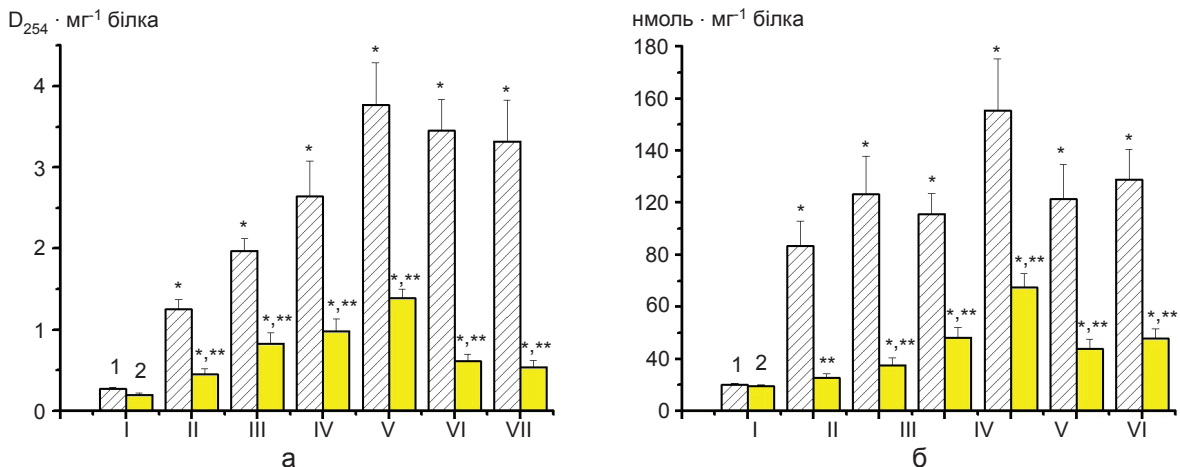


Рис. 5. Вміст сумарних продуктів деградації пуринових нуклеотидів (АТФ+ГТФ) інозину, гіпоксантину і ксантину (а), і неорганічного фосфату (б) в артеріальній крові собак за ішемії–реперфузії міокарда в досліді *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія–реперфузія, II – 90 хв ішемії; III–VII – 10, 60, 90, 120 та 180 хв реперфузії. *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, **P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

та у 4,7 раза на 10-й хвилині реперфузії (див. рис. 5,б). З одного боку, зниження вмісту АТФ погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, залежно від ступеня його зниження в мітохондріях, апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарда. Попередження значного підвищення утворення неорганічного фосфату при відкритті калієвих каналів за ішемії–реперфузії свідчить, по-перше, про запобігання повної деградації пуринових нуклеотидів флокаліном, що покращує умови для їх ресинтезу та є причиною зменшення продукції супероксид-аніона, при деградації гіпоксантину і ксантину ферментом ксантиноксидазою, по-друге – про можливе обмеження процесу апоптозу кардіоміоцитів за дії флокаліну, що може бути ще одним важливим механізмом його кардіопротекторної дії.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що одним із основних кардіопротекторних механізмів дії лікарської форми активатора K_{ATP} -каналів флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда собак в дослідах *in vivo* є попередження значного зростання надлишкового токсичного (за рахунок утворення пероксинітриту) індуцибельного (за дії ферменту iNOS) та, навпаки, підвищення протективного конститутивного (за дії ферменту cNOS) *de novo* синтезу оксиду азоту та пригнічення деградації L-аргініну аргіназою.

2. Ще одним захисним механізмом флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда може бути значне обмеження генерації активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу).

3. Показником кардіопротекції є зменшення вмісту в артеріальній крові вільної арахідонової кислоти (може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран фосфоліпазою A_2 , що вказує на мембраностабілізуючу дію флокаліну) та її патогенних в умовах ішемії міокарда похідних – LTG_4 та TxB_2 .

4. Проявами кардіопротекторної дії також

можна вважати пригнічення деградації АТФ та стимуляцію гемоксигеназної реакції.

Р.Б. Струтинский, А.В. Коцюруба, Р.А. Ровенец, Н.А. Струтинская, Ю.Л. Ягупольский, В.Ф. Сагач, А.А. Мойбенко

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АКТИВАТОРА K_{ATP} -КАНАЛОВ ФЛОКАЛИНА ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА

В опытах на анестезированных собаках с воспроизведением экспериментальной ишемии (90 мин) и реперфузии (180 мин) миокарда исследованы изменения биохимических показателей в артериальной крови при внутривенном введении лекарственной формы (таблетки) фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых (K_{ATP}) каналов флокалина в дозе 2,2 мг/кг. Анализ полученных результатов позволил очертить несколько возможных механизмов кардиопротекторного действия флокалина. Они заключаются, с одной стороны, в активации конститутивного *de novo* биосинтеза оксида азота (в частности, повышение в 1,6 раза в конце реперфузии) и ограничения (в 3,74 та в 11,48 раза в конце ишемии и реперфузии соответственно) деградации L-аргинина аргиназой, что сохраняет субстрат для фермента конститутивной NO-синтазы. С другой стороны, в угнетении индуцибельного *de novo* синтеза оксида азота ферментом индуцибельной NO-синтазой (уменьшение в 2,36 раза на 60-й минуте ишемии и в 5 раз при реперфузии). Повышение содержания нитрит-аниона (в 1,32 раза на 60-й минуте ишемии и в 1,69 раза на 120-й минуте реперфузии) может свидетельствовать о сильном антиишемическом действии активации этих каналов, ведь он образуется спонтанно при окислении оксида азота только в оксигенированных растворах. Еще одним кардиопротекторным механизмом можно считать ограничение генерации активных форм кислорода и азота (оксидативного и нитрозативного стресса). К защитному действию активации K_{ATP} -каналов можно причислить уменьшение продукции патогенных в условиях ишемии миокарда пептидолейкотриена C_4 (более чем в 2 раза при ишемии и в 1,4 раза во время второго часа реперфузии) и тромбоксана B_2 (более чем в 2,3 и 3 раза во время ишемии и реперфузии соответственно), а также угнетение деградации АТФ и стимуляция гемоксигеназной реакции. Уменьшение содержания в артериальной крови свободой арахидонової кислоти (в 3 и 2 раза во время ишемии и реперфузии соответственно) может свидетельствовать о торможении деградации фосфолипидов клеточных мембран в результате угнетения активности фосфолипазы A_2 , и указывает на возможное мембраностабилизирующее действие активации K_{ATP} -каналов при ишемии-реперфузии миокарда.

Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, флокалин, ишемия-репер-

фузия, оксидативный стресс, нитрозативный стресс, перекисное окисление липидов, de novo синтез NO, аргиназа.

R.B. Strutynskiy, A.V. Kotsuruba, R.A. Rovenets, N.A. Strutynska, Yu.L. Yagupolskii, V.F. Sahach, A.A. Moibenko.

BIOCHEMICAL MECHANISMS OF K_{ATP} CHANNELS OPENER FLOCALIN (MEDICAL FORM) CARDIOPROTECTIVE ACTION AT ISCHEMIA-REPERFUSION OF MYOCARDIUM

In experiments on the anaesthetized dogs with modeling of experimental ischemia (90min) and reperfusion (180 min) of myocardium it was investigated changes of biochemical processes in arterial blood at intragastric introduction of medicinal form (tablets) of flocalin (the fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels) in a dose 2,2 mg/kg. The data analysis allowed to define a few possible mechanisms of cardioprotective action of flocalin, which prevented the opening of a mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and inhibition of apoptosis induced by it. They consist, from one side, in activating of the constitutive de novo biosynthesis of nitric oxide by cNOS, from other side, in suppression of inducible nitric oxide de novo synthesis by iNOS in such way to prevent the formation of toxic peroxynitrite by co-operation of surplus nitric oxide with superoxide anion, thereby limits the generation of toxic active forms of nitrogen ($*NO_2$) and oxygen ($*OH$). The first effect of flocalin takes place due to limitation the degradation of L-arginine by arginase which keeps substrat for cNOS, second – due to the inhibition of superoxide generation, in particular, by xanthine oxidase (marker uric acid), lipoxigenase (marker LTC_4) and cyclooxygenase (marker TxB_2). Because LTC_4 have coronarconstrictory, arrhythmogenic and chemoattractory properties in the conditions of myocardial ischemia, inhibition of its production both with superoxide generation (markers H_2O_2 and diene conjugates) may be the another mechanisms of flocalin's cardioprotection. Powerful antiischemic action of flocalin (marker nitrite anion) as the mechanisms of cardioprotection is possible as well as inhibition of ATP and GTP degradation (marker hypoxanthine+xanthine+inosine levels in the blood) and, possibly, stimulation of haem degradation by haem oxygenase (markers total bilirubin and Fe in the blood). Diminishing content of free arachidonic acid in arterial blood can testify inhibition of cellular membranes phospholipides degradation by phospholipase A_2 as a result of flocalin cardioprotection. Key words: K_{ATP} -channels, flocalin, ischemia-reperfusion, oxidative stress, nitrozative stress, lipid peroxidation, de novo synthesis of NO, arginase.

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

Institute of Organic Chemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С. 60–64.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату - фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, №4. – С. 77–82.
3. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1969. – 437 с.
4. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нещерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №1. – С. 13–26.
5. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих КАТФ каналів // Там само. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
6. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Струтинська Н.А., Нещерет О.П., Мойбенко О.О. Вплив активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліном на функцію серцево-судинної системи // Там само. – 2013. – 59, №1. – С. 11–16.
7. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Бойчук Т.М., Джуран Б.В., Мойбенко О.О. Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії-реперфузії міокарда // Там само. – 2011. – 57, №1. – С. 55–65.
8. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № 8. – С.1199–1202.
9. Boyde T.R., Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime // Anal. Biochem. – 1980. – 107, № 2. – P. 424–431.
10. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 5. – P. 797–804.
11. Conte D., Narindrasorasa K. S., Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // Eur. J. Biochem. – 1996. – 271, №9. – P. 5125–5130.
12. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite and [$+5N$] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126, № 1. – P.131–138.
13. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning // Circ. Res. – 1999. – 84, №9. – P. 973–979.
14. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial

- permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **61**. – P. 372–385.
15. Hanley P.J., Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – **1**. – P.17–50.
16. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
17. Strutynskiy R.B., Kotsuruba A.V., Neshcheret A.P., Shysh A.N., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective Effects of ATP-Sensitive Potassium Channels Activation in Experiments in Vivo: Influence on Biochemical Parameters of Blood Following Ischemia-Reperfusion of Myocardium // *Int. J. Phys. Pathophys.* – 2010. – **1**, №4. – P. 305–313.
18. Strutynskiy R.B., Neshcheret A.P., Tumanovska L.V., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective effects of flocalin in in vivo experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion // *Ibid.* – 2010. – **1**, №3. – С. 211–218.
19. Takase B, Maruyama T, Kurita A, Uehata A, Nishioka T, Mizuno K, Nakamura H, Katsura K, Kanda Y Arachidonic acid metabolites in acute myocardial infarction // *Angiology.* – 1996. – **47**, №7. – P.649–661.
20. Voitychuk O.I., Strutynskiy R.B., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels // *NSAP.* – 2012. – **385**. – №11. – P. 1095–1102.
21. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1998. – **274**. – P. 25–37.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 03.06.2013*

О.В. Лунько, О.А. Федоренко, С.М. Марченко

Вплив Ca^{2+} на властивості катіонних каналів великої провідності ядерної оболонки нейронів мозочка

У мембранах ядерної оболонки, які містять інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (IP_3Rs), були знайдені також численні катіонні канали великої провідності (LCCC). IP_3Rs та LCCC, імовірно, функціонально пов'язані: катіонні канали забезпечують протитечію K^+ , яка запобігає формуванню негативного потенціалу в люмені ядерної оболонки, що в свою чергу може збільшувати тривалість вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs . LCCC раніше не були описані та їх молекулярна природа досі невідома. Ми досліджували вплив Ca^{2+} на властивості цих каналів. Встановлено, що повна відсутність вільних іонів кальцію у люмені ядерної оболонки або їх висока концентрація не змінює основні біофізичні характеристики катіонних каналів великої провідності. Таким чином, ступінь наповнення кальцієвого депо не впливає на активність LCCC.

Ключові слова: ядерна оболонка, іонні канали, кальцієве депо.

ВСТУП

Генетичний апарат еукаріотної клітини оточений ядерною оболонкою, в мембранах якої знаходяться іонні канали з різними біофізичними властивостями [4, 6, 10, 11]. Особливу увагу привертають канали, які відповідають за вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки всередину ядра. Ми помітили, що в усіх мембранах, де містяться інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (IP_3Rs), також знаходяться у великій кількості іонні канали з великою провідністю, селективні до моновалентних та непроникні для бівалентних катіонів – так звані катіонні канали великої провідності (LCCC від англ. large conductance cation channels) [1–5].

Властивості іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани є мало вивченими, і були нами описані тільки в загальних рисах [1–3, 5]. Наші попередні дослідження показали, що LCCC нечутливі до відомих блокаторів калієвих каналів [2, 3, 9], зокрема до тетраетиламонію (10 ммоль/л) та 4-амінопіридину (2 ммоль/л). La^{3+} (10–100 мкмоль/л), АТФ (0,5–5 ммоль/л), Ca^{2+} (0,05–50 мкмоль/л) та Mg^{2+} (1–5 ммоль/л) також не справляли ніякого ефекту на ці канали. Отже, за своїми власти-

востями LCCC не можуть бути віднесені до жодного відомого типу іонних каналів. Крім того, без селективного блокатора вони не можуть бути виділені та клоновані. Проте, дослідження каналів такого типу викликає великий інтерес, оскільки LCCC можуть впливати на тривалість вивільнення Ca^{2+} з кальцієвого депо, що має велике значення для функціонування клітини [2].

Було зроблено припущення, що іонні канали, які знаходяться на мембранах ядерної оболонки, можуть відноситися до кальцій-залежних калієвих каналів (ВК-каналів від вгл. big potassium channel) [13]. З літератури відомо, що ВК-канали мають високу чутливість до Ca^{2+} [8]. Крім того, при спустошенні кальцієвого депо властивості їх можуть змінюватися. Тому метою нашої роботи було з'ясувати можливий вплив Ca^{2+} на активність LCCC мембран ядерної оболонки нейронів.

МЕТОДИКА

Отримання ізольованих ядер нейронів Пуркінє мозочка

Всі експериментальні процедури проводилися відповідно до біоетичних норм законодавства

України. Для дослідів брали щурів лінії Вістар або Фішер віком 2–3 тиж. Після декапітації тварин виділяли їх мозочок, який клали у посуд з охолодженим (1–4°C) розчином, що містив (ммоль/л): глюконат-К – 150, НЕРЕС-КОН – 5, рН–7,3. Мозочок нарізали на зрізи товщиною до 300 мкм. Після цього зразки тканини гомогенізували пропускаючи через металеву голку діаметром 0,64 мм та інкубували в 1%-му розчині цитрату натрію[7].

Отриманий гомогенат із залишками зруйнованих клітин розміщували в робочій камері інвертованого мікроскопа. Через деякий час неушкоджені ядра осідали та щільно прилягали до дна цієї камери. В результаті описаних дій, ядра нейронів ставали придатними для patch-clamp-реєстрації (методу локальної фіксації потенціалу на ізольованому фрагменті ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щура).

Електрофізіологічні дослідження

Запис поодиноких іонних каналів проводили з використанням методу patch-clamp в конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” в режимі фіксації потенціалу. Досліди проходили при 18–20 °С. Patch-піпетки були виготовлені з боросілікатного скла, їх опір варіював від 5 до 12 МОм. Піпетки та робоча камера заповнювалися розчином, що містив (ммоль/л): КСІ – 150, НЕРЕС-КОН – 5; рН – 7,3. Індиферентний електрод Ag–AgCl був сполучений з робочою камерою через агаровий місток.

Значення біофізичних показників трансмембранних струмів отримували за допомогою підсилювача Visual Patch VP-500. Сигнали з підсилювача фільтрували низькочастотним фільтром Бесселя (2 кГц), оцифровували з частотою 10 кГц.

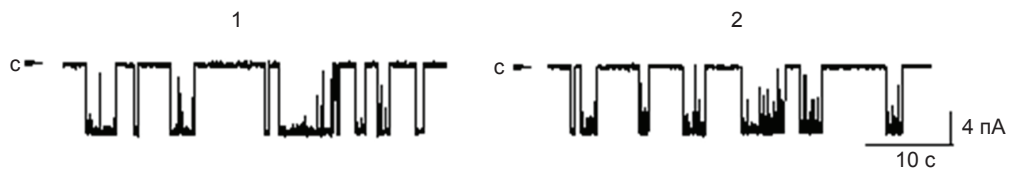


Рис. 1. Експериментальна реєстрація активності катіонного каналу великої провідності, який знаходиться у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка щура у розчині з 1 ммоль/л вільного Ca^{2+} (1) та в безкальцієвому розчині (2). Запис проводився при потенціалі -40 мВ

Статистичний аналіз

Отримані результати були оброблені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США). Ймовірність відкритого стану каналу (P_o) вираховували за вищезазначеною програмою автоматично (через функцію “single-channel search – event analysis”), беручи до уваги кількість каналів, що знаходилась на ділянці мембрани в межах діаметру кінчика скляного мікроелектрода. Проміжки часу від початку відкриття до закриття каналу тривалістю менш ніж 0,5 мс не брали до уваги. Для графічного зображення результатів використовували програму OriginPro 8 SR0 (“OriginLab Corporation”, США). Результати на графіках представлені як середнє значення \pm похибка середнього. Достовірність різниці між точками при одному потенціалі на графіку вольт-амперної характеристики оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента; статистично вірогідними вважали відмінності при $P < 0,05$, тобто в тих випадках, коли ймовірність різниці становила понад 95 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження активності LCCC за умов відсутності Ca^{2+} додавали до розчину в patch-піпетці та робочій камері 1 ммоль/л EDTA. При високій концентрації Ca^{2+} готували розчин з концентрацією вільного кальцію 1 ммоль/л. В обох розчинах характер роботи каналів був ідентичний: вони мали досить повільну кінетику, тривалість їх відкритого стану сягала декількох секунд (рис. 1).

Виявили, що у безкальцієвому розчині провідність становить 161 ± 7 пСм ($n=7$), а у

розчині з 1 ммоль/л Ca^{2+} – 130 ± 10 пСм ($n=6$; рис. 2). Отже, за умов відсутності вільного Ca^{2+} у розчині провідність LCCC є дещо вищою, проте цю різницю не можна вважати достовірною ($P > 0,01$).

У наших попередніх дослідженнях ми помітили, що активність LCCC має чітко виражену потенціалзалежність: при позитивних значеннях потенціалу ймовірність відкритого стану каналу (P_o) є значно вищою, ніж при негативних [1, 2]. Крім того, при великих позитивних значеннях потенціалу канал був майже весь час відкритий, а при потенціалі нижче за -60 мВ він повністю блокувався, хоча таке блокування було зворотним [2].

Для того щоб дізнатися чи впливає Ca^{2+} на потенціалзалежність LCCC, ми дослідили їхню P_o у безкальцієвому розчині та з концентрацією вільного кальцію 1 ммоль/л. Наші дослідження показали, що наявність іонів кальцію не має значного впливу на характер потенціалзалежності P_o каналів цього типу (рис. 3). В обох розчинах значення P_o достовірно не відрізнялися ($P > 0,01$ для всіх значень потенціалу).

Отже, отримані нами результати вказують на те, що наявність іонів кальцію у розчині не впливає на основні біофізичні властивості

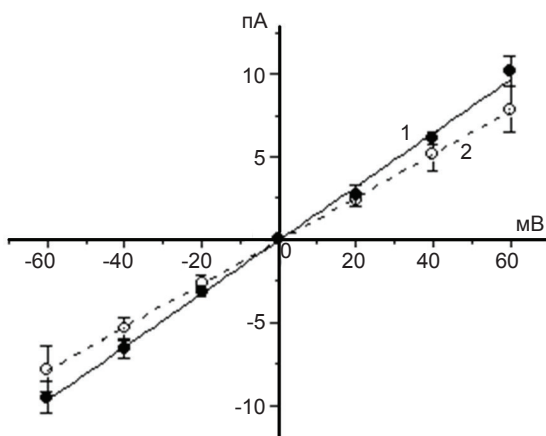


Рис. 2. Вольт-амперна характеристика катіонного каналу великої провідності в розчині з 1 ммоль/л вільного Ca^{2+} (1) та в безкальцієвому розчині (2)

LCCC, які знаходяться у внутрішній мембрані ядерної оболонки. Ми вважаємо, що отриманий нами результат може свідчити про те, що в цих каналах відсутні сайти зв'язування для кальцію, хоча це твердження потребує перевірки із залученням молекулярно-біологічних методів.

Крім того, ми спростовуємо припущення, що іонні канали, які знаходяться у мембранах ядерної оболонки відносяться до ВК-каналів [13], оскільки LCCC не мають високої чутливості до Ca^{2+} . Таким чином, питання про належність цих каналів до якогось відомого типу калієвих каналів залишається на цей час відкритим.

Іонні канали з подібними властивостями були описані в мембранах саркоплазматичного ретикулуму [12], проте віднести їх до будь-якого відомого типу катіонних каналів також виявилось неможливим. Ми припускаємо, що описані нами LCCC в мембранах ядерної оболонки ідентичні іонним каналам сарко-/ендоплазматичного ретикулуму та потрібні для функціонування перинуклеарного простору як кальцієвого депо [2]. Вивільнення Ca^{2+} із депо пов'язано з перенесенням досить великого електричного заряду крізь відповідні мембрани. Якщо перинуклеарний простір виконує функцію кальцієвого депо,

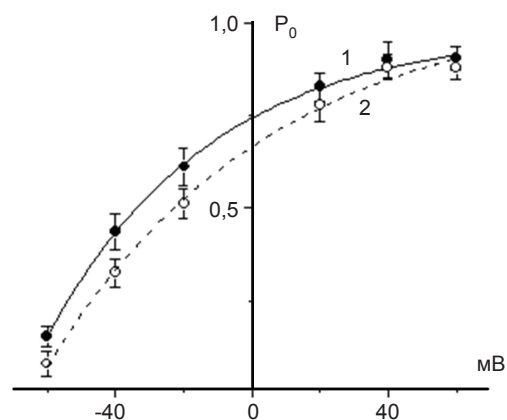


Рис. 3. Залежність ймовірності відкритого стану (P_o) катіонного каналу великої провідності від потенціалу при концентрації Ca^{2+} 1 ммоль/л (1) та в безкальцієвому розчині (2). Експериментальні дані були апроксимовані за рівнянням Больцмана

такий процес буде супроводжуватися появою в ньому негативного потенціалу [2, 3]. Потік одновалентних катіонів, спрямований в протилежний бік відносно струму іонів кальцію при вивільненні останніх з депо, буде перешкоджати різкому зниженню потенціалу в перинуклеарному просторі й таким чином, буде збільшувати тривалість кальцієвого сигналу. Проте при значних негативних потенціалах у люмені ядерної оболонки активність LCCC значно знижується, що призводить до ще більшого зростання негативного потенціалу в перинуклеарному просторі, та в свою чергу інгібує IP₃Rs, і припиняючи вивільнення Ca²⁺ з депо [2].

Отже, концентрація вільного Ca²⁺ у розчині не впливає на роботу катіонних каналів великої провідності, які розташовані у внутрішній мембрані ядерної оболонки нейронів. Можна стверджувати, що активність LCCC не залежить від ступеня насиченості внутрішньоклітинного кальцієвого депо.

Робота була виконана при підтримці Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології (grant DFFD F 46.2/001).

О.В. Лунько, О.А. Федоренко, С.М. Марченко

ВОЗДЕЙСТВИЕ CA²⁺ НА СВОЙСТВА КАТИОННЫХ КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОНКИ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА

В мембранах ядерной оболочки, содержащей инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы (IP₃Rs), были найдены также многочисленные катионные каналы большой проводимости (LCCC). IP₃Rs и LCCC, вероятно, функционально связаны: катионные каналы обеспечивают протиток K⁺, который предотвращает формирование отрицательного потенциала в люменах ядерной оболочки, что в свою очередь может увеличивать продолжительность высвобождения Ca²⁺ через IP₃Rs. LCCC ранее не были описаны и их молекулярная природа до сих пор неизвестна. Мы исследовали влияние Ca²⁺ на свойства этих каналов. Установлено, что полное отсутствие свободных ионов кальция в люменах ядерной оболочки или их высокая концентрация не изменяет основные биофизические характеристики катионных каналов большой проводимости. Таким образом, степень наполнения кальциевого депо не влияет на активность LCCC.

Ключевые слова: ядерная оболочка, ионные каналы, кальциевое депо

O.V. Lun'ko, O.A. Fedorenko S.M. Marchenko

THE EFFECT OF CA²⁺ ON THE PROPERTIES OF THE LARGE CONDUCTANCE CATION CHANNELS OF THE NUCLEAR ENVELOPE OF THE CEREBELLAR NEURONS

Previously we have found the large conductance cation channels (LCCC) in the nuclear membranes, where inositol-1,4,5-triphosphate receptors (IP₃Rs) were also observed. Probably IP₃Rs and LCCC are functionally connected: LCCC may provide the counterflow of K⁺, which prevent the formation of the negative potential in the lumen of the nuclear envelope and in such way may prolong the Ca²⁺ releasing by IP₃Rs. LCCC are poorly studied and their molecular nature is still unknown. We investigated the effect of Ca²⁺ on properties of these channels. Our results demonstrated the main biophysical properties of LCCC changed significantly neither in Ca²⁺-free solution, nor with high concentrations of Ca²⁺ in the nuclear lumen. So, the level of Ca²⁺ repletion of the store does not influence the activity of LCCC.

Key words: nuclear envelope, ion channels, calcium store.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko O.A., Duzhyy D.E., Marchenko S.M. Cationic large conductance channels of the nuclear envelope of Purkinje neurons of cerebellum // *Neurophysiology*. – 2007. – **39**, № 2. – P. 13–18.
2. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. The meaning of cation channels in the function of NE as Ca²⁺ store // *Neurophysiology*. – 2010. – **42**, № 4. – P. 281–286.
3. Fedorenko O.A., Yarotsky V, Duzhyy D.E., Marchenko S.M. The large conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons // *Pflug. Arch.* – 2010. – **460**. – P. 1045–1050.
4. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Spontaneously Active Ion Channels of the Nuclear Envelope Membrane // *Int. J. of Physiol. & Pathophysiol.* – 2011. – **2**, № 2. – P. 183–195.
5. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Properties of Large-Conductance Cationic Channels in the Neuronal Nuclear Envelope // *Neurophysiology*. – 2011. – **43**, № 3. – P. 192–194.
6. Franco-Obergon A., Wang H., Clapham D.E. Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines // *Biophys. J.* – 2000. – **79**. – P. 202–214.
7. Humbert J.P., Matter N., Artault J.C., Koppler P., Malviay A.N. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, № 1. – P. 478–485.
8. Latorre R, Brauchi S. Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel: activation by Ca²⁺ and voltage // *Biol.*

- Res. – 2006. – **39**, № 3. – P. 385–401.
9. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N., Kostyuk P.G., Thomas R.C. Spontaneously active and InsP_3 -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons // J. Physiol. – 2005. – **565** № 15. – P. 897–910.
10. Mazzanti M, DeFelice L.J., Cohn J., Malter H. Ion channels in the nuclear envelope // Nature. – 1990. – **22**, № 343(6260). – P. 764–767.
11. Mazzanti M., Bustamante J.O., Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope // Physiol. Rev. – 2001. – **81**, №1. – P. 1–19.
12. Picard L., Cote K., Teijeira J., Greentree D, Rousseau E. Sarcoplasmic reticulum K^+ channels from human and sheep atrial cells display a specific electro-pharmacological profile // J. Mol. Cell Cardiol. – 2002. – **34**. – P. 1163–1172.
13. Yamashita M., Sugioka M., Ogawa Y. Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release // FEBS J. – 2006. – **273**. – P. 3585–3597.

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

Матеріал надійшов до редакції 10.09.2012

В.В. Войтенко, В.В. Конопельнюк, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко

Механізми виникнення переддіабетичного стану за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

Досліджували зміни головних показників вуглеводного та ліпідного обміну, що відповідають клінічній картині розвитку переддіабетичного стану на фоні хронічної алкогольної інтоксикації. Аналізували глікемічні криві, які отримували протягом інсуліноглюкозотолерантного тесту, встановлено зростання швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами на 1-шу добу (в 1,5 раза) та 3-тю добу (в 1,3 раза) введення спиртового розчину. В більш пізні терміни на 7-му та 11-ту добу введення етанолу швидкість засвоєння глюкози знижується у тварин з хронічною алкогольною інтоксикацією. Було також виявлено підвищення вмісту серотоніну в сироватці крові щурів протягом усього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації у порівнянні з контрольними значеннями і зниження – в мозку щурів в 1,2 раза.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, переддіабетичний стан, глюкоза, серотонін, інсулінорезистентність.

ВСТУП

Цукровий діабет 2-го типу – хронічне ендокринне захворювання, основними патогенетичними факторами якого є гіперглікемія, зниження чутливості тканин до інсуліну та порушення функціонування β -клітин підшлункової залози. Серед найголовніших причин виникнення інсуліннезалежного цукрового діабету насамперед виділяють: малорухливий спосіб життя, неправильне харчування – споживання висококалорійної їжі, куріння, зайве вживання жирів, а також психічні розлади, постійні стреси, емоційні перевантаження [1, 17]. Згідно з літературними даними ще однією причиною може бути алкогольна інтоксикація [20]. Проте незважаючи на численні дослідження механізмів виникнення цукрового діабету 2-го типу недостатньо досліджено.

Нині в літературі немає чітких пояснень щодо можливого взаємозв'язку алкогольної інтоксикації та розвитку цукрового діабету 2-го типу [8–10, 22–24]. Деякі дослідники вважають, що алкоголізм є фактором розвит-

ку цього захворювання, з втратою контролю глікемії [9, 13, 24], в той час як інші вказують про відсутність такого зв'язку [10, 12]. Більш того під час досліджень було показано, що легке та помірне вживання алкоголю може захистити від розвитку цукрового діабету 2-го типу [8, 18, 19, 23].

Метою нашої роботи була оцінка можливості виникнення переддіабетичного стану за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 50 білих нелінійних щурах обох статей масою 160–200 г. Дослідження відповідали основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно з правилами (Страсбург, 1986 р.) та відповідно до етичних норм українського законодавства [5].

Розвиток експериментальної алкогольної інтоксикації у тварин дослідної групи відтворювали [7] за допомогою внутрішньошлункового введення 30%-го етилового спирту з

розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини протягом 11 діб. Контрольну групу склали щури, яким у тому самому віці внутрішньошлунково вводили воду, котру використовували для розведення етанолу.

Вміст серотоніну та триптофану визначали, використовуючи іонно-обмінну хроматографію Bio Rad, Biologic LP (США) та спектрофлуориметричні Shimadzu, RF-1501 (Японія) методи, які описані раніше [4, 11, 25]. Концентрацію глюкози встановлювали за допомогою приладу «ГЛЮКОФОТ-II» (Україна) згідно з інструкцією. Вміст глікозильованого гемоглобіну, холестерину та тригліцеридів вимірювали спектрофотометрично (Bio Rad, SmartSpec Plus) за допомогою наборів реактивів фірми «Lachema» (Росія). Вміст інсуліну визначали у сироватці крові дослідних тварин натщесерце за допомогою методу імуноферментного аналізу з використанням поліклональних антитіл проти інсуліну. Фракцію антиінсулінових 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 [6]. Всі процедури щодо отримання, очищення та перевірки специфічності антитіл були проведені згідно з рекомендаціями стандартних протоколів [2, 14]. Також у роботі були використані антикролячі антитіла кон'юговані з лужною фосфатазою («Bio-Rad», США) та субстрат – р-нітрофенолфосфат («Sigma», США). Оптичну густину проб вимірювали при довжині хвилі 405 нм (робоча хвиля) та 492 нм (похибка вимірювання). Вміст інсуліну в зразках сироватки крові розраховували як різницю екстинцій при довжині хвилі 405 та 492 нм і виражали в умовних одиницях у перерахунку на загальний вміст білка в крові (у міліграмах).

Для підтвердження розвитку стану інсулінорезистентності у дослідних тварин визна-

чали чутливість периферичних тканин до дії інсуліну за допомогою інсулінотолерантного тесту [16], проведеного з власними модифікаціями. Перед проведенням тесту натщесерце тварини були анестезовані за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції тіопенталу натрію (40 мг/кг). Після встановлення концентрації глюкози у крові, щурам внутрішньочеревинно вводили розчин інсуліну («Монодар», Україна) з розрахунку 0,175 ум.од./кг. За допомогою внутрішньовенного катетера через 15, 30 та 60 хв від моменту введення інсуліну відбирали проби крові та визначали концентрацію глюкози. За результатами тесту будували глікемічні криві, які відображають наскільки швидко нормалізується вміст глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін у групі контрольних і дослідних щурів з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel. Підраховували показники середньої арифметичної (M), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної (m). Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента. Достовірними вважались різниці при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток цукрового діабету 2-го типу супроводжується порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обміну, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів і систем. На рис. 1 представлено результати взаємозв'язку терміну вживання алкоголю та концентрації основних показників розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Одним з основних діагностичних критеріїв розвитку цукрового діабету 2-го типу є визначення рівня глікемії. У попередніх наших дослідженнях було показано, що концентрація глюкози в контрольній групі

тварин коливалася в межах 4,2–6,8 ммоль/л, а розвиток цукрового діабету 2-го типу супроводжувався підвищенням вмісту глюкози до 8–14 ммоль/л [1].

Слід відмітити, що при хронічній алкогольній інтоксикації підвищується концентрація глюкози. На 3-тю добу введення шурам 30%-го спиртового розчину цей показник підвищується в 1,6 раза порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1,г). На 7-му та 11-ту добу розвитку хронічної алкогольної інтоксикації встановлено подальше зростання цього показника в 1,8 та 1,7 раза відповідно порівняно зі значеннями контрольної групи тварин.

Згідно з сучасними літературними даними важливим маркером розвитку цукрового діабету 2-го типу є концентрація глікозильованого гемоглобіну, що відображає вміст цукру в крові за тривалий час. Нами було встановлено його підвищення в 2,5, 2,1, 2,3 та 3,5 раза на 1, 3, 7 та 11-ту добу від початку введення етанолу у крові шурів протягом всього періоду розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

порівняно з контролем (див. рис. 1,д). Такі зміни можуть бути показником довготривалої гіперглікемії та прогностичним маркером ускладнень, що супроводжують розвиток переддіабетичного стану зокрема та цукрового діабету в цілому.

При цукровому діабеті 2-го типу порушення вуглеводного метаболізму поєднуються з вираженими змінами ліпідного обміну. Відповідно до наших результатів, за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації підвищується концентрація тригліцеридів в 1,4 та 1,6 раза на 7-му та 11-ту добу відносно їх вмісту в крові контрольних шурів (див. рис. 1,в). Також зростав вміст холестерину в крові в 1,6, 1,9 та 2,2 раза на 3, 7 та 11-ту добу в дослідних тварин (див. рис. 1,б).

Слід відмітити, що порушення вуглеводного та ліпідного обміну супроводжувалися підвищенням вмісту інсуліну в дослідних шурів на 11-ту добу від початку введення спиртового розчину в 1,9 раза порівняно з контролем (див. рис. 1,а). Також знижувався вміст ліпопротеїну низької щільності на 1-шу

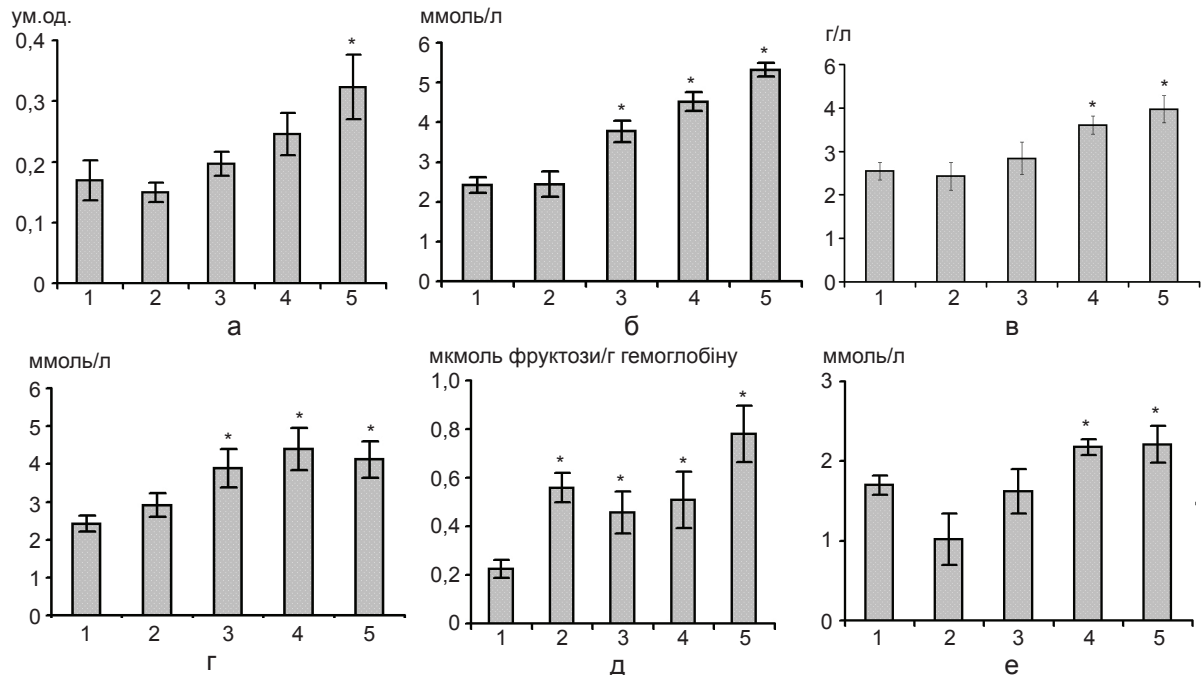


Рис. 1. Концентрація інсуліну (а), холестерину (б), тригліцеридів (в), глюкози (г), глікозильованого гемоглобіну (д) та ліпопротеїду низької щільності (е) у сироватці крові шурів: 1 – контроль, 2–5 – тварини з хронічною алкогольною інтоксикацією на 1, 3, 7 та 11-ту добу (n = 12). *P < 0,05 достовірність відносно контролю

добу від початку дослідження, який зростав в динаміці розвитку алкогольної інтоксикації в 1,3 раза (на 7-му та 11-ту добу; див. рис. 1,е).

Отже, встановлені зміни основних показників вуглеводного та ліпідного обмінів відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток цукрового діабету 2-го типу та переддіабетичного стану і узгоджується з метаболічними порушеннями у людей, хворих на інсулінонезалежний діабет. Отримані результати вказують, що з підвищенням терміну вживання алкоголю зростають основні показники розвитку цукрового діабету 2-го типу. Таким чином, регулярне вживання доз алкоголю, що мають суттєвий вплив на метаболізм, може призводити до розвитку переддіабетичного стану.

Сьогодні одним із основних патогенетичних факторів розвитку інсулінонезалежної форми діабету вважають інсулінорезистентність – недостатня відповідь клітин на дію інсуліну при його достатній кількості в крові. Цей стан зумовлений порушенням сприйнятливості до інсуліну та інсулінової секреції. Дослідження чутливості периферичних тканин до дії інсуліну є одним із основних діаг-

ностичних критеріїв підтвердження розвитку цукрового діабету 2-го типу.

На рис. 2 представлено криві, які відображають, наскільки швидко нормалізується вміст глюкози в крові тварин у відповідь на введення екзогенного інсуліну.

Для кількісного обрахунку результатів, отриманих під час інсулінотолерантного тесту за індекс чутливості периферичних тканин до інсуліну приймали швидкість зниження вмісту глюкози в крові після введення інсуліну, яку визначали за зміною концентрації глюкози на 15-й і 60-й хвилині від моменту отримання екзогенного інсуліну.

У попередніх дослідженнях нами було показано зниження в 1,3 раза швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами у щурів з цукровим діабетом 2-го типу порівняно зі зниженнями контрольної групи тварин, що узгоджується з літературними даними та відповідає загальній картині цього захворювання [1]. Для підтвердження або спростування виникнення переддіабетичного стану у щурів з алкогольною інтоксикацією слід було провести тест на визначення інсулінорезистентності. Потрібно зазначити, що

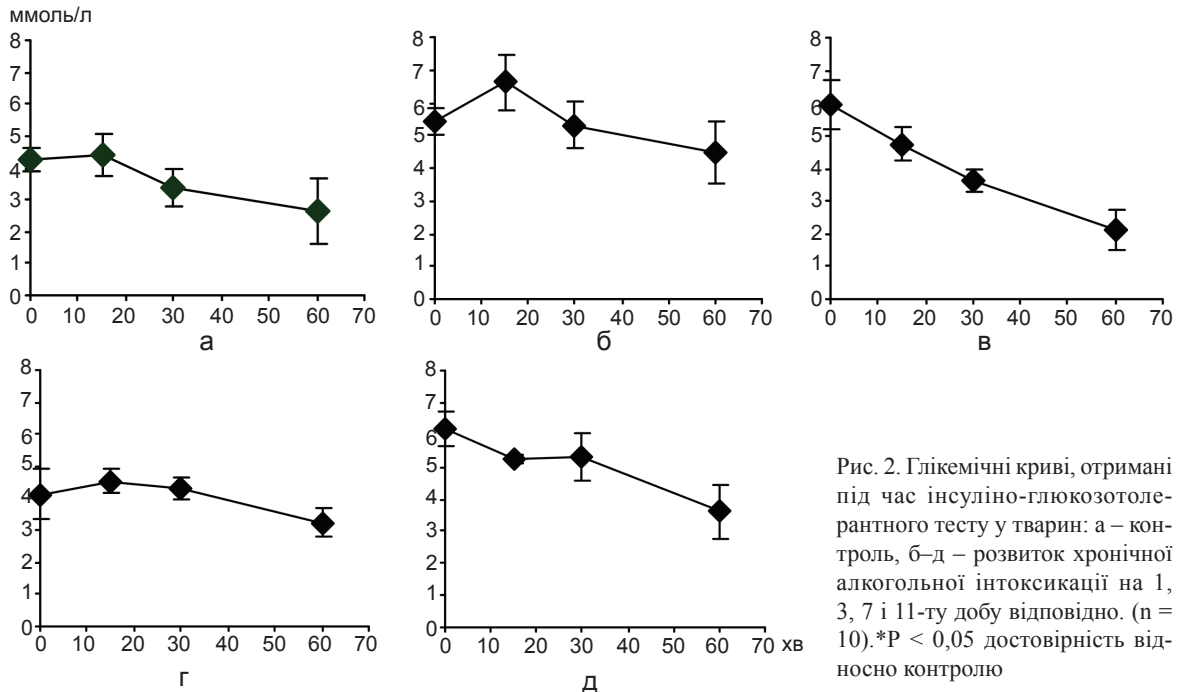


Рис. 2. Глікемічні криві, отримані під час інсуліно-глюкозотолерантного тесту у тварин: а – контроль, б–д – розвиток хронічної алкогольної інтоксикації на 1, 3, 7 і 11-ту добу відповідно. (n = 10). *P < 0,05 достовірність відносно контролю

під час дослідження встановлено зростання швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами на 1-шу добу (в 1,5 раза) та 3-тю добу (в 1,3 раза) введення спиртового розчину. В більш пізні терміни на 7-му та 11-ту добу швидкість засвоєння глюкози знижується, що може вказувати на розвиток стану інсулінорезистентності, який відіграє важливу роль у патогенезі цукрового діабету 2-го типу.

Згідно з даними літератури, втрата чутливості м'язової, жирової тканин та тканин печінки до інсуліну є причиною метаболічних порушень вуглеводного та ліпідного обміну за умов цукрового діабету 2-го типу та є одним з основних факторів розвитку та прогресування його ускладнень. Інсулінорезистентність тканин печінки характеризується зниженням синтезу глікогену і активацією процесів розщеплення його до глюкози, синтезу глюкози із амінокислот, лактату, пірувату, гліцерину, внаслідок чого збільшується надходження глюкози в кровообіг. Останнє є одним із ключових факторів розвитку цукрового діабету 2-го типу та прогресування його ускладнень [1, 21].

У попередній праці ми показали [3], що серотонінергічна система бере участь у розвитку та проходженні цукрового діабету 2-го типу. Встановлено, що однією з причин є зниження вмісту серотоніну в головному мозку та підвищення – в сироватці крові щурів. Наразі було досліджено вміст серотоніну та субстрату його біосинтезу – триптофану

в головному мозку та сироватці крові щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення вмісту серотоніну та триптофану протягом усього періоду розвитку алкогольної інтоксикації (на 1, 3, 7 та 11-ту добу від початку введення етанолу). Слід відмітити, що триптофан в мозку щурів підвищувався. Введення щурам 30%-го розчину етанолу призводило до зниження вмісту серотоніну в головному мозку дослідних тварин у 1,2 раза в усі досліджувані терміни.

За умов розвитку інтоксикації вміст триптофану у сироватці крові щурів на 1-шу добу знаходився у межах контрольних значень. Надалі введення етанолу дослідним тваринам на 3, 7 та 11-ту добу викликало поступове зростання вмісту цього показника в 1,3, 1,6 та 1,7 раза відповідно (див. таблицю). Вміст серотоніну в сироватці крові щурів під впливом етанолу підвищувався протягом всього періоду інтоксикації (див. таблицю). Таким чином, у результаті проведених досліджень спостерігається та сама тенденція зміни вмісту серотоніну та триптофану в головному мозку та сироватці крові щурів з алкогольною інтоксикацією, що і у тварин за умов розвитку цукрового діабету 2-го типу. Отримані результати вказують на залучення функціонування серотонінергічної системи в розвиток алкогольної інтоксикації. Останній супроводжується зростанням вмісту глюкози, розвитком інсулінорезистентності та зміною вмісту основних показників вуглеводного та

Вміст серотоніну та триптофану в головному мозку та сироватці крові щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації (M±m; n=10)

Показники	Контроль	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	11-та доба
Серотонін					
у головному мозку, мкг/г тканини	2,13±0,09	2,09±0,15	1,95±0,27*	1,84±0,11*	1,85±0,05*
у сироватці крові, мкг/мл	3,36±0,74	6,44±1,74*	5,18±0,74*	5,10±0,46*	5,70±0,54*
Триптофан					
у головному мозку, мкг/г тканини	6,76±1,42	13,11±4,26	26,27±1,36*	25,96±1,74*	27,87±4,70*
у сироватці крові, нг/мл	35,37±4,46	40,85±5,02	45,07±3,67*	56,51±4,21*	61,32±6,11*

*P < 0,05 достовірність різниці відносно контролю.

ліпідного обміну. Зміна вмісту серотоніну в головному мозку та сироватці крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією може бути однією з причин порушення гомеостазу глюкози, виникнення резистентності до інсуліну – виникнення переддіабетичного стану. Отже, отримані результати вказують на розвиток переддіабетичного стану у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією. Хронічне та надмірне вживання етанолу призводить до можливого розвитку цукрового діабету 2-го типу, що проявляється розвитком резистентності до інсуліну, порушенням гомеостазу глюкози, зміною основних показників вуглеводного та ліпідного обмінів.

В.В. Войтенко, В.В. Конопельнюк, А.Н. Савчук, Л.І. Остапченко

МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПРЕДИАБЕТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПРИ РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Исследовали изменения основных показателей углеводного и липидного обменов, которые соответствуют клинической картине, сопровождающей развитие переддиабетического состояния на фоне хронической алкогольной интоксикации. Из анализа гликемических кривых, полученных в ходе инсулино-глюкозотолерантного теста, установлено увеличение скорости усвоения глюкозы периферическими тканями на 1-е сутки (в 1,5 раза) и 3-и сутки (в 1,3 раза) введения спиртового раствора. На более поздних сроках на 7-е и 11-е сутки наблюдается снижение скорости усвоения глюкозы у животных с хронической интоксикацией алкоголем. Было также обнаружено повышение содержания серотонина в сыворотке крови крыс в течение всего периода развития хронической алкогольной интоксикации по сравнению с контрольными значениями и снижение – в мозгу крыс в 1,2 раза.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, переддиабетическое состояние, глюкоза, серотонин, инсулинорезистентность.

V.V. Voytenko, V.V. Konopelnyuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko

APPEARANCE OF PREDIABETIC STATE UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

We investigated the changes in key parameters of carbohydrate and lipid metabolism, which correspond to the clinical picture that accompanies the development of prediabetic condition

on the background of chronic alcohol intoxication. From the analysis of glycemic curves obtained during the insulin-glucose test, a speed of glucose uptake by peripheral tissues increased at the 1st day (1.5 fold) and the third day (1.3 fold) of administration of alcohol solution. At the later periods, at 7 and 11 days of ethanol administration, a decreased rate of glucose uptake in animals with chronic alcohol intoxication was detected. We also detected an increased content of serotonin in the blood serum and a decreased (1.2 fold) serotonin content in rat brain during the whole period of development of chronic alcohol intoxication.

Key words: alcohol intoxication, prediabetic condition, glucose, serotonin, insulin resistance.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Галенова Т.І., Конопельнюк В.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Відтворення експериментальної стрептозотоцин-індукованої моделі цукрового діабету 2-го типу у щурів // *Фізика живого*. – 2010. – №2. – С. 23–26.
2. Кетти Д. Антитела. Методы. Книга 1. – М.: Мир, 1991. – 288 с.
3. Конопельнюк В.В., Середницька К.Р., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Вплив m-хлорофенілпіперазіну на вміст серотоніну у мозку та сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу // *Мед. хімія*. – 2011. – **13**, №2. – С. 5–9.
4. Максименко Е.Г., Савченко В.Н. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга // *Вісник Харків. нац. ун-ту. ім. В.Н. Каразіна. Медицина*. – 2000. – **1**, № 494. – С. 40–43.
5. Мурзін О.Б. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей // *Посібник до практичних занять з фізіології людини*. – Дніпропетровськ: Вид. Дніпропетров. ун-ту, 2004. – С. 135–148.
6. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
7. Халилов М. Х., Закиходжаев Ш. Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации // *Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр., Ташкент*. – 1983. – С. 38–41.
8. Ajani U.A., Hennekens C.H., Spelsberg A. Alcohol consumption and risk of Type 2 diabetes mellitus among US male physicians // *Arch. Int. Med.* – 2000. – **160**. – P. 1025–1030.
9. Balkau B., Randrianjohany A., Papoz L. A prospective study of alcohol use and non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Amer. J. Epid.* – 1991. – **134**. – P. 1469–70.
10. Feskens E.J., Kromhout D.M. Cardiovascular risk factors and the 25-year incidence of diabetes mellitus in middle-aged men // *Ibid.* – 1989. – **130**. – P. 1101–1108.
11. Gaitonde M.K. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues // *Biochem. S.* – 1974. –

139. – P. 625-631.
12. Hodge A.M., Dowse G.K., Collins V.R. Abnormal glucose tolerance and alcohol consumption in three populations at high risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus // Amer. J. Epidemiol. – 1993. – **137**. – P. 178–89.
 13. Holbrook T.L., Barrett-Connor E., Wingard D.L. A prospective population-based study of alcohol and non-insulin-dependent diabetes mellitus // Ibid. – 1990. – **132**. – P. 902–909.
 14. Huse K., Böhme H.J., Scholz G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography // J. Biochem. and Biophys. Meth. – 2002. – **51**, № 3. – P. 217-231.
 15. Imam K. Management and treatment of diabetes mellitus // Adv. in Exp. Med. in Biol. – 2012. – **771**. – P. 356–380.
 16. Islam M.A., Akhtar M.A., Khan M.R. Oral glucose tolerance test (OGTT) in normal control and glucose induced hyperglycemic rats with *Coccinia cordifolia* L. and *Catharanthus roseus* L. // Pakistan J. Pharm. Sci. – 2009. – **22**, №4. – P. 402-404.
 17. Major K., Saiah L., Rubli E., Rochat S., Monod S., Büla C. // Rev. Med. Suisse. – 2013. – **9**, №368. – P. 40-43.
 18. Perry I.J., Wannamethee S.G., Walker M.K. Prospective study of risk factors for development of non-insulin diabetes in middle-aged British men // BMJ. – 1995. – **310**. – P. 560–564.
 19. Rimm E.B., Chan J., Stampfer M.J. Prospective study of cigarette smoking, alcohol use, and the risk of diabetes in men // BMJ. – 1995. – **310**. – P. 555–559.
 20. Song S.H. Emerging type 2 diabetes in young adults // Adv. in Exp. Med. in Biol. – 2012. – **771**. – P. 51-61.
 21. Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes // Ibid. – 2012. – №771. – P. 240–251.
 22. Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C. A prospective study of moderate alcohol drinking and risk of diabetes in women // Amer. J. Epidemiol. – 1988. – **128**. – P. 549–558.
 23. Tsumara K., Hayashi T., Suetmatsu C. Daily alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes in Japanese men // Diabet. Care. – 1999. – **22**. – P. 1432-1437.
 24. Wei M., Gibbons L.W., Mitchell T.L. Alcohol intake and incidence of Type 2 diabetes in men // Ibid. – 2000. – **23**. – P. 18–22.
 25. Weissbach H., Philip Waalkes T., Udenfriend S., Weissbach H. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine // J. Biol. Chem. – 1957. – **230**, № 2. – P. 865–871.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: vvvoitenko@yahoo.com

Матеріал надійшов
до редакції 18.03.2013

Л.Д. Любич, В.М. Семенова, М.І. Лісяний

Порівняльна патоморфологічна оцінка клітинно-тканинних реакцій мозку мишей-реципієнтів на імплантацію сингенних та алогенних нейроклітин

Для оцінки клітинно-структурних реакцій тканини мозку мишей-реципієнтів у відповідь на внутрішньомозкову імплантацію сингенних і алогенних нейрогенних клітин-попередників (НКП) суспензії НКП від мишей-донорів лінії C57BL/6 та CBA, що містили (72,7±9,9)% віментинпозитивних та (81,8±2,5)% GFAP-позитивних клітин, вводили стандартно у праву скроневу ділянку головного мозку мишей-реципієнтів лінії C57BL/6 у кількості 1×10^6 клітин на тварину. Частині тварин-реципієнтів алогенних НКП проводили імносупресію сандімуном у кількості 100 мкг на тварину на 0-ву, 3-тю, 6-ту добу експерименту. Через 24 год, 6, 12, 18 та 37 днів після внутрішньомозкової нейротрансплантації НКП готували стандартні гістологічні препарати головного мозку експериментальних тварин, які досліджували на цитоаналізаторі зображення "IBAS" (Німеччина). Після внутрішньомозкового введення суспензії алогенних фетальних НКП спостерігались ознаки перичелюлярного набряку та лімфоцитарна інфільтрація у прилеглих ділянках мозку на 12–18-ту добу, зменшуючись до 37-ї доби. Алогенні фетальні НКП зберігались до 18-ї доби спостереження та виявляли ознаки початкового диференціювання. За умов імносупресії сандімуном спостерігалось фенотипове диференціювання НКП та ознаки їх інфільтрації у суміжні відділи мозку. На 37-му добу імплантовані НКП не виявлялись. Реактивні зміни гліального компонента мозку на імплантовані НКП зменшувалися швидше після нейроімплантації сингенних НКП (до 18-ї доби), ніж при нейроімплантації алогенних НКП (до 37-ї доби). При введенні сингенних НКП на 37-му добу у ділянці імплантації зафіксовано утворення невеликого фрагменту незрілої кісткової тканини, що може свідчити про можливість трансдиференціювання НКП у інші клітинні типи.

Ключові слова: сингенні та алогенні фетальні прогеніторні нейроклітини, нейротрансплантація, сандімум.

ВСТУП

Ефективність трансплантації нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейроклітин-прогеніторів (НКП), яка вважається перспективною для лікування травматичних пошкоджень головного та спинного мозку, а також деяких нейродегенеративних захворювань, залежить від тривалості виживання пересаджених нейроклітин та їх інтеграції з органною системою реципієнта при відсутності небажаних побічних наслідків [7]. Інтенсивна розробка напрямку реконструк-

тивної нейрохірургії сприяла відновленню зацікавленості у питанні про імунологічний статус мозку та його відповідь на пересаджувані тканини. Зокрема, відкритим залишається питання про тривалість виживання у мозку алотрансплантатів та про механізми відторгнення НСК.

Згідно з сучасними уявленнями, у мозку може розвиватись імунна відповідь, яка за певних обставин сягає такої самої сили, як і у периферичних зонах організму [9]. Нині складні взаємовідносини імунних і нейральных клітин залишаються остаточно не

© Л.Д. Любич, В.М. Семенова, М.І. Лісяний

з'ясованими. За умови підвищення у НСК експресії антигенів гістосумісності та наявності коstimуляторних молекул ало- та ксенографти можуть активувати ефекторну фазу природної та адаптивної імунної відповіді на нейротрансплантацію [8, 15, 19]. У зв'язку з цим для уникнення небажаних побічних ефектів при трансплантації використовують НКП, отримані із сингенних джерел (кісткового мозку, жирової тканини тощо).

Метою нашої роботи є порівняльна патоморфологічна оцінка клітинно-структурних реакцій тканини мозку мишей-реципієнтів на внутрішньомозкову імплантацію сингенних та алогенних клітинних суспензій фетального мозку тварин-донорів, а також прослідкувати збереженість та стан імплантованих клітин у мозку цих тварин з 1-ї до 37-ї доби від початку експерименту.

МЕТОДИКА

Об'єктом для нейротрансплантації були НКП з мозку мишей ліній СВА та С57В1/6 13–15-ї доби ембріонального розвитку. Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Отримання клітинних суспензій. Суспензії фетальних НКП отримували за стандартною методикою [2]. Для імуногістохімічного виявлення експресії маркерів із них готували цитологічні препарати, фіксували 4%-м нейтральним формаліном та імуногістохімічно виявляли віментин – маркер стовбурових/прогеніторних клітин, – і гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) – маркер гліобластів та астроцитів. У роботі використані набори «Sigma Immunochemicals VIMENTIN» та «Sigma Immunochemicals GFAP» (Німеччина), згідно з рекомендаціями виробника.

Після всіх проведених процедур клітини дофарбовували 0,2%-м метиловим зеленим. У разі позитивної реакції відповідні структури у цитоплазмі клітин набували коричневого забарвлення на тлі смарагдово-зелених ядер. Цитологічні препарати поміщали в гліцерин і досліджували в цитоаналізаторі зображення «IBAS-2000» (Німеччина) з подальшою фотореєстрацією.

Внутрішньомозкова трансплантація клітин. Суспензії НКП від мишей-донорів ліній С57В1/6 та СВА вводили стандартно у праву скроневу ділянку головного мозку мишей-реципієнтів лінії С57В1/6 у кількості 1×10^6 клітин на тварину на глибину 1,5–2,0 мм в об'ємі 0,1 мл. Частині тварин-реципієнтів, яким вводили алогенні НКП, проводили імуносупресію сандімуном (циклоспорин А для парентерального введення, «Novartis Pharma AG», Швейцарія) у кількості 100 мкг на тварину на 0-ву, 3-тю, 6-ту добу експерименту.

Дослідних тварин (мишей-реципієнтів лінії С57В1/6) розділили на 3 групи. Мишам 1 групи внутрішньомозково вводили алогенні фетальні НКП донорів лінії СВА (n=15); тваринам 2-ї групи внутрішньомозково вводили алогенні фетальні НКП донорів лінії СВА та проводили імуносупресію сандімуном (n=15); тваринам 3-ї групи внутрішньомозково вводили сингенні фетальні НКП донорів лінії С57В1/6 (n=15).

Методи морфологічних досліджень. Через 24 год, 6, 12, 18 та 37 діб після внутрішньомозкової нейротрансплантації клітинної суспензії у кожному досліді тварин забивали ефірним наркозом, головний мозок вилучали з порожнини черепа та фіксували у 10%-му нейтральному формаліні. Макроскопічно оцінювали стан рельєфу мозку, мозкових оболонок і місце введення клітинних суспензій. З фіксованого мозку вирізали фронтальні блоки з пункційним каналом, які проводили через целоїдин-парафінову заливку стандартним способом. З отриманих блоків готували серійні зрізи товщиною 5–6 мк з наступним фарбуванням гематоксилін-еози-

ном, гематоксилін-пікрофуксином та 1%-м водним розчином тіоніну за Нісслем ("Janssen Chimica", Бельгія), який виявляє фенотип і тонку структуру нейронів. Цитологічне дослідження гістологічних препаратів мозку тварин проводили на цитоаналізаторі зображення "IBAS" (Німеччина) з подальшою фотореєстрацією при збільшенні x200, x400 та x800.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

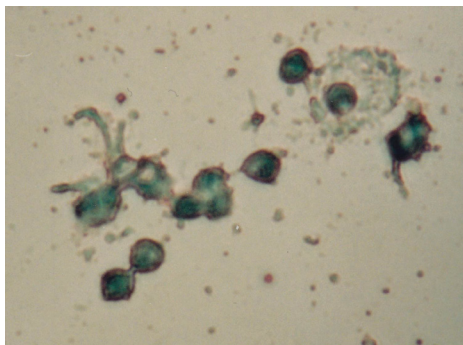
Імуногістохімічне дослідження показало, що у суспензіях НКП, які вводили тваринам-реципієнтам, відсоток клітин, що експресували віментин, становив $72,7 \pm 9,9$ % (рис. 1,а). Експресія GFAP виявлена у $81,8 \pm 2,5$ % клітин (див. рис. 1,б). Як відомо, одночасна експресія маркерів реєструється у клітинах-прекурсорах, які не набули фенотипових характеристик кінцевого диференціювання. Показано [6], що в зразках культивованих клітин ембріонального мозку людини 9–10 тиж гестації більшість нестинпозитивних клітин коекспресують віментин. Відомо також, що нестин маркує НСК, а віментин – клітини-попередники. Крім того, частина GFAP-позитивних клітин також експресують і віментин. Ці клітини мають астроцитоподібну цитоструктуру з великими ядрами. Подвійна експресія ембріональними нейроклітинами GFAP і віментину пояснюється тим, що для НСК є притаманною певна

астроцитарна мімікрія [4]. Показано, що з клітин, які експресують GFAP, можуть розвиватися нейрони, характерні для стріатуму, які в нормі отримують із гангліїв. Це свідчить про те, що одна із субпопуляцій нейрогенних попередників має особливості, що властиві для гліальних клітин [4].

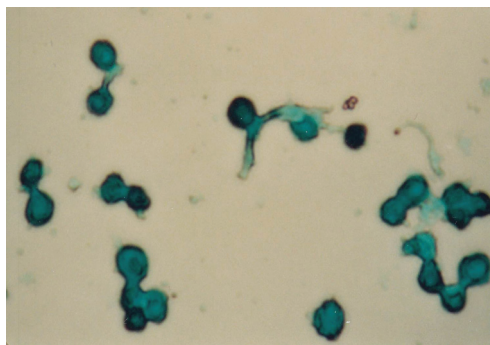
Патоморфологічне дослідження тканини мозку мишей 1-ї групи показало, що через 24 год імплантовані НКП виявлялись у пункційному каналі, а окремі НКП – у просвіті шлуночка мозку. Навколо пункційного ходу зберігалася майже звичайна гістоструктура мозкової тканини з наявністю окремих нейронів з оборотними дистрофічними змінами у вигляді деформації цитоплазми, тигролізу нісслевської субстанції та редукції відростків. Такі нейрони були оточені вузькою зоною перичелюлярного набряку (рис. 2,а). Подібний стан мозкової речовини навколо пункційного каналу зберігався і на 6-ту добу.

На 12-ту добу після внутрішньомозкового введення суспензії алогенних НКП імплантовані нейроклітини прослідковувалися вздовж пункційного ходу (див. рис. 2,б), оточеного розрідженою перифокальною ділянкою з наявністю дистрофованих нейронів. Навколо окремих судин виявлялися перикапілярні крововиливи. Спостерігалася також проліферація місцевих гліоцитів у субпендимарній зоні бічного шлуночка.

У тварин 2-ї групи на 12-ту добу у місці імплантації зберігалася дифузне скупчення



а



б

Рис. 1. Суспензія нейроклітин-прогеніторів мишей лінії C57BL/6: а – імуногістохімічне фарбування на віментин. Пояснення у тексті. x800. б – імуногістохімічне фарбування на GFAP. Пояснення у тексті. x800

недиференційованих НКП. Тканина мозку, що оточувала ділянку імплантації, характеризувалася помірним набряком та дистрофічними змінами нейронів у вигляді заокруглення та зморщування цитоплазми з редукцією відростків. На відстані від місця імплантації алогенних НКП у субепендимарній ділянці бічного шлуночка спостерігалася проліферація гліоцитів (див. рис. 2,в).

На 18-ту добу у пункційному каналі зберігалось моношарове скупчення імплантованих алогенних НКП (див. рис. 2,г). Деякі з них набули конусоподібної та трикутної форми з початковим формуванням відростків. У тканині мозку навколо місця імплантації виявлялись ознаки помірного перичелюлярного та периваскулярного набряку. У субепендимарній ділянці бічного шлуночка зберігались

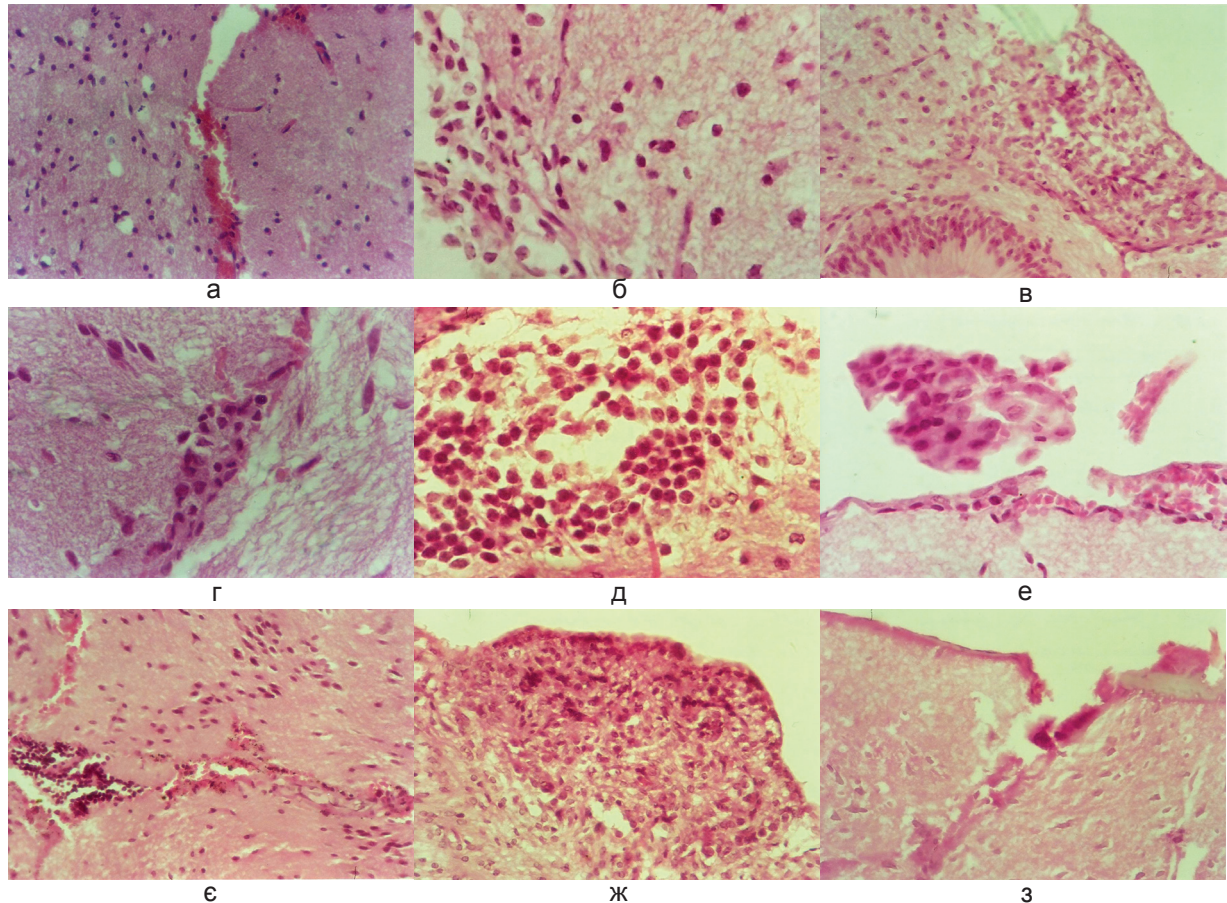


Рис. 2. Клітинно-структурні зміни тканини мозку мишей-реципієнтів лінії C57BL/6 у відповідь на внутрішньомозкову імплантацію алогенних фетальних нейроклітин-прогеніторів – НКП (13–15-та доба ембріонального розвитку) мишей-донорів лінії СВА. Фарбування гематоксилін-еозином: а – рановий канал із вмістом еритроцитів та невеликою кількістю імплантованих НКП. 24 год після введення суспензії НКП. х400; б – скупчення недиференційованих нейроклітин вздовж пункційного ходу. 12-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х800; в – ділянка гіперплазії субепендимарної глії. 12-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х400; г – скупчення нейроклітин у глибині пункційного каналу. Загальний вигляд. 18-та доба після введення суспензії НКП. х800; д – скупчення нейроклітин різного ступеня диференціювання. 18-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х800; е – острівці нейроклітин на віддаленні від місця нейроімплантації. 18-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х800; ж – зімкнутий пункційний канал після внутрішньомозкового введення клітин з наявністю скупчення лімфоцитів. 18-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х200; з – проліферація глії в субепендимарній зоні бічного шлуночка. 18-та доба після введення НКП на тлі імуносупресії. х400; з – зімкнутий пункційний хід у вигляді гомогенної зони некрозу. 37-та доба після введення НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х400

осередки клітин місцевої гіперплазованої глії.

За умов імуносупресії сандімуном на 18-ту добу після внутрішньомозкової імплантації алогенних НКП у просвіті пункційного ходу зберігалися скупчення нейроклітин з різною щільністю розташування та різним ступенем фенотипового диференціювання деяких з них, а також окремі моношарові острівці нейроклітин. У суміжній мозковій речовині прослідковувались ознаки інтеграції імплантованих НКП у перифокальну зону. На деяких рівнях гістологічних зрізів мозку мишей у поверхневих відділах пункційного ходу з'явилися скупчення лімфоцитів і змінених еритроцитів, а також помірна лімфоцитарна інфільтрація у прилеглих ділянках м'яких мозкових оболонок. У субependимарній ділянці бічного шлуночка визначався осередок гіперплазованої нейроглії (див. рис. 2, д, е, ж).

На 37-му добу спостереження місце введення алогенних НКП набуло вигляду зімкнутого ходу із залишками загиблих клітин (див. рис. 2, з). У перифокальній зоні зберігались ознаки залишкового перицелюлярного та периваскулярного набряку. За умов імуносупресії сандімуном відмінностей від попереднього дослідження не спостерігалось.

Гістологічне дослідження тканини мозку мишей-реципієнтів 3-ї групи через 24 год після введення клітин виявило дифузне їх розташування вздовж пункційного каналу, а також надходження у шлуночкову систему. Так, у просвіті переднього рога бічного шлуночка виявлені невеликі острівці нейроклітин недиференційованого фенотипу. Водночас відзначено наявність дифузних скупчень нейроклітин субependимарної перивентрикулярної зони навколо стінок передніх рогів бічних шлуночків (рис. 3, а), що може відображувати активацію їх проліфераційного потенціалу, стимульованого внутрішньомозковою імплантацією сингенних НКП. У тканині навколо пункційного каналу щілиноподібного вигляду визначалися цитологічні ознаки дистрофічних змін нейроцитів у вигляді деформації

цитоплазми, тигролізу нісслевської субстанції та редукції відростків. Навколо нейроцитів спостерігалася вузька зона перицелюлярного набряку. На віддалі від місця імплантації тканина мозку зберігала звичайну структуру.

На 6-ту добу дослідження у кінцевих відділах пункційного каналу прослідковувалося просторове та кількісне збільшення імплантованих у мозок сингенних НКП з утворенням дифузних скупчень. Навколо них спостерігались ознаки помірної дистрофії нейроцитів на тлі набряку нервової тканини. Сингенні НКП зберігали недиференційований мінімальний фенотип, а окремі з них перебували у стані мітотичного ділення. Водночас збільшувався вміст нейроклітин у субependимарній зоні навколо бічного шлуночка з накопиченням нейроклітин недиференційованого фенотипу у вигляді компактних сфероїдних утворень. Подібні скупчення сингенних НКП зберігалися також у просвіті бічного шлуночка (див. рис. 3, б, в, г).

На 12-ту добу експерименту імплантовані сингенні НКП утворювали дифузні скупчення клітин недиференційованого фенотипу уздовж пункційного каналу та у глибоких його відділах (див. рис. 3, д). У суміжній тканині мозку біля імплантату сингенних НКП спостерігались ознаки гіперплазії клітин місцевої нейроглії з утворенням серед них гіпертрофованих макроплазматичних форм астроцитів (див. рис. 3, е).

На 18-ту добу після внутрішньомозкової імплантації суспензії сингенних НКП ознаки проліферації нейроклітин в ділянках перивентрикулярних відділів мозку навколо бічних шлуночків майже повністю зникали (див. рис. 3, є).

На 37-му добу у кінцевих відділах залишкового пункційного каналу виявлено фрагмент кісткової тканини зі вмістом фіброblastів і комплексів ліпоцитів (див. рис. 3, ж). У просвіті каналів кісткової тканини спостерігалось скупчення поліморфних гематогенних клітин, серед яких ідентифікувалися лімфоцити, сегментоядерні лейкоцити, плазматичні клітини зі

збільшеними ядрами, а також багатоядерні форми (див. рис. 3,з).

Збереженість та стан імплантованих клітин протягом експерименту. Як сингенні, так і алогенні НКП уже протягом першої доби після введення розповсюджувались у шлуночковій

системі. Виявлені фігури мітотичного ділення відображують здатність цих нейроклітин до проліферації у тканині мозку мишей-реципієнтів. Більш активна проліферація введених НКП спостерігалася при відсутності несумісності за антигенами головного комплексу

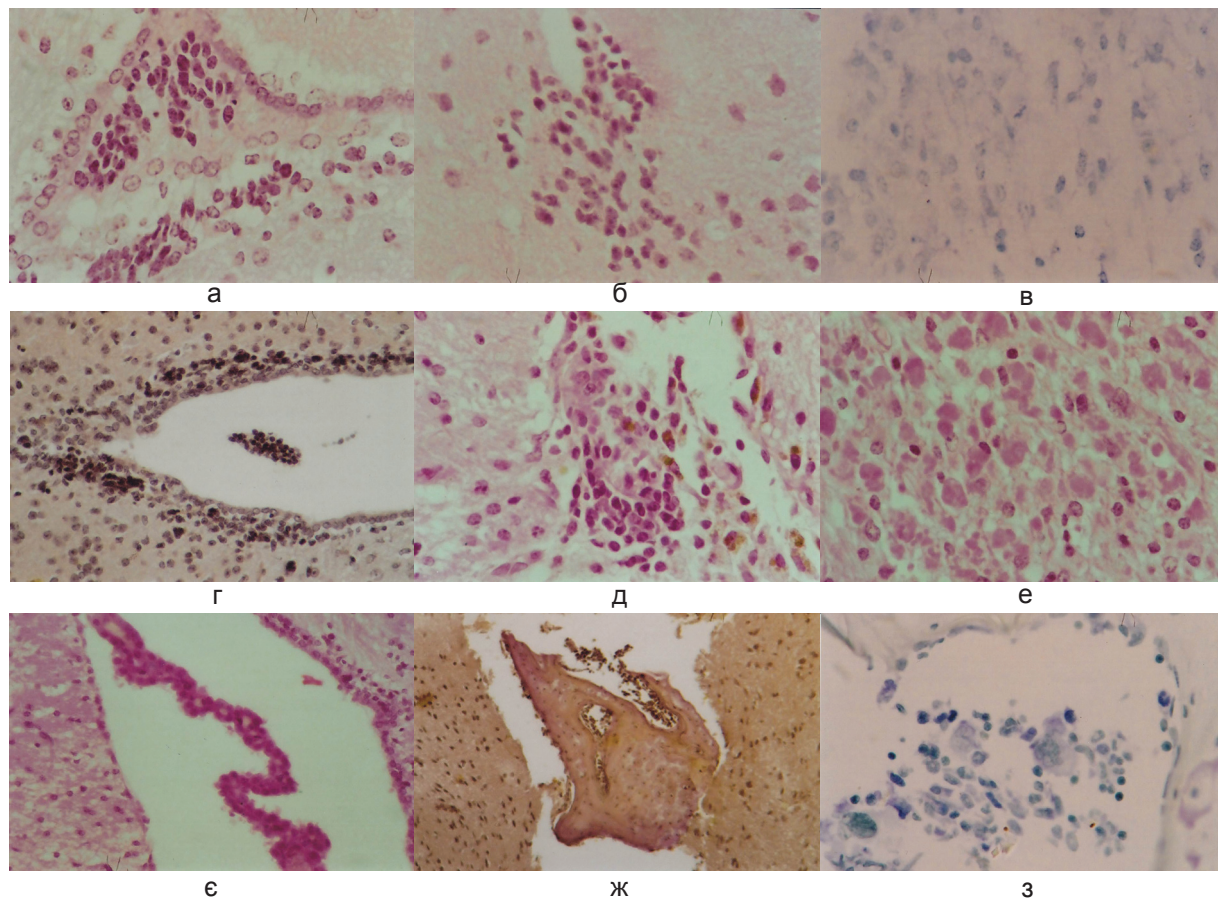


Рис. 3. Клітинно-структурні зміни тканини мозку мишей-реципієнтів лінії C57BL/6 у відповідь на внутрішньомозкову імплантацію сингенних фетальних нейроклітин-прогеніторів – НКП (13–15-та доба ембріонального розвитку) мишей-донорів лінії C57BL/6. Фарбування гематоксилін-еозином: а – скупчення сингенних нейроклітин у просвіті переднього рогу бічного шлуночка. 24 год після введення суспензії НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х800; б – імплантовані у мозок сингенні нейроклітини у кінцевих відділах пункційного каналу. 6-та доба після введення НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х800; в – імплантовані у мозок сингенні нейроклітини недиференційованого фенотипу, окремі з них у стані мітотичного ділення. 6-та доба після введення НКП. Фарбування тіоніном. х800; г – скупчення нейроклітин у субependимарній зоні бічного шлуночка та у його просвіті. 6-та доба після введення НКП. Фарбування пікрофуксином за Ван Гізон. х400; д – імплант сингенних нейроклітин-прогеніторів недиференційованого фенотипу впродовж пункційного каналу та у глибоких відділах пункційного каналу. 12-та доба після введення НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х800; е – ділянка гіперплазії гліоцитів з утворенням гіпертрофованих макроплазматичних форм астроцитів. 12-та доба після введення НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х800; є – зменшення ознак проліферації нейроклітин в ділянках перивентрикулярних відділів мозку навколо бічних шлуночків. 18-та доба після введення НКП. Фарбування гематоксилін-еозином. х400; ж – фрагмент кісткової тканини у ділянці імплантації сингенних НКП. 37-ма доба після їх введення. Фарбування пікрофуксином за Ван Гізоном х200; з – клітинний склад гематогенних клітин у кістковому фрагменті. 37-ма доба після введення НКП. Пояснення у тексті. Фарбування тіоніном. х800

гістосумісності, тобто у випадку сингенних НКП. Це узгоджується з дослідженням [11] із застосуванням біолоюмінесцентної візуалізації, в якому показано, що НКП при трансплантації у головний мозок зберігалися живими не менше 14 діб і проліферували активніше у Т-дефіцитних мишей (nude), ніж у імунокомпетентних мишей ліній C57B1/6 або CD-1, у яких визначалася прогресивна імунозалежна втрата нейроклітин. Таким чином, повна сумісність за антигенами головного комплексу гістосумісності або імунодефіцитний стан реципієнта (нездатність розвивати імунну відповідь на антигени гістосумісності) впливає на виживання та проліферативний потенціал трансплантованих у мозок НКП.

У наших дослідах введені НКП прослідковувались у тканині мозку реципієнта до 18-ї доби експерименту. У подальшому, до 37-ї доби, частина клітин гинула, а частина проходила шлях диференціювання у різні клітинні типи: за нейробластним фенотипом, як встановлено для алогенних НКП, а також зберігала потенцію до диференціювання в інші клітинні типи у випадку сингенних НКП.

Слід відмітити, що на 18-ту добу спостереження імплантовані алогенні НКП виявляли ознаки початкового нейробластного диференціювання; а в дослідах з імуносупресією сандімуном – ознаки фенотипового диференціювання різного ступеня. Крім того, у суміжній мозковій речовині прослідковувались ознаки інфільтрації імплантованих НКП у перифокальну зону з повноцінною інтеграцією у тканину мозку реципієнтів (за умов імуносупресії сандімуном). Наші результати частково узгоджуються з даними Лероге та співавт. [13], які виявили тривале виживання пересаджених фетальних НКП та їх морфологічне дозрівання з утворенням усіх клітинних типів центральної нервової системи, а також формування синапсів в новоутворених нейронах та інтеграцію з клітинами мозку реципієнта.

Водночас на 37-му добу виявлені ознаки трансдиференціювання сингенних НКП у

клітини кісткової тканини та клітини гемопоетичного ряду (лімфоцити, сегментоядерні лейкоцити, плазматичні клітини), що може вказувати на ризик розвитку тератоми. Такі спостереження описані в літературі [1,17] при трансплантації ембріональних стовбурових клітин миші і людини експериментальним мишам. У дослідженні Гордєєвої [1] показано, що мінімальною кількістю, здатною індукувати розвиток пухлин, є 10^3 клітин при трансплантації під капсулу нирки і 10^5 клітин при підшкірній трансплантації імунодефіцитним мишам лінії Nude (Nu/Nu); тоді як у випадку імунокомпетентних мишей лінії C57BL/6 критичною концентрацією трансплантованих клітин була 3×10^4 . У нашому досліді достатньою концентрацією для розвитку тератоми при внутрішньомозковій трансплантації сингенних НКП імунокомпетентним мишам лінії C57BL/6 виявилась 10^6 клітин. Водночас у дослідженні Цупикова та співавт. [5] при субокципітальній трансплантації сингенних фетальних нейрогенних клітин 12,5-добового розвитку у кількості 2×10^5 клітин мишам лінії FVB з ішемією показано, що трансплантовані клітини виживали, мігрували та диференціювалися у зрілі нейрони в гіпокампі ішемізованих тварин.

Клітинно-структурні реакції тканини мозку мишей-реципієнтів у відповідь на внутрішньомозкову імплантацію сингенних та алогенних НКП. Реактивні зміни у тканині мозку мишей-реципієнтів у відповідь на внутрішньомозкове введення алогенних та сингенних НКП виявилися в цілому подібними, але відрізнялися за особливостями їх динаміки. До загальних подібних змін відносяться насамперед реактивні зміни гліального компонента мозку на імплантовані НКП, які виникали на 1-6-ту добу, зменшуючись у наступні строки дослідження. Поряд з тим виявлено ознаки помірного перичелюлярного та периваскулярного набряку у перифокальній зоні мозку навколо пункційного каналу, які є універсальною реакцією його тканини на дію різних чинників, що у наступні терміни поступово зменшувались. Крім того,

імплантація сингенних (24 год, 6–12-та доба) і алогенних (12–18-та доба) НКП активувала проліфераційний потенціал нейроклітин субependимарної перивентрикулярної ділянки бічних шлуночків.

Реактивні зміни гліального компонента мозку та ознаки перичелюлярного та периваскулярного набряку у перифокальній зоні мозку відображають прозапальну відповідь мозку реципієнта сингенних та алогенних НКП. Зокрема, у суміжній тканині мозку біля імплантата сингенних НКП спостерігались ознаки гіперплазії клітин місцевої нейроглії з утворенням серед них гіпертрофованих макроплазматичних форм астроцитів, що узгоджується з літературними даними [14]. Так, показано, що імплантація ембріональних стовбурових клітин у кортекс щурів лінії Sprague-Dawley через 3 доби після травми мозку супроводжувалася розвитком реактивного астрогліозу, активацією мікроглії та масивною інвазією макрофагів у ділянки трансплантації навіть у тих випадках, коли пересажені клітини знаходилися в контрлатеральній гемісфері, віддаленій від травматичного вогнища [14].

Водночас реактивні зміни гліального компонента мозку на імплантовані НКП зменшувалися швидше після нейроімплантації сингенних НКП (до 18-ї доби), ніж при нейроімплантації алогенних НКП (до 37-ї доби). Разом з тим при введенні алогенних НКП на 12-ту добу виявлялися перикапілярні крововиливи, що відбиває посилення судинної проникності капілярної сітки у цих ділянках. При введенні алогенних НКП на 18-ту добу зафіксована помірна лімфоцитарна інфільтрація тканини мозку навколо місця імплантації.

Більш затяжний характер змін гліального компонента мозку на алогенні імплантовані НКП, посилення судинної проникності капілярної сітки у ділянках імплантації, лімфоцитарна інфільтрація оточуючої тканини мозку, на нашу думку, є морфологічним відображенням розвитку алоспецифічної імунної відповіді реципієнта на введені алогенні НКП. Отримані патоморфологічні результати

корелюють з даними наших попередніх імунологічних досліджень [3], згідно з якими клітинні та гуморальні реакції трансплантаційного імунітету мали подібну динаміку при внутрішньомозковому введенні алогенних НКП. Морфологічно лімфоцитарна інфільтрація виявлялась у прилеглих ділянках мозку на 12–18-ту добу, зменшуючись до 37-ї доби. Клітинні реакції трансплантаційного імунітету наростали з 6-ї по 12-ту добу та достовірно знижувались на 37-му добу експерименту; гуморальні реакції – наростали з 12-ї по 18-ту добу [3]. Це підтверджує умовність визначення «імунопривілейованості» головного мозку, що слід враховувати при клінічній нейротрансплантації.

Розвиток реакцій трансплантаційного імунітету на 6-12-ту добу після внутрішньомозкової імплантації алогенних фетальних НКП свідчить про наявність антигенів комплексу гістосумісності на поверхні фетальних НКП. Миші лінії СВА є носіями гаплотипу H-2^k, тоді як миші лінії C57BL/6 – H-2^b; відповідно НКП цих тварин експресують різні молекули гістосумісності I класу, що є продуктами гена H-2D. При цьому рівень експресії антигенів гістосумісності фетальними НКП є, вочевидь, достатнім для генерації алоцитотоксичної клітинної відповіді на клітинний імплантат.

Слід підкреслити також, що нині в науковій літературі не існує усталеної думки щодо експресії антигенів ГКГ I і II класів НСК та НКП. Однак є свідчення того, що вони експресують антигени гістосумісності I та II класу [32].

Розвиток морфологічних змін, показаний у наших дослідженнях, узгоджується з результатами інших авторів. Зокрема, при алотрансплантації клітин з периферичної нервової тканини мишей лінії C57BL/6 у мозок мишей лінії BALB/c на 10-ту добу гістологічно виявлена значна клітинна інфільтрація в алографтах [16]. При порівнянні імунної відповіді мишей цих ліній на трансплантати нервів і шкіри (як відомо, трансплантати шкіри є «золотим стандартом» – їх відторгнення

прямо корелює з клітинною та гуморальною відповіддю реципієнтів) встановлено [18], що в обох варіантах трансплантації реєструвалася значна клітинна імунна відповідь з максимальним розвитком на 14-ту добу. При цьому гуморальна імунна відповідь з наростанням титру антитіл сягала піку на 14-ту та 21-шу добу.

За умов імуносупресії сандімуном рівень алоцитотоксичних клітинних і гуморальних реакцій достовірно знижувався, а морфологічно виявлялись ознаки фенотипового диференціювання у нейробластному напрямку імплантованих алогенних НКП та повноцінної їх інтеграції у тканину мозку реципієнтів.

Отримані нами результати узгоджуються з даними Ideguchi та співавт. [10], які показали, що через 2 та 8 тижнів після нейротрансплантації НКП, отриманих з ембріональних стовбурових клітин мишей, навколо цієї ділянки спостерігалась акумуляція мікрогліальних/макрофагальних клітин та лімфоцитів, що відображає розвиток імунної відповіді в алографтах НКП. Але таких ознак не спостерігали при одночасному призначенні циклоспорину А. При цьому кількість нейронів та астроцитів в алографті була вища у мозку імуносупресованих мишей. На думку авторів, ці результати підтверджують, що алогенні НКП, отримані з ЕСК, викликають імунну відповідь мозку реципієнта, але її рівень недостатній для відторгнення трансплантату [10].

За допомогою імуногістохімічних досліджень показано також, що при введенні НСК лінії c17.2 у мозок щурів з ознаками модельованого паркінсонізму розвивалась внутрішньомозкова клітинна та гуморальна імунна відповідь, рівень якої значно зменшувався при трансплантації НСК, трансфікованих геном імуносупресивного цитокіну IL-10 [20].

Krystkowiak та співавт. [12] наводять результати застосування трансплантації фетальних нейротканин у пацієнтів з хворобою Хантінгтона. У 4 з 13 хворих було діагностовано ознаки алоїмунізації без відторгнення трансплантату; у 5 з 13 були виявлені біологічні, радіологічні та клінічні ознаки процесу

відторгнення. Водночас процес відторгнення був зворотним при застосуванні імуносупресивної терапії: активність трансплантату відновлювалась через 6 міс.

У попередньому дослідженні нами показано, що з 12-ї по 37-му добу у тварин із внутрішньомозковим введенням алогенних НКП збільшувався вміст аутоантитіл до NSE (нейронспецифічної енолази) [3], що, на нашу думку, може відбивати активацію пластичних процесів з боку імплантованих НКП, зокрема, синтезу маркерного білка – NSE. Проліферація гліоцитів у субependимарній зоні на 12–18-ту добу та часткове диференціювання трансплантованих клітин на 18-ту добу після введення алогенних НКП за часом корелювала зі збільшенням вмісту аутоантитіл до нейроспецифічного білка S-100 [3]. Це може свідчити як про активні процеси білкового синтезу, які супроводжують проліферацію та диференціювання частини фетальних клітин трансплантату, так і про деструкцію інших імплантованих клітин, що супроводжується вивільненням нейроантигенів і подальшою аутоїмунізацією.

Цікавими з нашої точки зору є дані патоморфологічних досліджень, отримані на 18-ту добу спостереження, які свідчать про те, що імплантовані фетальні НКП починали диференціюватися та інфільтрувати тканину мозку-реципієнта. На 37-му добу реактивні зміни мозкової тканини майже зникли. Це корелює із встановленим раніше достовірним зменшенням інтенсивності клітинних та гуморальних реакцій алоїмунітету до 37-ї доби [3]. Використання імуносупресорного препарату сандіmun дало змогу значно знизити прояви реакцій трансплантаційного імунітету та сприяло диференціюванню і повноцінній інтеграції імплантованих алогенних НКП, що обґрунтовує показання до обов'язкового застосування імуносупресії при клінічній нейротрансплантації алогенних клітин ембріонального та фетального мозку. Водночас варто враховувати ризик розвитку тератом при застосуванні для трансплантації сингенних НКП.

ВИСНОВКИ

1. Після внутрішньомозкового введення суспензії аlogenних фетальних НКП спостерігались ознаки перичелюлярного набряку та лімфоцитарна інфільтрація, які виявлялись у прилеглих ділянках мозку на 12–18-ту добу, зменшуючись до 37-ї доби.

2. При внутрішньомозковій імплантації суспензії аlogenних фетальних НКП останні зберігались до 18-ї доби спостереження та виявляли ознаки початкового нейробластного диференціювання. За умов імуносупресії сандімуном виявлено ознаки фенотипового диференціювання НКП та їх інфільтрації у суміжні відділи мозку. На 37-му добу імплантовані НКП не виявлялись.

3. Реактивні зміни гліального компонента мозку на імплантовані НКП зменшувались швидше після нейроімплантації сингенних НКП (до 18-ї доби), ніж при нейроімплантації аlogenних НКП (до 37-ї доби).

4. При введенні сингенних НКП у ділянці імплантації на 37-му добу зафіксовано ознаки трансдиференціювання НКП у інші клітинні типи (клітини кісткової тканини та клітини гемопоетичного ряду).

Л.Д. Любич, В.М. Семенова, Н.І. Лісяний

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫХ РЕАКЦИЙ МОЗГА МЫШЕЙ-РЕЦИПИЕНТОВ НА ИМПЛАНТАЦИЮ СИНГЕННЫХ И АЛЛОГЕННЫХ НЕЙРОКЛЕТОК

С целью сравнения клеточно-структурных реакций ткани мозга мышей-реципиентов в ответ на внутримозговую имплантацию сингенных и аллогенных суспензий нейрогенных клеток-предшественников (НКП) суспензии НКП от мышей-доноров линий C57BL/6 и CBA, содержащие (72,7±9,9)% виментин-положительных и (81,8±2,5)% GFAP-положительных клеток, вводили стандартно в правую височную область головного мозга мышей-реципиентов линии C57BL/6 в количестве 1×10^6 клеток на животное. Части животных-реципиентов аллогенных НКП проводили иммуносупрессию сандиммуном в количестве 100 мкг на животное на 0-е, 3-е, 6-е сут эксперимента. Через 24 ч, 6, 12, 18 и 37 сут после внутримозговой нейротрансплантации НКП готовили стандартные гистоло-

гические препараты головного мозга экспериментальных животных, которые исследовали на цитонализаторе изображения “IBAS” (Германия). После внутримозгового введения суспензии аллогенных фетальных НКП наблюдались признаки перичелюлярного отека и лимфоцитарная инфильтрация в прилегающих участках мозга на 12–18-е сут, уменьшающиеся до 37-х сут. Аллогенные фетальные НКП сохранялись до 18-х сут наблюдения и выявляли признаки начальной дифференцировки. В условиях иммуносупрессии сандиммуном наблюдалась фенотипическая дифференцировка НКП, а также признаки их инфильтрации в смежные отделы мозга. На 37-е сутки имплантированные НКП не выявлялись. Реактивные изменения глиального компонента мозга на имплантированные НКП уменьшались быстрее после нейроимплантации сингенных НКП (до 18-х сут), чем при нейроимплантации аллогенных НКП (до 37-х сут). При введении сингенных НКП на 37-е сут в участке имплантации зафиксировано образование небольшого фрагмента незрелой костной ткани, что может свидетельствовать о возможности трансдифференцировки НКП в другие клеточные типы.

Ключевые слова: сингенные и аллогенные фетальные прогениторные нейроклетки, нейротрансплантация, сандиммун.

L.D. Liubych, V.M. Semenova, N.I. Lisyany

THE COMPARATIVE PATHOMORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE MICE-RECIPIENT'S BRAIN CELL-TISSUE REACTIONS BY THE INTRACEREBRAL IMLANTATION OF SYNGENEIC AND ALLOGENEIC NEUROCELLS

The aim of the study was to compare the mice-recipient's brain tissue cell-structural reactions in response to intracerebral implantation of syngeneic and allogeneic cell suspensions of neural progenitor cells (NPC) (E13-15). The NPC suspensions from mice-donors of C57BL/6 and CBA containing 72,7±9,9% Vimentin+ and 81,8±2,5% GFAP+ cells were inoculated by standard procedure in right temporal segment of cerebral hemisphere of mice-recipient C57BL/6 (1×10^6 cells per animal). The certain part of mice-recipient of allogeneic NPC were immunosuppressed by Sandimmune (100 mkg per animal) on day 0, 3, 6 after neurotransplantation. The standard histological preparations of mice brains were performed after 24 hours, 6, 12, 18 and 37 days after NPC neurotransplantation, which were investigated by cytoanalyzer “IBAS”(Germany). After intracerebral inoculation of allogeneic foetal NPC the signs of the pericellular edema and lymphocyte infiltration were detected in adjacent brain sections on day 12-18 and decreased on day 37. Allogeneic foetal NPC were reserved till day 18 and revealed the signs of primary differentiation. After immunosuppression by “Sandimmune” the foetal NPC underwent the phenotypic differentiation and infiltration in related brain sections. On the day 37 the implanted NPC were not detected. Focal reaction

of the brain glial component to implanted NPC declined faster after syngeneic NPC neuroimplantation (up to day 18) than after allogeneic NPC neuroimplantation (up to day 37). After the syngeneic NPC inoculation on the 37th day at the site of implantation the formation of a small fragment of immature bone was fixed, which may indicate the possibility of NPC transdifferentiation in other cell types.

Key words: syngeneic and allogeneic foetal neural progenitor cells, neurotransplantation, Sandimmune.

SI "Acad.A.P.Romodanov Institute of Neurosurgery National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Гордеева О.Ф. Технологии оценки биобезопасности фармакологических веществ и клеточных технологий с использованием моделей плюрипотентных стволовых клеток. – В кн.: Клеточные технологии для регенеративной медицины / Под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой, А.М. Кольцовой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – С.44–61.
- Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Любич Л.Д., Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Бабийчук Г.А. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроцитов эмбрионов человека // Укр. нейрохірург. журн. – 2003. – № 2. – С.11–14.
- Лисяний М.І., Любич Л.Д. Особливості розвитку імунної відповіді на внутрішньомозкове введення аlogenних фетальних нейроклітин в експерименті // Імунологія та алергологія. – 2009. – №4. – С.99–109.
- Цимбалюк В.І., Медведєв В.В. Генеалогія, ідентифікація та клінічне використання нейрональних стовбурових прогеніторів // Укр. нейрохірург. журн. – 2003. – № 4. – С.8–13.
- Цупиков О.М., Півнева Т.А., Поддубна А.О., Кирик В.М., Кучук О.В., Бутенко Г.М., Скибо Г.Г. Міграція та диференціація трансплантованих фетальних нейрогенних клітин у мозку ішемізованих тварин // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №4. – С.42–49.
- Almazryn G., Vela J.M., Molina-Holdado E., Guaza C. Re-evaluation of nestin as a marker of oligodendrocyte lineage cells // Microsc.Res.Tech. – 2001. – 52(6). – P.753–65.
- Carney B.J., Shah K. Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models // Neuroscienc. – 2011. – 197, №1. – P.37–47.
- Chen Z., Palmer T.D. Cellular repair of CNS disorders: an immunological perspective // Hum.Mol.Genet. – 2008. – 17. – P.84–92.
- Engelhardt B. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system // Curr Pharm Des. – 2008. – 14(16). – P.1555–1565.
- Ideguchi M., Shinoyama M., Gomi M., Hayashi H., Hashimoto N., Takahashi J. Immune or inflammatory response by the host brain suppresses neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells // J. Neurosci. Res. – 2008. – 86(9). – P.1936–1943.
- Kim D.E., Tsuji K., Kim Y.R., Mueller F.J., Eom H.S., Snyder E.Y., Lo E.H., Weissleder R., Schellingerhout D. Neural stem cell transplant survival in brains of mice: assessing the effect of immunity and ischemia by using real-time bioluminescent imaging // Radiology. – 2006. – 241(3). – P.822–830.
- Krystkowiak P., Gaura V., Labalette M., Rialland A., Remy P., Peschanski M., Bachoud-Lévi A.C. Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease // PLoS ONE. – 2007. – 2(1). – P.166.
- Lepore A.C., Neuhuber B., Connors T.M., Han S.S., Liu Y., Daniels M.P., Rao M.S., Fischer I. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS // Neuroscience. – 2006. – 142(1). – P.287–304.
- Molcanyi M., Riess P., Bentz K., Maegele M., Hescheler J., Schäfer B., Trapp T., Neugebauer E., Klug N., Schäfer U. Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain // J. Neurotrauma. – 2007. – 24(4). – P.625–637.
- Preynat-Seauve O., de Rham C., Tirefort D., Ferrari-Lacraz S., Krause K.H., Villard J. Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogeneic T and natural killer cells // J.Cell Mol.Med. – 2009. – 13(9B). – P.3556–3569.
- Sen S.K., Lowe J.B.3rd, Brenner M.J., Hunter D.A., Mackinnon S.E. Assessment of the immune response to dose of nerve allografts // Plast.Reconstr.Surg. – 2005. – 115(3). – P.823–830.
- Sundberg M., Andersson P., Akesson E., Odeberg J., Holmberg L., Inzunza J., Falci S., Öhman J., Suuronen R., Skottman H., Lehtimäki K., Hovatta O., Narkilahti S., Sundström E. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue // Cell Transplant. – 2011. – 20. – P.177–191.
- Trumble T., Gunlikson R., Parvin D. A comparison of immune response to nerve and skin allografts // J. Reconstr. Microsurg. – 1993. – 9(5). – P.367–372.
- Ubiali F., Nava S., Nessi V., Frigerio S., Parati E., Bernasconi P., Mantegazza R., Baggi F. Alloreognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation // Int. Immunol. – 2007. – 19(9). – P.1063–1074.
- Wang X.J., Liu W.G., Zhang Y.H., Lu G.Q., Chen S.D. Effect of transplantation of c17.2 cells transfected with interleukin-10 gene on intracerebral immune response in rat model of Parkinson's disease // Neurosci.Lett. – 2007. – 423(2). – P.95–99.

ДУ "Ін-т нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ
E-mail: Liubichld@mail.ru

Матеріал надійшов
до редакції 11.03.2013

Р.І. Янчій, О.М.Калейнікова, Т.Ю.Вознесенська, Т.В.Блашків, Ю.П. Бідзіля

Скоротливість міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій

Досліджено особливості скоротливості міометрія миші в експериментальних умовах змін функціонального стану мітохондрій, а також аргінази II і NO-синтази. Встановлено, що скоротлива активність міометрія миші детермінується функціональним станом мітохондрій. Аспартатні мітохондріальні переносники є NO-залежними, але не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер. У їх роботі активно бере участь мітохондріальний мембранний потенціал та неспецифічна провідність мітохондрій.

Ключові слова: міометрій, амплітуда скорочень міометрія, мітохондріальні переносники.

ВСТУП

Відомо, що скоротлива активність міометрія матки важлива як для транспорту гамет, так і для імплантації та розвитку ембріонів. Порушення функціонування міометрія (дискоординація, пригнічення чи посилення скорочень) визнається як важлива клінічна проблема, зокрема протягом вагітності та під час пологів [8, 19]. Вважають, що скоротливість гладеньких м'язів і матки зокрема залежить від функціонування іонно-транспортних та ферментативних систем клітинних органел тощо [12, 16]. На сьогодні особливості скоротливості міометрія в умовах зміни функціонального стану мітохондрій не досліджено.

Представлені в літературі значення скоротливості міометрія матки відрізняються, що пов'язане як з різноманітністю методик, так і умов проведення дослідів. Для вирішення проблеми уніфікації отриманих даних дослідження міометрія, запропоновано використовувати індекс скоротливості [добуток амплітуди скорочення (F_{max}) та відношення швидкості скорочення до швидкості розслаблення (CV_{max}/RV_{max}), мН], як інтегральний показник, що дає змогу адекватно оцінювати скоротливу активність міометрія незалежно від співвідношення

скоротливої та сполучної тканини в межах смужки [9]. Раніше нами було показано, що у мишей на 4–5-ту добу гестації зменшується, а на 10–11-ту добу збільшується індекс скоротливості [3]. Амплітуда скорочення, як важлива складова в розрахунку індексу скоротливості, при оцінці токолітичних та уротонічних ефектів різноманітних речовин на міометрій потребує подальшого детального вивчення. В літературі є дані досліджень часових, або темпоральних, особливостей пермабілізованих волокон скелетних м'язів [11, 12, 16, 17]. Однак відсутні дані про зміну у часі амплітуди скорочень смужки міометрія миші в експериментальних умовах порушення функціонального стану мітохондрій.

Метою нашої роботи було дослідження амплітуди скорочень ізольованих смужок міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій (інгібування кальцієвого уніпортера і аспартатного мітохондріального переносника, активація мітохондріальних пор, а також інгібування аргінази II та NO-синтази).

МЕТОДИКА

Для аналізу, оцінки та характеристики механічної активності смужки міометрія застосо-

ували метод фазно-графічного аналізу [9]. Амплітуда скорочення – це один з показників скоротливої активності міометрія.

Дослідження проведені на невагітних (8 тиж, 16–18 г) самицях мишей лінії СВА з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). В день експерименту видаляли матку і поміщали в розчин Кребса (4 °С). Для реєстрації сили спонтанних, ізометричних скорочень смужки міометрія вирізали вздовж із рогів матки під мікроскопом МБС-10 (довжиною до 10 мм і шириною не більше ніж 1 мм) переносили в камеру, фіксували і з'єднували із консолю механоелектричного перетворювача сили в електричний сигнал. Камеру перфузували розчином Кребса. Силу ізометричних скорочень реєстрували за допомогою швидкодіючого самописця Н3021-3. Рівномірність перфузії препарату омиваючими розчинами забезпечувалася перистальтичним насосом НП-1М. Здійснювали термостатування розчинів в експериментальній плексигласовій камері. У дослідах використовували розчин Кребса (ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5. Блокатор кальцієвого уніпортеру (RuR), який додавали до розчину Кребса, отримуючи розчин з кінцевою концентрацією діючої речовини 1 мкмоль/л; інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (FCCP) з кінцевою концентрацією діючої речовини 4 мкмоль/л; інгібітор аспартатного мітохондріального переносника піридоксал-5'-фосфат (інгібітор аспаратамінотрансферази) – (PPT; 30 мкмоль/л); неспецифічний блокатор NO-синтаз (L-NAME; 0,1 ммоль/л); специфічний блокатор аргіназ (L-норвалін; 50 мкмоль/л); інгібітор відкривання мітохондріальних пор (циклоспорин А; 15 ммоль/л). Усі препарати були фірми «Sigma» (США).

Для статистичної обробки результатів використовували пакет програм Origin 8Pro (OriginLab Corp., North., MA, USA) та Excel.

Достовірність різниці середніх значень визначали за критерієм *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в умовах дії PPT амплітуда скорочення зменшувалася на 4-й хвилині до $19,85 \pm 1,67$ мН, з 8-ї до 20-ї хвилини вона була від $18,96 \pm 1,24$ до $17,84 \pm 1,64$ мН ($P < 0,01$) порівняно з контролем ($22,31 \pm 1,98$ мН). При дії RuR на 4-й хвилині цей показник не вірогідно зростав ($23,65 \pm 2,10$ мН), тоді як на 8-й хвилині він зменшувався і на 20-й хвилині становив $18,07 \pm 1,29$ і $16,95 \pm 2,01$ мН відповідно ($P < 0,05$).

У разі сумісної дії PPT і RuR амплітуда скорочень з 2-ї по 8-му хвилину зменшувалася з $19,18 \pm 1,24$ до $17,72 \pm 1,68$ мН порівняно з контролем ($P < 0,01$), тоді як з 10-ї по 20-ту хвилини вона становила $14,05 \pm 1,78$ мН.

Показано, що в умовах комплексної дії PPT та FCCP (рис. 1) амплітуда зменшувалася ($P < 0,01$) на 4-й та 6-й хвилинах і становила $16,27 \pm 1,37$ та $6,91 \pm 1,19$ мН відповідно порівняно із контрольним значенням, проте вірогідно не відрізнялася від дії самого FCCP. З 8-ї по 20-ту хвилину цей показник зменшувався ($P < 0,001$) від $2,23 \pm 0,94$ до $1,56 \pm 0,54$ мН. Преінкубація із циклоспорином А, в умовах сумісної дії PPT та FCCP, зменшувала амплітуду ($P < 0,01$) на 4-й та 6-й хвилинах ($13,82 \pm 1,17$ та $5,80 \pm 1,14$ мН відповідно). З 8-ї по 20-ту хвилини цей показник зменшувався ($P < 0,001$) від $2,01 \pm 0,58$ до $1,33 \pm 0,52$ мН.

В умовах дії L-NAME амплітуда збільшувалася ($P < 0,05$) від 6-ї до 20-ї хвилини і становила від $26,10 \pm 1,94$ до $26,55 \pm 1,72$ мН. При дії L-норваліну вона зменшувалася ($P < 0,01$) починаючи з 6-ї хвилини і 20-ї – від $17,84 \pm 1,64$ до $16,95 \pm 1,81$ мН. У разі сумісного впливу L-NAME та L-норваліну амплітуда вірогідно не відрізнялася від контрольних значень. Встановлено, що в умовах дії PPT і L-норваліну (рис. 2) вона зменшувалася на 26 % з 4-ї до 20-ту хвилини.

Отже, нами досліджено особливості

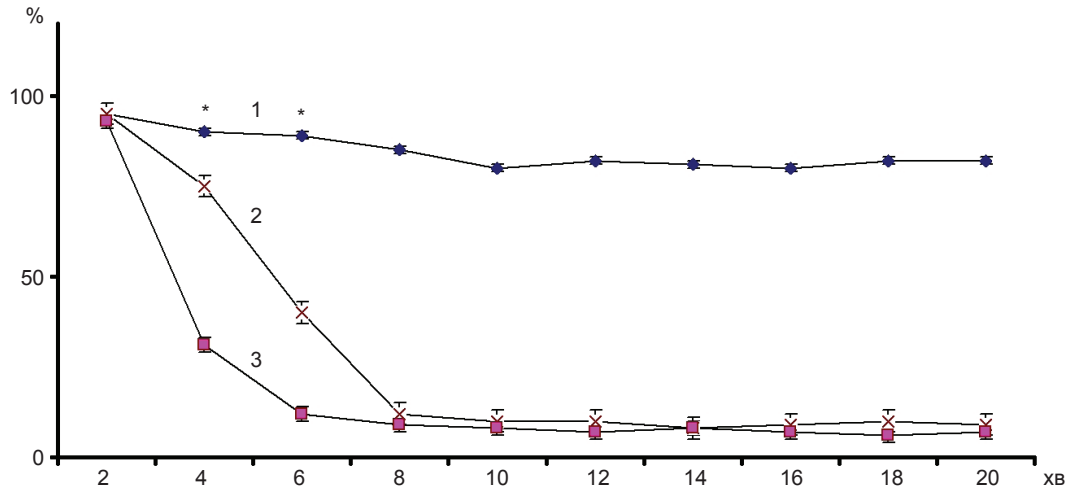


Рис. 1. Зміни в часі амплітуди скорочень міометрія в умовах впливу інгібіторів мітохондріальних переносників та мітохондріального мембранного потенціалу. За віссю абсцисс – часові проміжки (хв), за віссю ординат – амплітуда скорочень міометрія (% відносно контрольних): 1 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT); 2 – інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (FCCP); 3 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника та інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (PPT і FCCP). *P<0,01 - вірогідність відмінностей відносно контролю

скоротливості міометрія миші в умовах дії інгібітора мітохондріальних переносників, активатора мітохондріальних пор, інгібіторів кальцієвого уніпортеру, аргінази і NO-синтаз.

Відомо, що мітохондрії модулюють кальцієві сигнали [7], а кальцій надходить у

мітохондрії залежно від значення їхнього мембранного потенціалу через кальцієвий уніпортер. Захоплення субстрату може активізуватися за допомогою механізму, що не вимагає входу Ca^{2+} у мітохондрії, але пов'язаний з активністю кальційзалежних мітохондріальних переносників [15].

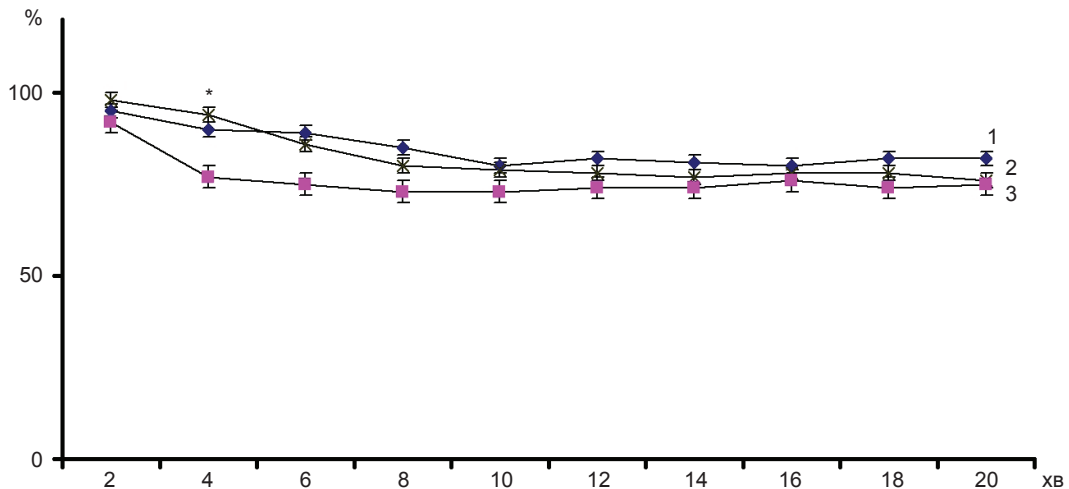


Рис. 2. Динаміка в часі амплітуди скорочень міометрія в умовах впливу інгібіторів мітохондріальних переносників мітохондріальної аргінази. За віссю абсцисс – часові проміжки (хв), за віссю ординат – амплітуда скорочень міометрія (% відносно контрольних): 1 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT); 2 – L-норвалін; 3 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT) і L-норвалін. *P<0,01 – вірогідність відмінностей відносно контролю

Активно вивчають малат-аспартатні мітохондріальні переносники в мозку людини [13], печінки мишей [20], серці щурів [14]. Встановлено, що їх функціонування регулюється кальцієм [4]. Раніше було показано вплив різних інгібіторів мітохондріальних переносників на здатність ооцитів мишей до мейотичного дозрівання [1, 2]. Досліджено зразки міометрія людини на кінець вагітності [18].

Наші результати стосовно амплітуди скорочень міометрія миші дають підстави сформулювати наступні твердження: 1) функціональний стан міометрія залежить від роботи аспартатного мітохондріального переносника; 2) мітохондріальні переносники, мабуть, не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер, але діють залежно від мітохондріального мембранного потенціалу та неспецифічної провідності (мітохондріальних пор); 3) мітохондріальні переносники, ймовірно, є NO-залежними (від аргіназного шляху його утворення).

Відомо, що оксид азота (NO) наявний у багатьох тканинах. Це важливий між- та внутрішньоклітинний посередник, задіяний у регуляції численних фізіологічних процесів. Показано, що оваріальні гормони можуть регулювати експресію ізоформ NO-синтаз (ендотеліальної та індукцибельної) в матці мишей протягом їх естрального циклу [21]. Експресія білка аргінази II (мітохондріальної) значно знижена під час ранніх строків вагітності й поступово зростає до кінця строку і після пологів [10]. Відомо, що NO-синтази конкурують з аргіназами за L-аргінін, а гідрокси-L-аргінін, як проміжна ланка у виробництві NO з L-аргініну, є потужним інгібітором аргінази [6], тому положення про те, що виробництво NO переважно залежить від L-аргініну, доступного для NO-синтази, тоді як аргіназний шлях це ендогенна негативно керуюча ланка регуляції загального виробництва NO. Все це вище сказане - для міометрія миші потребує уточнення.

Таким чином, досліджено особливості скоротливості міометрія миші в експериментальних умовах змін функціонального стану

мітохондрій та аргінази II і NO-синтази. Встановлено, що скоротлива активність міометрія миші детермінується функціональним станом мітохондрій. Аспартатні мітохондріальні переносники є NO-залежними, але не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер. У їх роботі бере активну участь мітохондріальний мембранний потенціал та неспецифічна провідність мітохондрій.

**Р.И. Янчий, О.Н.Калейникова,
Т.Ю.Вознесенская, Т.В.Блашків, Ю.П. Бидзиля**

СОКРАЩЕНИЕ МИОМЕТРИЯ МЫШИ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Исследованы особенности сокращения миометрия мыши в экспериментальных условиях изменения функционального состояния митохондрий: фармакологическое ингибирование кальциевого унипортера и аспартатного митохондриального переносчика, активация митохондриальных пор, а также ингибирование аргиназы II и NO-синтазы. Показано, что сокращение миометрия зависит от функционирования аспартатного митохондриального переносчика, сами переносчики не зависят от входа Ca^{2+} через унипортер. Однако в их работе принимают участие митохондриальный мембранный потенциал и поры неспецифической проводимости. Митохондриальные переносчики - NO-зависимы.

Ключевые слова: миометрий, амплитуда сокращений миометрия, митохондриальные переносчики.

**R.I. Yanchiy, O.N.Kalejnikova,
T.Yu.Voznesenskaya, T.V.Blashkiv, Yu.P. Bidzilya**

MICE MYOMETRIAL CONTRACTIVITY FEATURES IN CONDITIONS OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONAL CHANGES

It has been investigated the temporal amplitude features of mice myometrium in conditions of action mitochondrial carriers inhibitor, the mitochondrial pore activator, calcium uniporters inhibitor. For the first time it is established that the functional condition of myometrium depends on a mitochondrial carriers functioning; the mitochondrial carrier is NO-dependent itself (on arginase way of its formation); the carrier functions depending on mitochondrial membrane potential and mitochondrion nonspecific conductivity (mitochondrial pores).

Key words: miometrium, amplitude of contraction, mitochondrial carriers.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю. Митохондриальні переносники і мейотичне дозрівання у мишей // Проблеми репродукції. – 2006. – №6. – С. 35–38.
2. Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю., Шепель А.Н., Янчій Р.І. Експериментальна митохондриальна дисфункція в ооцитах мишей // Там же. – 2008. – №1. – С. 13–17.
3. Сердюк О.М., Бідзіля Ю.П., Янчій Р.І. Фазно-графічний аналіз скоротливості міометрію миші в умовах гестації // Перспективи медицини і біології. – 2010. – №2. – С. 34–39.
4. Casimir M., Rubi B., Frigerio F., Chaffard G., Maechler P. Silencing of the mitochondrial NADH shuttle component aspartate-glutamate carrier AGC1/Aralar1 in INS-1E cells and rat islets // Biochem. J. – 2009. – 424(3). – P. 459–466.
5. Contreras L., Satrustegui J. Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways // J. Biol. Chem. – 2009. – 284(11). – P. 7091–7099.
6. Daghigh F., Fukuto J., Ash D. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – 202(1). – P.174–180.
7. Dumollard R., Duchon M., Sartet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation // Semin. Cell Dev. Biol. – 2006. – 17(2). – P. 314–323.
8. Fanchin R., Ayoubi J.M. Uterine dynamics: impact on the human reproduction process // Reprod Biomed Online. – 2009. – 18(2). – P. 57–62.
9. Gullam J., Blanks A., Thornton S., Shmygol A. Phase-plot analysis of the oxytocin effect on human myometrial contractility // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – 144(1). – P. 20–24.
10. Hirata M., Obayashi S., Sakamoto S., Aso T., Imamura M., Azuma H. Involvement of arginase in regulating myometrial contractions during gestation in the rat // Mol. Hum. Reprod. – 2006. – 12(8). – P. 513–518.
11. Isaeva E., Shirokova N. Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres // J. Physiol. – 2003. – 547(2). – P. 453–462.
12. Isaeva E., Shkryl V., Shirokova N. Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle // Ibid. – 2005. – 565(3). – P. 855–872.
13. Palmieri L., Papaleo V., Porcelli V., Scarcia P., Gaita L., Sacco R., Hager J., Rousseau F., Curatolo P., Manzi B., Militerni R., Bravaccio C., Trillo S., Schneider C., Melmed R., Elia M., Lenti C., Saccani M., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K.L., Persico A.M. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 // Mol. Psychiatry. – 2010. – 15(1). – P. 38–52.
14. Ralphe J., Bedell K., Segar J., Scholz T. Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and EAAT1 protein expression in hyper- and hypothyroidism // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – 288(5). – P. 2521–2526.
15. Satrustegui J., Contreras L., Ramos M. Role of aralar, the mitochondrial transporter of aspartate- glutamate, in brain N-Acetylaspartate formation and Ca(2+) signaling in neuronal mitochondria // J. Neurosci. Res. – 2007. – 85(15). – P. 3359–3366.
16. Shkryl V., Martins A., Ullrich N., Nowycky M.C., Niggli E., Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers // Pflugers. Arch. – 2009. – 458(5). – P. 915–928.
17. Shkryl V., Shirokova N. Transfer and tunneling of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle // J. Biol. Chem. – 2006. – 281(3). – P. 1547–1554.
18. Shynlova O., Tsui P., Jaffer S., Lye S. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – 144(1). – P. 2–10.
19. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – 18(3). – P. 315–320.
20. Wu J.L., Wu Q.P., Huang J.M., Chen R., Cai M., Tan J.B. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice // Physiol. Res. – 2007. – 56(2). – P. 213–220.
21. Zhang X., Lin H.Y., Liu G.Y., Wang H.M., Li Q.L., Zhu C. Expressions and regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthases in mouse uterus during the estrous cycle and early pregnancy // Front. Biosci. – 2005. – 1(10). – P. 3172–3282.

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

Матеріал надійшов
до редакції 21.01.2013

О.Ю. Андрєєва, О.О. Солдатов

Функціональна морфологія ядерних еритроцитів в умовах гіпоксії (експерименти *in vitro*)

Досліджено зміни морфофункціональних характеристик ядерних еритроцитів в умовах експериментальної гіпоксії *in vitro*. Показано, що при концентрації кисню в інкубаційному середовищі в діапазоні $1,76\text{--}4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ об'єм еритроцитів та їхніх ядер зменшується на 1,5–5,0 і 9–15 % відповідно. В умовах глибокої гіпоксії ($0,57\text{--}1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) ці показники, навпаки, вірогідно збільшуються при збереженні ядерно-плазматичного відношення. При цьому еритроцити набувають форми подальшого еліпса за рахунок збільшення довжини великої осі клітини (C_1) і товщини (h). При екстремальній гіпоксії ($0,57\text{--}1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) поряд зі збільшенням об'єму ядра еритроцитів посилюються флуоресценція SYBR Green I, інтенсивність якої корелює з показниками об'єму цієї структури ($R^2 = 0,81$).

Ключові слова: гіпоксія, експерименти *in vitro*, ядерні еритроцити, морфологія клітини, цитометрія.

ВСТУП

Ядерні еритроцити нижчих хребетних – зручний об'єкт для проведення досліджень у галузі клітинної фізіології. В них виявлені мітохондрії, ферменти циклу Кребса [8, 21], що робить їх функціонально ближчими до клітин соматичних тканин.

Особливий інтерес представляють процеси регуляції клітинного об'єму в умовах зовнішнього дефіциту кисню. Було показано, що еритроцити риб, які є толерантними до гіпоксії, здатні до збалансованого пригнічення мембранних і метаболічних функцій [1]. При цьому спостерігаються закономірні морфологічні зміни клітин [1] і підвищується їх здатність до деформації [11]. У більшості робіт констатується факт зростання клітинного об'єму [10, 17, 28]. Процес контролюється катехоламінами (переважно норадреналіном) [20, 25], що взаємодіють з поверхневими β -адренорецепторами еритроцитів [15, 22] і активують $\text{Na}^+\text{--H}^+$ і $\text{HCO}_3^-\text{--Cl}^-$ -антипорти клітин [17, 29]. Дія катехоламінів опосередковується через циклічний аденозинмонофосфат [11]. Загальне призначення процесу

© О.Ю. Андрєєва, О.О. Солдатов

– контроль значення внутрішньоклітинного рН і показників спорідненості гемоглобіну до кисню. Вважається, що ця послідовність реакцій має адаптивне значення і може бути реалізована тільки на системному рівні. Участь ізольованих клітинних систем в цих процесах без регульованих впливів вивчена вкрай слабо.

Мета нашої роботи – дослідити вплив гіпоксії на морфофункціональні та цитометричні характеристики ядерних еритроцитів в умовах *in vitro*.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були еритроцити *Scorpaena porcus* L. Кров отримували з хвостової артерії скорпени. Як антикоагулянт застосовували гепарин («Richter», Угорщина). Еритроцити відділяли від плазми за допомогою центрифугування при 1000 g протягом 15 хв і тричі відмивали в еквівалентному об'ємі ізотонічного розчину (ммоль/л): NaCl – 128, KCl – 3, CaCl₂ – 1,5, MgCl₂ – 1,5, тріс – 15, D-глюкози – 2,2 (рН 7,8) [26].

Інкубація еритроцитів у гіпоксичному середовищі тривала 4 год при 14–16 °С. Зни-

ження концентрації кисню досягалося барботажем ізотонічного розчину газоподібним нітрогеном. Досліджували концентраційний діапазон $0,57-8,17 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$. Інкубацію клітин проводили в герметичних вакуумних пробірках «Vacuette» («Greiner Bio-One GmbH», Німеччина).

Після закінчення експозиції ядра еритроцитів протягом 20 хв фарбували вітальним барвником SYBR Green I (Molecular probes), який, зв'язуючись з дволанцюговою молекулою ДНК, флуоресціював зеленим кольором у видимій частині спектра.

Еритроцити фотографували за допомогою камери Ikegami ICD-848P на інвертованому мікроскопі Nikon Eclipse TS100 для світлого поля та флуоресценції в світловому (світле і темне поле) та люмінесцентному режимах (набір світлофільтрів для збудження SYBR Green I у синій зоні спектра). Паралельно оцінювали інтенсивність флуоресценції SYBR Green I на проточному цитофлуориметрі Cytomics FC-500.

Значення великої та малої осей клітин та їх ядер вимірювали на цифрових фотографіях у програмі ImageJ 1.44р [12]. Об'єм клітин (V_c) розраховували за рівнянням [13] з урахуванням об'єму ядра (V_n) [4]:

$$V_c = 0.7012 \times \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right)^2 \times h + V_n,$$

$$V_n = \frac{\pi \times N_1 \times N_2^2}{6},$$

де: C_1 – довжина великої осі клітини, C_2 – довжина малої осі клітини, h – товщина клітини ($h = 1.8 + 0.0915 \times (C_1 - 7.5)$) [5], N_1 – довжина великої осі ядра, N_2 – довжина малої осі ядра.

Вимірювали 100 клітин на одну пробу. Нормальність розподілу цифрових масивів перевіряли, використовуючи критерій Пірсона. Вірогідність відзнак оцінювали за допомогою критерію t Ст'юдента. Результати представлені у вигляді $\bar{x} \pm S_x$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При зниженні концентрації кисню в інкубаційному середовищі в діапазоні $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ відзначали зменшення об'єму еритроцитів на $1,5-5,0 \%$. При $1,76$ і $2,14 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ відмінності були статистичними (рис. 1). Зниження вмісту кисню в діапазоні $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ викликало протилежну реакцію. Об'єм клітин червоної крові зростав на $3-12 \%$. У чотирьох випадках (при $1,07$; $1,23$; $1,50$; $1,73 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) зміни були статистично значимі (див. рис. 1).

Ядерні еритроцити мають еліпсоїдну форму. Об'єм клітин залежить від зміни їх значень: C_1 , C_2 , h . Оцінка корелятивних зв'язків показала, що ці величини змінюються незалежно одна від одної (коефіцієнт $R^2 = 0,003-0,006$). Це означає, що кожна з них може робити свій внесок у зміну об'єму клітин.

Об'єм клітини зростав переважно внаслідок зміни C_1 і h . Про це свідчать більш високі значення R^2 ($0,51-0,76$) порівняно з C_2 ($0,10-0,32$; рис.2). Це означає, що в умовах гіпоксії еритроцити набувають форми подовженого еліпса, що підтверджується світловою мікроскопією.

В умовах гіпоксії об'єм ядра еритроцитів фактично змінювався пропорційно об'єму клітини (рис. 3,а). За умов вмісту кисню в інкубаційному середовищі в концентраційному діапазоні $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ у двох випадках (при $2,14$ і $4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) відзначали зменшення значень цього показника на $9-15 \%$. Лише в одному разі при $3,58 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ спостерігали зростання на 8% . При низькій концентрації кисню (діапазон $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) зміни були більш однозначні. В 5 з 6 випадків об'єм ядра збільшувався на $7-21 \%$.

Результати кореляційного аналізу свідчать про пропорційність змін значень V_n і V_c (див. рис. 3,б). Відсутність вірогідних змін ядерно-плазматичного відношення в контрольних і дослідних серіях також відображає цей зв'язок.

За умов низьких концентрацій кисню в інкубаційному середовищі (діапазон $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) істотно підвищувалася інтенсив-

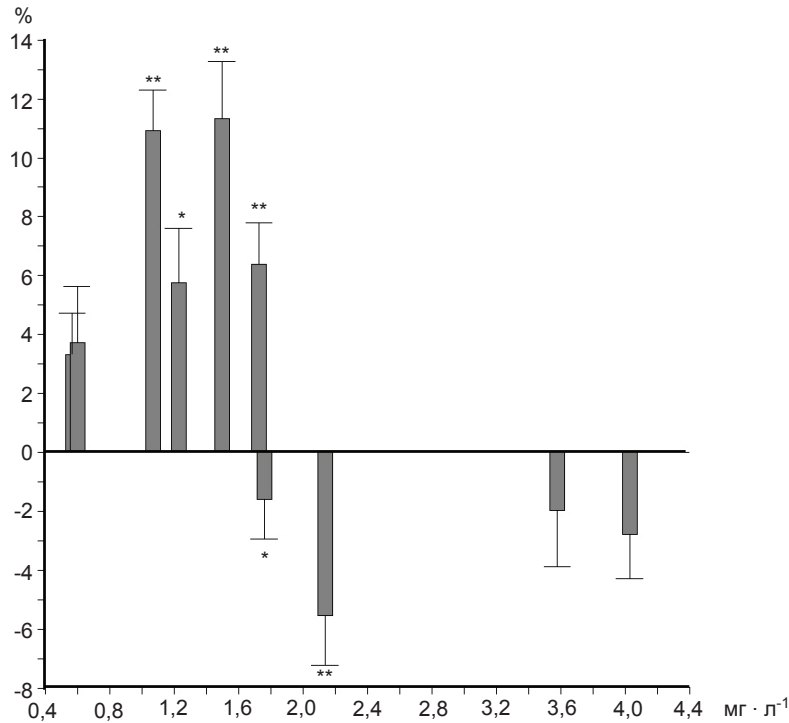


Рис. 1. Зміни об'єму ядерних еритроцитів в умовах експериментальної гіпоксії. За віссю абсцис – концентрація кисню, за віссю ординат – об'єм клітин. *P<0,05; **P<0,02

ність флуоресценції SYBR Green I в ядерних структурах. Максимуми розподілів зсувалися вправо (рис. 4). При цьому простежувався пропорційний зв'язок між об'ємом ядра та інтенсивністю флуоресценції (рис. 5).

Інформація про зменшення об'єму клітин червоної крові риб в умовах нестачі кисню

вкрай обмежена. Подібна зміна показників об'ємів еритроцитів *Scorpaena rogeus* L. була описана в умовах короткочасної гіпоксії (90 хв, *in vivo*) [3]. Разом з цим механізми, які можуть лежати в основі цієї реакції клітин, цілком реальні. Відомо, що регуляторне зменшення об'єму еритроцитів може відбуватися

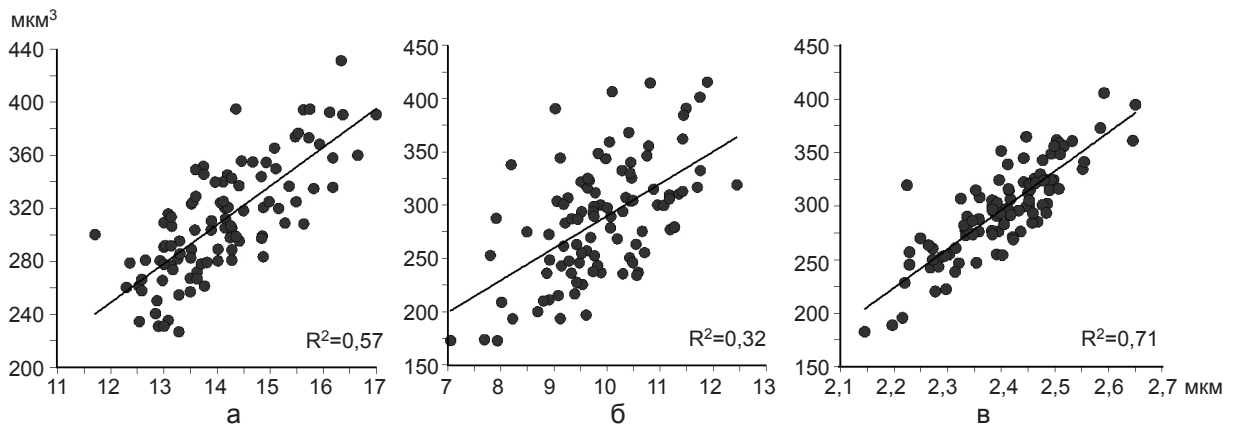


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між лінійними та об'ємними характеристиками ядерних еритроцитів. За віссю абсцис: а – довжина великої осі клітини, б – довжина малої осі клітини, в – товщина клітини; за віссю ординат – об'єм клітин

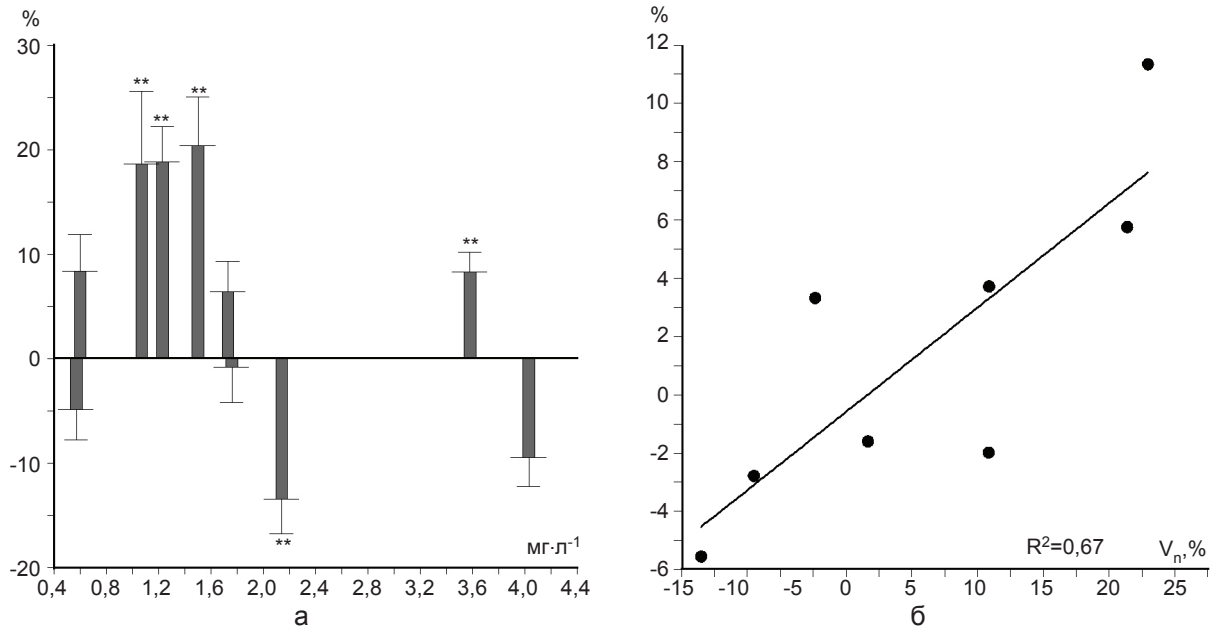


Рис. 3. Зміни об'єму ядер еритроцитів в умовах експериментальної гіпоксії та оцінка кореляційного зв'язку між об'ємом клітин (V_c) і об'ємом ядра (V_n): а – зміни об'єму ядер при дефіциті кисню. За віссю абсцис – концентрація кисню, за віссю ординат – об'єм ядра (відносно контролю); б – кореляційний зв'язок між значеннями V_c і V_n . За віссю абсцис – об'єм ядра (відносно контролю), за віссю ординат – об'єм клітин (відносно контролю).** $P < 0,02$

завдяки діяльності K^+Cl^- котранспортера, а також через вихід із клітини органічних осмолітів [16]. Серед можливих шляхів активації каналу найбільш ймовірним є незначне зниження рН внутрішньоклітинного середовища (до 7,0), яке може бути наслідком активації анаеробних процесів і збільшення внутрішньоклітинної концентрації лактату [6]. Відомо, що ядерні еритроцити нижчих хребетних

здатні за несприятливих умов переходити на анаеробні режими функціонування [27]. Випадки внутрішньоклітинного ацидозу в умовах гіпоксії були зареєстровані для багатьох видів кісткових риб [13, 23].

Зростання об'єму еритроцитів – більш поширена та описана реакція клітин червоної крові риб [18]. Набухання еритроцитів за умов гіпоксії відбувається внаслідок

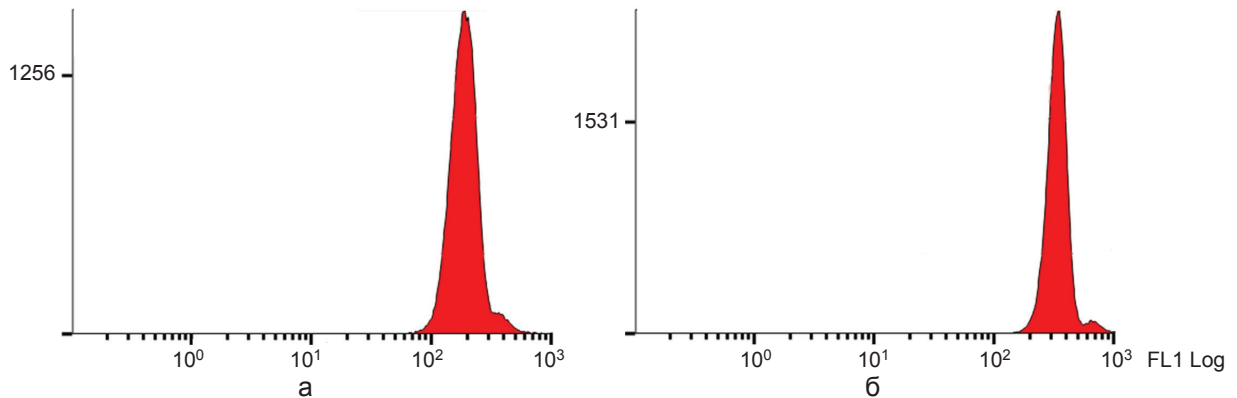


Рис. 4. Інтенсивність флуоресценції SYBR Green I в умовах нормоксії (а) та гіпоксії (б). За віссю абсцис – флуоресценція дволанцюгової ДНК у відносних одиницях на клітину. За віссю ординат – кількість клітин

входу в клітину Na^+ через Na^+-H^+ -антипорт. Найбільш сильним стимулом до активації транспорту є катехоламіни, які потрапляють у кров при зниженні концентрації доступного кисню і вступають у взаємодію з β -адренорецепторами еритроцитів [7]. Проте за умов *in vitro* ця послідовність подій виключена. У дослідженнях [19] показано, що активність Na^+-H^+ -каналу також посилюється при значному зниженні рН цитоплазми еритроцитів і, як наслідок, зростанні спорідненості внутрішнього боку мембрани клітин до H^+ . Слід зазначити, що ацидоз внутрішньоклітинного середовища повинен інгібувати процеси K^+-Cl^- -котранспорту, що також має сприяти гідратації цитоплазми клітини [6]. В умовах екстремальної гіпоксії це припущення цілком допустимо і пояснює послідовність подій, яку спостерігали. Причину збільшення клітинного об'єму можна також вбачати і в активації $\text{HCO}_3^- - \text{Cl}^-$ -антипорта, який допускає надходження в клітину Cl^- в умовах гіпоксії [29].

Розглянуті вище аргументи свідчать, що спостережуване зниження, а потім зростання об'єму еритроцитів *Scorpaena roscus* L. за умов гіпоксії, ймовірно, є наслідком поступового зниження значення рН клітини. Спочатку воно активує K^+-Cl^- -котранспорт, а потім Na^+-H^+ -антипорт. Це є найбільш імовірним механізмом впливу гіпоксії, який реалізується в умовах *in vitro*. В умовах *in vivo* активація K^+-Cl^- -каналу малоімовірна, тому що потрапляння у кров катехоламінів і активація β -адренорецепторів еритроцитів практично відразу запускає Na^+-H^+ -обмін на мембрані клітини.

Як було зазначено вище, гіпоксія чинила істотний вплив й на розміри клітинного ядра. При концентрації кисню в інкубаційному середовищі $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ об'єм цієї структури в деяких випадках підвищувався на 21 % ($P < 0,02$). Подібні ефекти гіпоксії були відзначені раніше в умовах *in vivo* [2]. Збільшення об'єму ядра клітини зазвичай спостерігається при поліплоїдії, гідратації або функціональній активізації структури

(зростання вмісту еухроматину), токсичній дії [4].

Відомо, що проліферативна активність у зрілих ядерних еритроцитів не виражена. Вона втрачається на стадії базофільних нормобластів [24]. Можливі випадки цитокінеза (амітоз), які індукуються гіпоксією [24], але вони не супроводжуються редуплікацією ДНК і, як наслідок, не призводять до поліплоїдії. Про будь-яку токсичну дію на еритроцити в наших експериментах також говорити не доводиться. Навіть якщо вона і спостерігалася, то була адекватною як для дослідних, так і контрольних проб.

Гідратація ядерного матриксу як процес, що визначає зростання об'єму клітинного ядра цілком можлива, якщо врахувати наявність залежності між об'ємами цієї структури і клітини в цілому ($R^2=0,67$). Про це свідчить також сталість ядерно-плазматичного відношення, яка зберігалася протягом усього експерименту.

Разом з тим слід зазначити і достатньо виражений зв'язок між об'ємом ядра та інтенсивністю його флуоресценції при забарвленні SYBR Green I, яка була встановлена в цій

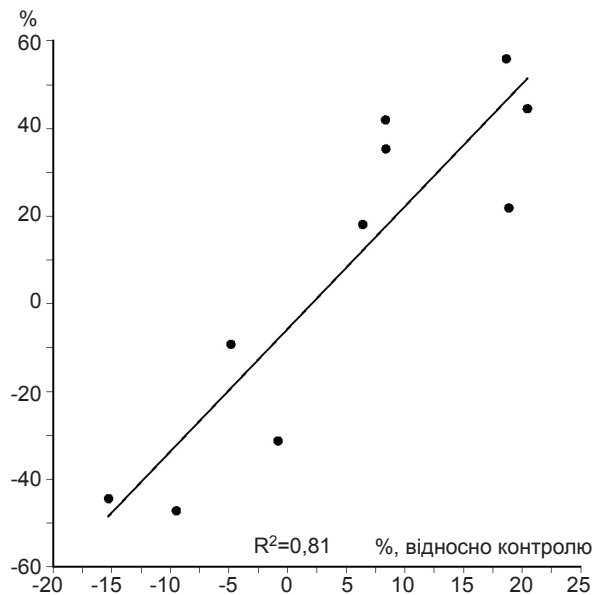


Рис. 5. Аналіз кореляційного зв'язку між інтенсивністю флуоресценції SYBR Green I (вісь ординат) та змінами об'єму ядра зрілих еритроцитів (вісь абсцис)

роботі ($R^2=0,81$). Це дає змогу припустити наявність процесу реактивації цієї структури за умов екстремально низьких концентрацій кисню. Водночас інтерпретація зростання інтенсивності флуоресценції SYBR Green I має певні труднощі, оскільки механізм зв'язування цього флуорохрому з ДНК до кінця не встановлений [30]. Проте наявна інформація дає можливість однозначно говорити про те, що посилення інтенсивності флуоресценції цього барвника практично завжди сполучено зі збільшенням функціональної активності клітин [9].

Таким чином, об'єми еритроцитів та їх ядер в умовах зовнішньої гіпоксії зазнавали послідовних змін. Спочатку (діапазон $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) значення цих показників знижувалися, потім істотно підвищувалися (діапазон $0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) при збереженні ядерно-плазматичного відношення. При цьому клітини набували форми подовженого еліпса, що було зумовлено збільшенням значень C_1 і h . За умов екстремально низьких концентрацій кисню значно підвищувалася інтенсивність флуоресценції SYBR Green I в ядрах клітин, яка корелювала з об'ємом згаданих структур ($R^2=0,81$).

А.Ю. Андреева, А.А. Солдатов

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ (ЭКСПЕРИМЕНТЫ IN VITRO)

Исследованы изменения морфофункциональных характеристик ядерных эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии *in vitro*. Показано, что при концентрации кислорода в инкубационной среде в диапазоне $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ уменьшается объем эритроцитов и их ядер на 1,5–5,0 и 9–15 % соответственно. В условиях глубокой гипоксии ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) оба показателя, напротив, достоверно увеличиваются при сохранении ядерно-плазматического отношения. При этом эритроциты приобретают форму удлиненного эллипса за счет увеличения длин большой оси клетки (C_1) и толщины (h). В нижнем диапазоне концентраций кислорода ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) наряду с возрастанием объема ядра эритроцитов наблюдается усиление флуоресценции SYBR Green I, интенсивность которой коррелировала с показателями объема данной структуры ($R^2 = 0,81$).

Ключевые слова: гипоксия, эксперименты *in vitro*, ядерные эритроциты, морфология клетки, цитометрия.

O. Y. Andrieieva, O. O. Soldatov

FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF NUCLEIC ERYTHROCYTES DURING HYPOXIA (IN VITRO EXPERIMENTS)

Changes in morphologic and functional properties of nucleic erythrocytes were observed during experimental hypoxia *in vitro*. It has been shown that erythrocytes volume and nuclei volume decrease in oxygen concentration of $1,76-4,03 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ on 1,5–5,0 % and 9–15 % respectively. Both indexes increased significantly in case of deep hypoxia ($0,57-1,76 \text{ мгО}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) when nucleo-cytoplasmic ratio doesn't change. By this time erythrocytes shape modifies into extended ellipse because of elongation of large axis of cell (C_1) and its width (h). Along with increase in nuclei volume the enhancement of SYBR Green I fluorescence is observed; the intensity correlates with volume magnitude of this cell structure ($R^2 = 0,81$).

Key words: hypoxia, *in vitro* experiments, nucleated erythrocytes, cell morphology, cytometry.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Новицкая В.Н., Солдатов А.А., Парфенова И.А. Функциональная морфология, сопряжение мембранных и метаболических функций у ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях экспериментальной гипоксии // Доп. НАН України. – 2011. – № 10. – С. 131–136.
2. Парфенова И.А., Солдатов А.А. Функциональная морфология циркулирующих эритроцитов бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии // Морской экол. журн. – 2011. – 10, №2. – С. 59–67.
3. Солдатов А.А., Русинова О.С., Трусевич В.В., Звездина Т. Ф. Влияние гипоксии на биохимические показатели эритроцитов скорпены // Укр. биохим. журн. – 1994. – 66, №5. – С. 115–118.
4. Ташкэ К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. – Бухарест: Изд-во Академии Республики Румынии, 1980. – 291 с.
5. Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – 474 с.
6. Adragna N.C., Di Fulvio M., Lauf P.K. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes // J. Membrane Biol. – 2004. – 201. – P. 109–137.
7. Borgese F., Garcia-Romeu F., Motais R. Control of cell volume and ion transport by β -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* // J. Physiol. – 1987. – 382. – P. 123–144.
8. Boutilier R.G., Ferguson R.A. Nucleated red cell function: metabolism and pH regulation // Can. J. Zool. – 1989. – 67, №12. – P. 2986–2993.

9. Cerca F., Trigo G., Correia A., Cerca N., Azeredo J., Vilanova M. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry // *Can. J. Microbiol.* – 2011. – **57**, №10. – P. 850–856.
10. Cossins A. R., Gibson J. S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis invertebrate red blood cells // *J. Exp. Biol.* – 1997. – **200**. – P. 343–352.
11. Gilles C., Motais R. Effect of catecholamines on deformability of red cells from trout: relative roles of cyclic AMP and cell volume // *J. Physiol.* – 1989. – **412**. – P. 321–332.
12. Girish V., Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ // *Indian J. Cancer.* – 2004. – **41**, №1. – P. 41–47.
13. Hallman T. M., Rojas-Vargas A. C., Jones D. R., Richards J. G. Differential recovery from exercise and hypoxia exposure measured using ³¹P- and ¹H-NMR in white muscle of the common carp *Cyprinus carpio* // *J. Exp. Biol.* – 2008. – **211**. – P. 3237–3248.
14. Houchin D.N., Munn J.I., Parnell B.L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // *Blood.* – 1958. – **13**. – P. 1185–1191.
15. Jahns R., Borgese F., Lindenthal S, Straub A., Motais R., Fievet B. Trout red blood cell arrestin (TRCarr), a novel member of the arrestin family: cloning, immunoprecipitation and expression of recombinant TRCarr // *Biochem. J.* – 1996. – **316**, №2. – P. 497–506.
16. Jensen F. B. Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport // *J. Exp. Biol.* – 1995. – **198**. – P. 155–165.
17. Jensen F.B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport (review) // *Acta Physiol. Scand.* – 2004. – **182**, №3. – P. 215–227.
18. Jensen F.B.; Weber R. E. Kinetics of the acclimational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia // *J. Comp. Physiol., B.* – 1989. – **156**, №2. – P. 197–203.
19. Motais R., Borgese F., Fievet B. Garcia-Romeu F. Regulation of Na⁺/H⁺ exchange and pH in erythrocytes of fish // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1992. – **102a**, №4. – P. 597–602.
20. Perry S.F., Montpetit C.J., Julio A.E., Moore K. The influence of chronic anaemia on catecholamine secretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *J. Comp. Physiol.* – 1999. – **169**, №4/5. – P. 335–343.
21. Phillips M.C.L., Moyes C.D., Tufts B.L. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // *J. Exp. Biol.* – 2000. – **203**, №6. – P. 1039–1045.
22. Reid S.D., Perry S.F. The effects of hypoxia, in vivo, on red blood cell b-adrenoreceptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Fish Physiol. Biochem.* – 1995. – **14**, №6. – P. 217–240.
23. Richards J. G., Wang Y. S., Brauner C. J., Gonzalez R. J., Patrick M. L., Schulte P. M., Choppari-Gomes A. R., Almeida-Val V. M., Val A. L. Metabolic and ionoregulatory responses of the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*, to severe hypoxia // *J. Comp. Physiol. B.* – 2007. – **177**. – P. 361–374.
24. Soldatov A.A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study // *J. Fish. Biol.* – 1996. – **48**, №3. – P. 321–328.
25. Tetens V., Lykkeboe G., Christensen N.J. Potency of adrenaline and noradrenaline for b-adrenergic proton extrusion from red cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri* // *J. Exp. Biol.* – 1988. – **134**. – P. 267–280.
26. Tiihonen K., Nikinmaa M. Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // *J. Exp. Biol.* – 1991. – **161**. – P. 509–514.
27. Walsh P. J., Wood C. M., Thomas S., Perry S. F. Characterization of red blood cell metabolism in rainbow trout // *Ibid.* – 1990. – **154**. – P. 475–489.
28. Wells R.M.G. Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia // *Fish. Physiol.* – 2009. – **27**. – P. 255–299.
29. Wood C.M., Simmons H. The conversion of plasma HCO₃⁻ to CO₂ by rainbow trout red blood cells in vitro: adrenergic inhibition and the influence of oxygenation status // *Fish. Physiol. and Biochem.* – 1994. – **12**, №6. – P. 445–454.
30. Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – **32**, №12. – P. e103.

*Ин-т біології південних морів ім. О.О. Ковалевського
НАН України, Севастополь
E-mail: andreevaal@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 19.04.2013*

В.В. Шухтін, А.І. Гоженко, А.П. Левицький

Патогенез уражень шкіри у щурів з імунодефіцитним станом

Вивчали стан шкіри в умовах імунодефіциту, який моделювали за допомогою циклофосфану. Останній викликав у крові розвиток двох фаз патологічного процесу: перша – лейкопенія, зумовлена дією цитостатика, і друга – гіперлейкоцитарна, спричинена ураженням печінки та спленомегалією. У шкірі розвивався дисбіоз, особливо, у другу фазу, запалення і знижується рівень захисних систем.

Ключові слова: імунодефіцитний стан, лейкоцитоз, шкіра, дисбіоз, запалення, печінка, селезінка.

ВСТУП

В основі механізмів патологічних процесів, що виникають при імунодефіцитах і часто призводять до летального результату, може бути розвиток бактеріальної інфекції і виникнення дисбіозу [1, 3, 14]. Встановлено, що майже 60 % хворих на СНІД вмирають від туберкульозу [9]. Гіперендотоксинемія, яка при цьому виникає, за рахунок значного підвищення вмісту в крові кишкового ендотоксину (ліпополісахариду) зумовлює системне ураження органів і тканин макроорганізму [12, 16]. Шкіра не є винятком і запально-дистрофічні процеси нерідко спостерігаються у хворих на СНІД [4, 7] та при кишковому дисбіозі [11, 13, 15].

Імунодефіцитні стани, як відомо, розвиваються і при багатьох інфекційних захворюваннях, особливо після курсу антибіотикотерапії [3].

Метою нашого дослідження було вивчення за допомогою біохімічних показників стану шкіри щурів в умовах експериментального імунодефіциту.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар віком 10 міс, масою 280 ± 12 г).

© В.В. Шухтін, А.І. Гоженко, А.П. Левицький

Імунодефіцитний стан моделювали двократним (з інтервалом 2 доби) внутрішньоочеревинним введенням препарату цитостатика циклофосфану в дозі 45 мг/кг на одну ін'єкцію [5].

Через 7 та 14 діб щурів піддавали етаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) тотальним кровопусканням із серця, виділяли селезінку, висікали частини шкіри на бічній поверхні тулуба, де попередньо смух був поголений, а також отримували кров для аналізу її клітинного складу і сироватку крові для біохімічних досліджень.

У гомогенаті шкіри (50 мг/мл 0,05 моль/л тріс-НСІ-буфера рН 7,5) визначали маркери запалення: активність еластази [8], вміст малонового діальдегіду (МДА), а також вміст гіалуринової кислоти [2]. Крім того, досліджували активність антиоксидантного ферменту каталази [8] і анти- – прооксидантний індекс (АПІ), що являє собою співвідношення активності каталази та концентрації МДА [8].

Ступінь мікробного обсіменіння шкіри оцінювали за активністю ферменту уреазу [10], стан неспецифічного імунітету – за активністю лізоциму [10], за співвідношенням відносних активностей уреазу та лізоциму розраховували ступінь дисбіозу [10].

У сироватці крові визначали печінкові маркери: концентрацію білірубину [6] та активність лужної фосфатази (ЛФ) [8]. Ор-

ганний індекс селезінки розраховували за відношенням сирової маси органа в міліграмах до живої маси шурів у грамах.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 представлені результати визначення клітинного складу лейкоцитів крові шурів з

імунодефіцитним станом. Слід відмітити, що через 7 діб з початку дослідження загальне число лейкоцитів знижується більш ніж в 3 рази, однак через 14 діб воно значно збільшується, перевищуючи вдвічі відповідний показник контролю. Лейкопенія, що спостерігається через 7 діб дослідження, зумовлена, в основному, зниженням кількості лімфоцитів

Таблиця 1. Клітинний склад крові ($\times 10^9/\text{л}$) шурів, що отримували циклофосфан ($M \pm m$; $n=6$)

Група тварин	Лейкоцити	Лімфоцити	Нейтрофіли		Моноцити	Еозинофіли
			сегментоядерні	палочкоядерні		
Норма	14,0 ± 2,3	7,8 ± 0,6	3,6 ± 0,4	0,20 ± 0,06	1,40 ± 0,10	0,98 ± 0,10
Імунодефіцит						
7 діб	4,5 ± 1,2*	2,1 ± 0,2*	1,6 ± 0,2*	0,11 ± 0,02	0,51 ± 0,06*	0,24 ± 0,06*
14 діб	29,0 ± 6,4*	11,2 ± 1,0*	10,3 ± 0,7*	1,16 ± 0,15*	3,89 ± 0,19*	1,44 ± 0,38

Примітка. Тут і в табл. 2–5 * $P < 0,05$ – достовірність різниці з 1-ю групою.

(в 3,7 раза), нейтрофілів (в 2,2 раза) і моноцитів (в 2,8 раза).

Через 14 діб досліду, коли розвивається гіперлейкоцитоз, найбільше збільшуються кількість моноцитів (в 7,6 раза), еозинофілів (у 6 разів), лімфоцитів (в 5,3 раза) та нейтрофілів (у 7 разів).

Розвиток лейкопенії після введення циклофосфану є зрозумілим, оскільки він є цитостатиком. Що ж стосується гіперлейкоцитозу, на нашу думку, він розвивається у результаті ураження печінки, про що свідчить достовірне збільшення в сироватці крові вмісту білірубину і активності лужної фосфатази (табл. 2). В результаті ураження печінки розвивається печінкова спленомегалія, тобто більш ніж дворазове підвищення органного індексу селезінки (див. табл. 2).

У табл. 3 представлені результати визначення в шкірі шурів з імунодефіцитним станом підвищення рівня маркера запалення – активності еластази, однак другий маркер запалення, МДА, що є кінцевим продуктом переокисного окиснення ненасичених жирних кислот, практично не змінився. Що ж стосується вмісту гіалуронової кислоти, яка є міжклітинним «цементом», то її вміст при імунодефіцитному стані хоча і знижується, однак недостовірно ($P > 0,05$; див. табл. 3).

Про достовірне зниження при імунодефіцитному стані рівня антиоксидантного захисту шкіри свідчать результати визначення активності каталази та АПІ (табл. 4).

Нарешті, найбільш цікаві, на наш погляд, результати представлені в табл. 5, з якої видно, що при імунодефіцитному стані різко

Таблиця 2. Вміст печінкових маркерів у сироватці крові та органний індекс селезінки у шурів з імунодефіцитним станом ($M \pm m$; $n=6$)

Група тварин	Білірубін, мкмоль/л	Лужна фосфатаза, мккат/л	Індекс селезінки, мг/г
Норма	4,17 ± 0,27	2,20 ± 0,33	2,88 ± 0,26
Імунодефіцит			
7 діб	4,03 ± 0,14	2,34 ± 0,33	2,31 ± 0,18
14 діб	5,58 ± 0,54*	3,22 ± 0,52	5,57 ± 0,32*

Таблиця 3. Маркери запалення та вміст гіалуронової кислоти в шкірі щурів з імунодефіцитним станом (M±m; n=6)

Група тварин	Еластаза, мккат/кг	Малоновый діальдегід, ммоль/кг	Гіалуронова кислота, мг/кг
Норма	10,8 ± 0,9	7,95 ± 0,25	274,4 ± 38,2
Імунодефіцит			
7 діб	15,2 ± 1,1*	7,82 ± 0,38	232,1 ± 25,4
14 діб	16,5 ± 1,0*	7,86 ± 0,47	233,1 ± 12,21

збільшується активність уреазы, яка свідчить про збільшення в 7–12 разів мікробного обміненія шкіри. При одночасному зниженні активності лізоциму (особливо у другій термін – в 2,4 раза) це дає різке збільшення ступеня дисбіозу в шкірі щурів з імунодефіцитом: в 5,8 раза через 7 діб і в 16,3 раза через 14 діб.

Таким чином, можна зробити висновок,

що при імунодефіцитному стані розвиваються дисбіотичні явища в шкірі, які, очевидно, зумовлюють виникнення запально-дистрофічних процесів. Ці результати дають певні підстави на перспективу використання антидисбіотичних засобів (про- або пребіотиків), а також гепатопротекторів як лікувально-профілактичних препаратів при імунодефіцитах.

Таблиця 4. Активність каталази та анти- – прооксидантний індекс (АПІ) в шкірі щурів з імунодефіцитним станом (M±m; n=6)

Група тварин	Каталаза, мккат/кг	АПІ, од.
Норма	0,66 ± 0,05	0,83 ± 0,06
Імунодефіцит		
7 діб	0,49 ± 0,06*	0,62 ± 0,07*
14 діб	0,48 ± 0,07*	0,61 ± 0,07*

ВИСНОВКИ

1. Циклофосфан викликає в крові розвиток двох фаз патологічного процесу: перша – лейкопенічна, зумовлена дією цитостатика, і друга – гіперлейкоцитарна, спричинена ураженням печінки та спленомегалією.

2. При експериментальному імунодефіцитному стані в шкірі розвивається дисбіоз, який, імовірно, зумовлює виникнення запально-дистрофічних процесів у цій тканині.

3. Встановлення ролі дисбіозу у розвитку патологічних процесів у шкірі при імунодефі-

цитному стані ставить на порядок денний вивчення лікувально-профілактичних властивостей при цій патології антидисбіотичних і гепатопротекторних препаратів.

В.В. Шухтін, А.І. Гоженко, А.П. Левицький

ПАТОГЕНЕЗ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ У КРЫС С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМ СОСТОЯНИЕМ

Изучали состояние кожи в условиях иммунодефицита, который моделировали с помощью циклофосфана. Последний вызывал в крови развитие двух фаз патологического процесса: первая – лейкопеническая, обусловленная действием цитостатика, и вторая – гиперлейкоцитарна,

Таблиця 5. Активність уреазы, лізоциму та ступінь дисбіозу в шкірі щурів з імунодефіцитним станом (M±m; n=6)

Група тварин	Уреаза, мккат/кг	Лізоцим, од/кг	Ступінь дисбіозу, ум.од.
Норма	0,015 ± 0,008	134 ± 10	1,0 ± 0,1
Імунодефіцит			
7 діб	0,111 ± 0,019*	103 ± 14	5,8 ± 0,8*
14 діб	0,172 ± 0,024*	55 ± 15*	16,3 ± 2,9*

обусловленная поражением печени и спленомегалией. В коже развивается дисбиоз, особенно во вторую фазу, воспаление и снижается уровень защитных систем. Ключевые слова: иммунодефицитное состояние, лейкоцитоз, кожа, дисбиоз, воспаление, печень, селезенка.

V.V. Shukhtin, A.I. Gozhenko, A.P. Levitskiy

PATHOGENESIS OF SKIN INJURY IN RATS WITH IMMUNODEFICIT

We investigated the skin condition in rats with immunodeficit induced by cyclophosphane. Cyclophosphane induced in the blood the development of two phases pathological process. The first leukopenic phase is mediated by the action of cytostatics, and the second hyperleucocytic phase is induced by liver injury and splenomegalia. Dysbiosis and inflammation are developed in the skin, especially during the second phase.

Institute of medicine of transport, Odesa

Dental Institute, Odesa

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алешина Р.М. Синдром вторичной иммунной недостаточности: клинико-лабораторная характеристика // Клін. імунологія, алергологія, інфектологія. – 2007. – № 2 (107). – С. 17–20.
2. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1965. – 298 с.
3. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А. Дисбактериоз кишечника. – М.: Питер, 2007. – 240 с.
4. Волянский Ю.Л., Телепнева Л.Г., Васильев Н.В. ВИЧ-инфекция (факты и гипотезы). – Харьков: Основа, 1993. – 224 с.
5. Григорьян А.С., Воложин А.И., Шумтикова Е.В. Экспериментальное обоснование применения радиопротектора индометацина для купирования воспаления в

пародонте при иммунодефицитном состоянии // Патол. физиология. – 1998. – № 3. – С. 15–18.

6. Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. – Изд. 3-е. – Одесса: Экология, 2005. – 616 с.
7. Запорожан В.М., Аряев М.Л. ВІЛ-інфекція і СНІД. – К.: Здоров'я, 2004. – Вид. 2-ге. – 636 с.
8. Левицкий А.П., Деньга О.В., Макаренко О.А. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. Рекомендации. – Одесса, 2010. – 16 с.
9. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие России // ЖМЭИ. – 2013. – № 1. – С. 42–51.
10. Патент на корисну модель 43140 Україна, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А.П., Деньга О.В., Селіванська І.О. – № u200815092. – Заявл. 26.12.08; опубл. 10.08.09, Бюл. № 15.
11. Полеско И.В., Бутов Ю.С., Малиновская В.В. Роль эндотоксинемии в формировании десквамативных поражений кожи // Рос. журн. кожных и венер. болезней. – 2009. – № 3. – С. 38–41.
12. Яковлев М.Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных // Успехи соврем. биохимии. – 2003. – 123, № 1. – С. 31–40.
13. Drake D.R., Brogden K.A., Dawson D.V. Antimicrobial lipids at the skin surface // J. Lipid Res. – 2008. – 49, № 1. – P. 4–11.
14. Khoshini R.A., Dai Sun-Chuan, Lezcano S. A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth // Dig. Diseases and Sci. – 2008. – 33, № 6. – P. 1443–1454.
15. Moro J., Arslanoglu S., Stahl B. A mixture of prebiotic oligosaccharide reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age // Arch. Dis. Child. – 2006. – 91, № 10. – P. 814–819.
16. Wang X., Quinn P. Endotoxins: Structure, Function and Recognition // Seria: Subcellulare Biochemistry. – 2010. – 53. – 415 p.

*Укр НДІ медицини транспорту, Одеса;
ДУ «Ін-т стоматології НАМН», Одеса
E-mail: medtrans2@rambler.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 08.04.2013*

О.В. Максимчук, М.О. Чашин

Стресіндуковані зміни вмісту цитохрому P450 2E1 у печінці мишей при хронічному психоемоційному перенапруженні

Досліджено зміни експресії цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) в печінці мишей, які зазнали психоемоційного стресу (ПЕС). Було показано дворазове відносно контролю зниження вмісту ферменту, який не повертався до норми навіть після відміни дії стресора. При цьому змін рівня мРНК Cyp2e1 не спостерігалось на жодному з етапів експерименту. Одночасно з цим виявлено достовірне зниження відносно контролю експресії hsp90 – одного з факторів, що визначає рівень деградації CYP2E1 у клітині. Показано також, що в печінці дослідних тварин розвивається оксидативний стрес, про що свідчить триразове збільшення вмісту малонового діальдегіду на тлі п'ятикратного зниження активності каталази. Зниження експресії цитохрому P450 2E1 у печінці мишей при ПЕС зумовлено інтенсифікацією пероксидних процесів і розвитком оксидативного стресу. При цьому зменшення вмісту білка CYP2E1, ймовірно, не пов'язано з hsp90-залежними процесами його деградації в клітині. Ключові слова: каталаза, цитохром P450 2E1, CYP2E1, mRNA Cyp2e1, hsp90, малоновий діальдегід, оксидативний стрес, психоемоційний стрес.

ВСТУП

Білок CYP2E1 є однією з ізоформ мікросомного цитохрому P450, що бере участь у біотрансформації ліпофільних речовин ендогенного та екзогенного походження. Цитохром P450 2E1-монооксигеназне окиснення гідрофобних ксенобіотиків призводить до утворення в їх молекулах реактивних груп. Активовані таким чином метаболіти кон'югують з молекулами глутатіону, спричинюючи утворення водорозчинних комплексів, що сприяє виведенню ксенобіотиків з організму. Варто зазначити, що завдяки реактивним групам ці метаболіти можуть взаємодіяти і з іншими біомакромолекулами, викликаючи різні структурно-функціональні пошкодження клітини [15].

Крім монооксигеназної, цитохром P450 2E1 виявляє також оксидазну активність у клітині, і, отже, є потужним клітинним прооксидантом [15]. Завдяки цьому він бере участь у підтриманні гомеостазу клітини, здійснюю-

чи регуляцію її прооксидантно-антиоксидантного балансу. Показано, що CYP2E1 генерує у своєму каталітичному циклі активні форми кисню (АФК), які викликають інтенсифікацію процесів пероксидного окиснення. Це може призводити до дисбалансу прооксидантно-антиоксидантних процесів і розвитку в клітині оксидативного стресу [10, 13, 15].

Такі CYP2E1-залежні процеси характерні головним чином для клітин печінки, оскільки саме в цьому органі спостерігається найвищий рівень експресії ферменту і здійснюється детоксикація більшості екзогенних речовин [13, 15]. Таким чином, CYP2E1 є не тільки одним з основних ферментів детоксикаційної системи, але і ключовою ланкою системи забезпечення гомеостазу клітин печінки, відіграючи важливу роль у регуляції багатьох фізіологічних процесів в організмі [8]. Тому зміни рівня експресії CYP2E1 в печінці можуть призводити до порушення функціонування організму як на клітинному,

© О.В. Максимчук, М.О. Чашин

так і на системному рівнях. Показано участь ферменту у розвитку багатьох локальних і системних патологій, таких як рак і цироз печінки, гепатит різної етіології, цукровий діабет, ожиріння тощо [10, 13, 15].

Рівень експресії CYP2E1 у клітинах печінки регулюється на всіх етапах його біосинтезу – від ініціації транскрипції до пострасляційних процесів [13]. На пострасляційному етапі вміст CYP2E1 у клітині контролюють молекулярні шаперони, зокрема hsp90. Так, в експериментах *in vitro* показано, що hsp90 сприяє протеасомній деградації ферменту, і специфічне його інгібування призводить до різкого збільшення вмісту білка CYP2E1 у клітині [12]. На експресію CYP2E1 можуть впливати різні фактори навколишнього середовища (хімічні, фізичні, біологічні тощо). Показано, що залежно від природи стресора спостерігається різний характер змін експресії CYP2E1 [5]. Останнім часом у зв'язку з прискоренням темпу життя надзвичайно актуальною є проблема психоемоційного перенапруження, що викликається хронічним впливом на організм психогенних факторів, внаслідок чого у людини розвивається психоемоційний стрес (ПЕС), і як результат – психосоматичні захворювання, які характеризуються дисфункціями практично всіх внутрішніх органів [1].

Відомо, що ПЕС сприяє інтенсифікації розвитку хронічних захворювань печінки [9, 16]. Вважається, що однією з найбільш імовірних причин такої прогресії захворювань може бути оксидативний стрес, який розвивається на клітинному рівні при дії різних стресорів [9, 16]. Показано, що в цих процесах ключову роль відіграє CYP2E1, підвищення активності якого може сприяти розвитку оксидативного стресу [10]. Водночас за умов оксидативного стресу інтенсифікація пероксидних процесів викликає зміни внутрішньоклітинного метаболізму, що в свою чергу змінює експресію ферменту в клітині [4].

Метою цієї роботи є дослідження змін

вмісту CYP2E1 у печінці мишей за хронічної дії психогенних стресорів з урахуванням факторів, що визначають його експресію – молекулярного шаперону hsp90 та рівня пероксидних процесів.

МЕТОДИКА

В експерименті було використано 20 самців мишей лінії C57Bl/6 віком 2,5 міс із середньою масою тіла 23 г розведення віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ). Мишей утримували в стандартних умовах: інвертований добовий світловий режим, температура повітря – 18–20 °C та стандартна дієта. При моделюванні ПЕС у дослідних тварин відтворювали такі негативні емоції, як страх, тривога, агресія і т.д., тобто всі ті, що проявляються у людини, яка зазнала тривалого психоемоційного перенапруження [1]. Тварин було розділено порівну на чотири групи. I – контрольна, – тварини, які не зазнали дії стресора. Мишей – II, III, IV груп піддавали хронічному психоемоційному перенапруженню/стресу, здійснюючи щоденну чотиригодинну іммобілізацію протягом двох тижнів [7, 14]. При цьому тварин II групи декапітували на 7-му добу, а III – на 14-ту добу від початку експерименту. Мишей IV групи після двотижневої іммобілізації утримували ще 7 діб за стандартних умов. Декапітували мишей під легким ефірним наркозом згідно правил роботи з лабораторними тваринами [2].

Експресію генів *Cyp2e1* та *hsp90* на рівні мРНК досліджували за допомогою напівкількісного аналізу із застосуванням зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Для цього з печінки кожної тварини виділяли тотальну РНК [11], після чого на її матриці проводили синтез кДНК (для реакції використовували набір реагентів «First Strand cDNA Synthesis Kit», Fermentas, Литва). Для ПЛР були підібрані праймери, специфічні для генів *Cyp2e1*, *hsp90* та β -актину миші (останній використовували

ли як внутрішній контроль). Таким чином праймери мали такий склад: для *Cyp2e1* – 5'AGGCTGTCAAGGAGGTGCTA3' (прямий) та 5'GGAAGTGTGCCTCTCTTTGG3' (зворотний), для *hsp90* – 5'AAAGGA GGCGGAATCTTCTC3' (прямий) та 5'TCTCTGTTGCTTCCCGACTT3' (зворотний), для β -актину – 5'ACTGCTCTGGCTCCTAGCAC3' (прямий) та 5'GAAAGGGTGTAAAACGCAGC3' (зворотний). В результаті ПЛР з використанням цих праймерів утворювалися продукти генів *Cyp2e1*, *hsp90* та β -актину довжиною 210, 200 та 212 пар нуклеотидів відповідно. У ПЛР усіх досліджуваних генів проводили первинну денатурацію при 94 °С протягом 1,5 хв з наступною циклічною реакцією, яка завершувалася тривалою елонгацією при 72 °С протягом 10 хв. Умови специфічних циклічних реакцій були такими: для *Cyp2e1* – 29 циклів склалися з етапів (кожен по 45 с) денатурації при 94 °С, віджигу при 54 °С та елонгації при 72 °С; для *hsp90* – 27 циклів: денатурація при 94 °С, віджиг при 55 °С і елонгація при 72 °С (кожен етап по 30 с); для β -актину – 27 циклів: денатурація при 94 °С, віджиг при 53 °С та елонгація при 72 °С (кожен етап по 40 с). ПЛР проводили на матриці кДНК (по 1,5 мкл) у реакційній суміші (об'ємом 25 мкл) такого складу: ПЛР-буфер (однократний), специфічні праймери (по 0,3 мкмоль/л кожного), суміш dNTP (0,2 ммоль/л), хлорид магнію (2,5 ммоль/л) та Taq-ДНК-полімераза (1 U). Продукти ПЛР розділяли в 2%-му агарозному гелі, фарбували бромистим етидієм та візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора. Рівні експресії CYP2E1 та *hsp90* на рівні мРНК представлено у відносних одиницях, які розраховували як відношення кількостей продуктів специфічних ПЛР *Cyp2e1* та *hsp90* до кількості продукту ПЛР β -актину.

Вміст білка CYP2E1 у тотальному лізаті печінки кожної тварини визначали за допомогою методу імуноблотингу [5]. При цьому використовували специфічні поліклональні антитіла: анти-CYP2E1 (отримані в нашій лабораторії) та анти-тубулін (Santa

cruz biotechnology, inc., США). Вміст білка CYP2E1 у кожному зразку печінки представлено у відносних одиницях, які розраховували як відношення кількості досліджуваного білка до кількості контрольного білка тубуліну. Кількість синтезованих у ЗТ-ПЛР продуктів генів, а також вміст білка у досліджуваних зразках оцінювали денситометричним методом за інтенсивністю люмінесценції/ забарвлення відповідних смуг, використовуючи спеціальну комп'ютерну програму Scion image 3.53.346.0. Рівень процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали за вмістом у гомогенатах печінки малонового діальдегіду (МДА) [6]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за рівнем активності каталази [3].

Для статистичної обробки результатів дослідження застосовували пакет програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Для оцінки відмінності між показниками, отриманими у дослідних та контрольній групах, використовували критерій t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як критерій достовірної різниці. Результати представлено у вигляді середніх значень для $n = 5$ із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного експерименту в печінці дослідних тварин було виявлено, що вміст МДА практично не змінювався через тиждень, але різко зростав (приблизно у 3 рази) через 2 тиж від початку дії стресора. При цьому активність каталази на 7-му добу знижувалася на 33% та значно зменшувалася (приблизно у 5 разів) на 14-ту добу дослідження (рис. 1).

Таким чином, отримані результати можуть свідчити про те, що в печінці дослідних тварин поетапно розвивається оксидативний стрес. При цьому різні його стадії мають певні особливості прооксидантно-антиоксидантних процесів. Перша стадія (7-ма доба експерименту) характеризується відносною

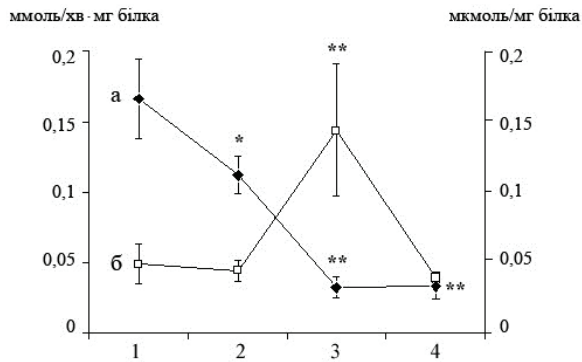


Рис. 1. Зміни активності каталази (а) та вмісту малонового діальдегіду (б) у печінці мишей при хронічній дії психо-емоційного стресора: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. *P<0,05, **P<0,01 порівняно з контролем

компенсацією прооксидантних процесів, про що може свідчити нормальний рівень ПОЛ. Одночасно з цим активність каталази вже дещо знижена, що може вказувати на виснаження ресурсів антиоксидантної системи, які витрачаються на деактивацію АФК та підтримку процесів ПОЛ на фізіологічному рівні (див. рис. 1). На другій стадії (14-та доба експерименту) спостерігається значне порушення прооксидантно-антиоксидантного

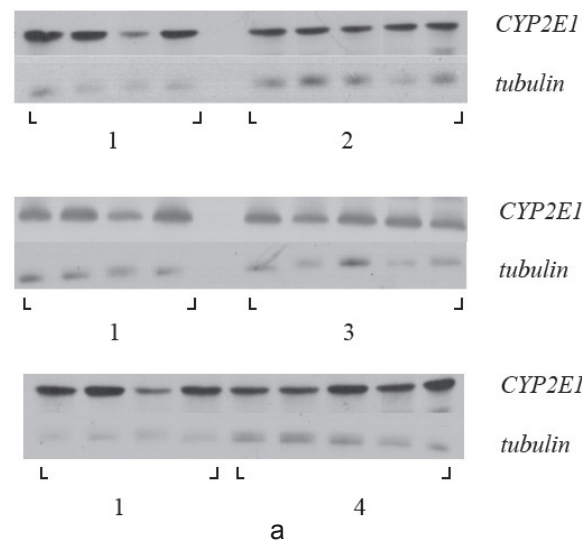
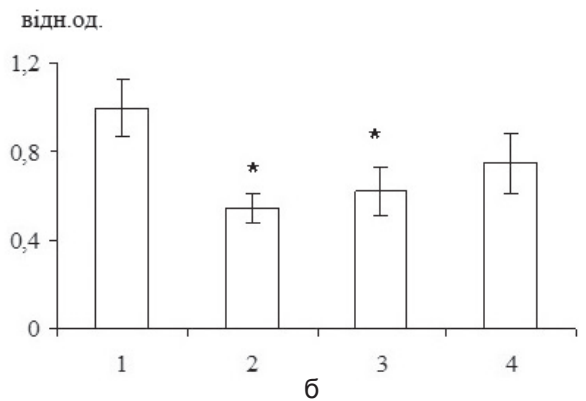


Рис. 2. Експресія CYP2E1 у печінці мишей при хронічній дії психоемоційного стресора: а – імуноблотинг тотальних лізатів печінки із використанням поліклональних антитіл до CYP2E1 та тубуліну (tubulin), б – середній вміст білка CYP2E1 у печінці мишей: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. *P<0,05 порівняно з контролем

балансу в клітинах печінки. На виснаження антиоксидантних ресурсів вказує значне зниження активності каталази (див. рис. 1). При цьому, імовірно, стає неможливим підтримання прооксидантних процесів у фізіологічних межах. На це може вказувати різке збільшення вмісту МДА, яке спостерігається наприкінці другого тижня від початку дії стресора (див. рис. 1) та свідчить про високий рівень процесів ПОЛ у печінці мишей. Така інтенсифікація пероксидного окиснення може викликати глибоке виснаження ресурсів антиоксидантної системи, що в свою чергу призводить до накопичення вільних активних радикалів, які ушкоджують біомакромолекули та внутрішньоклітинні структури.

Після відміни двотижневої дії стресора активність каталази в печінці мишей залишається зниженою (див. рис. 1). Це може бути пов'язано із пригніченням біосинтетичних процесів, зокрема експресії каталази, внаслідок значних оксидативних ушкоджень, яких зазнали клітини печінки при хронічній дії стресора.

Розглянуті вище процеси не могли не позначитися на вмісті в клітині CYP2E1, який будучи мембранно-асоційованим білком, знаходиться в безпосередній близькості від епіцентру процесів ПОЛ. Дійсно, як видно з рис. 2, на першій стадії оксидативного стресу



спостерігається дворазове зниження вмісту білка СУР2Е1 в печінці тварин відносно контролю. Це, ймовірно, пов'язано з АФК-залежною «down-регуляцією», що призводить в умовах загрози порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в клітині до зниження вмісту ферменту, який має потужні прооксидантні властивості [4].

На другій стадії оксидативного стресу вміст СУР2Е1 у клітинах печінки залишається таким самим (див. рис. 2), що вже може бути пов'язано з АФК-опосередкованими ушкодженнями внутрішньоклітинних структур і біомакромолекул. Цікаво, що на 7-му добу після відміни двотижневої дії стресора вміст білка СУР2Е1 дещо зростає, але не сягає контрольного рівня (див. рис. 2). Ймовірно, це пов'язано з процесами, які контролюють вміст прооксидантів у клітині в умовах все ще існуючої загрози порушення її прооксидантно-антиоксидантного балансу [4].

Як видно з рис. 3,а та 3,б вміст мРНК *Cyp2e1* протягом усього експерименту залишався в межах контрольних значень. Це свідчить про те, що зниження вмісту СУР2Е1 у печінці мишей, які зазнавали дії психогенного стресора, не пов'язано з інгібуванням транскрипції гена, а відбувається, ймовірно, внаслідок інтенсифікації процесів протеолізу білка.

Відомо, що у деградації СУР2Е1 активну роль відіграють молекулярні шаперони, зокрема hsp90 [1, 12]. Показано, що рівень експресії шаперонів змінюється при різних видах стресу, що є одним з адаптаційних процесів, спрямованих на нівелювання токсичних ефектів оксидативного стресу в клітині [1]. Нами були показані зміни експресії hsp90 у печінці мишей, які зазнали хронічного ПЕС: виявлено достовірне зниження у порівнянні з контролем вмісту мРНК hsp90 на всіх етапах експерименту (див. рис. 3). Отримані результати дають змогу припустити, що хронічна дія психогенного стресора не призводить до збільшення рівня hsp90 у клітині. Тому виявлене зниження вмісту СУР2Е1, ймовірно, не пов'язано з інтенсифікацією

hsp90-залежної деградації білка, а зумовлено посиленням пероксидних процесів.

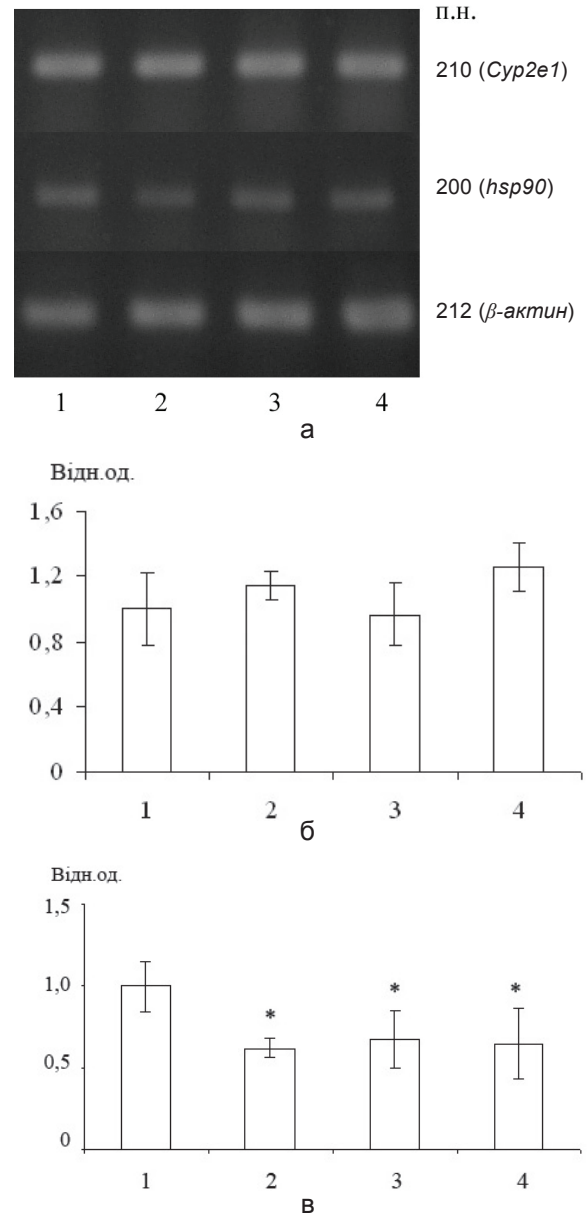


Рис. 3. Експресія генів *Cyp2e1* та *hsp90* у печінці мишей при хронічній дії психоемоційного стресора: а – електрофореграма продуктів *Cyp2e1* (210 п.н.), *hsp90* (200 п.н.)- та β -актин (212 п.н.)-специфічних зворотно-транскрипційних полімеразних ланцюгових реакцій (наведено дані одного з п'яти експериментів); б – середній рівень мРНК *Cyp2e1*; в – середній рівень мРНК *hsp90*: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; п.н. – пари нуклеотидів

Таким чином зниження рівня експресії цитохрому P450 2E1 у печінці тварин, які зазнали хронічного ПЕС, відбувається на тлі оксидативного стресу. Зниження вмісту ферменту зумовлено підвищенням рівня пероксидного окиснення, яке викликає інтенсифікацію процесів протеолізу. При цьому посилення протеолізу ймовірно не пов'язано з інтенсифікацією hsp90-залежних процесів деградації білка.

Автори статті вдячні провідному науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України А.М. Шиш та інженеру відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України І.В. Росохацькій за допомогу у проведенні біохімічних досліджень та в роботі з тваринами.

О. В. Максимчук, Н. А. Чашин

СТРЕССИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОХРОМА P450 2E1 (CYP2E1) В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОМ ПЕРЕНАПРЯЖЕНИИ

Исследованы изменения экспрессии цитохрома P450 2E1 в печени мышей, испытывающих психоэмоциональный стресс (ПЭС). Было показано двукратное относительно контроля снижение содержания фермента, которое не приходило в норму даже после отмены действия стрессора. При этом изменений уровня мРНК *Cyp2e1* не наблюдалось ни на одном из этапов эксперимента. Одновременно с этим выявлено достоверное снижение относительно контроля экспрессии *hsp90* – одного из факторов, определяющих уровень деградации CYP2E1 в клетке. Показано также, что в печени опытных животных развивается окислительный стресс, о чем свидетельствует трехкратное увеличение содержания малонового диальдегида на фоне пятикратного снижения активности каталазы. Снижение экспрессии цитохрома P450 2E1 в печени мышей при ПЭС обусловлено интенсификацией перекисных процессов и развитием окислительного стресса. При этом уменьшение содержания белка CYP2E1, по-видимому, не связано с hsp90-зависимыми процессами его деградации в клетке. Ключевые слова: каталаза, цитохром P450 2E1, CYP2E1, мРНК *Cyp2e1*, *hsp90*, малоновый диальдегид, окислительный стресс, психоэмоциональный стресс.

O.V. Maksymchuk, M.O. Chashchyn

STRESS-INDUCED CHANGES IN THE CONTENT OF CYTOCHROME P450 2E1 IN THE LIVER OF MICE WITH CHRONIC PSYCHO-EMOTIONAL OVEREXERTION

In this work we investigated changes in the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) expression level in the liver of mice that have been exposed to psycho-emotional stress (PES). It was shown twofold relative to control reduction of the enzyme, which does not normalize after termination of the stressor. The changes in level of *Cyp2e1* mRNA is not observed at any time point of the experiment. At the same time it was found a significant decrease in the expression level of *hsp90* – one of the factors determines of the level of CYP2E1 degradation in the cell. Also it was shown, the oxidative stress develops in the liver of experimental animals, and this is indicated by a 3-fold increase in the malondialdehyde level on the background of a 5-fold decrease in catalase activity. A decrease in the level of expression of cytochrome P450 2E1 in the liver of mice that have been exposed to psycho-emotional stress is due to the intensification of the peroxide process and the development of oxidative stress. Reduction of protein content of CYP2E1 is apparently not related to the hsp90-dependent processes of its degradation in the cell.

Key words: catalase, cytochrome P450 2E1, CYP2E1, *Cyp2e1* mRNA, *hsp90*, malondialdehyde, oxidative stress, psychoemotional stress.

Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Стресс: природа, біологічна роль, механізми. Исходы. – К.: Фітоцентр, 2006. – 424 с.
2. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 139 с.
3. Корольок М.А., Иванова А.И., Майорова И.Т., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
4. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях // Бюл. СО РАМН. – 2005, –118, №4 – С. 7–12.
5. Максимчук О.В., Бездробна Л.К., Сидорик Л.Л., Кисельова О.К., Чашин М.О. Експресія цитохрому P-450 2E1 у печінці мишей за постійної та гострої дії γ -випромінювання // Укр.біохім. журн. – 2008. – 80, №4. – С. 59–65.
6. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Современные методы биохимии / Под ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–67.
7. Шиш А.М., Кукоба Т.В., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Модифікація жирно кислотного складу мембран як

- фактор захисту міокарда при стресорному пошкодженні серця // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 17–23.
8. Arnold C., Konkel A., Fischer R., Schunck W. Cytochrome P450-dependent metabolism of -6 and -3 long-chain polyunsaturated fatty acids // Pharmacol. Rep. – 2010. – **62**, № 3. – P. 536–547.
 9. Chida Y., Sudo N., Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? // J Gastroenterol. Hepatol. – 2006. – **21**, № 1, Pt 2. – P. 202–208.
 10. Choi J., Ou J. H Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus // Amer J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2006. – **290**, № 5. – P. G847–851.
 11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal Biochem. – 1987. – **162**, № 1. – P.156–159.
 12. Goasduff T., Cederbaum A.I. CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90 // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – **2**. – P. 321–330.
 13. Gonzalez F. J. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. CYP2E1 // Drug Metab Dispos. – 2007. – **35**, № 1. – P. 1–8.
 14. Ha H.Y., Kim K.S., Yeom Y.I., Lee J.K., Han P.L. Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver // Toxicol. Lett. – 2003. – **146**, № 1. – P. 49–63.
 15. Tanaka E., Terada M., Misawa S. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role // J. Clin. Pharm. Therap. – 2000. – **3**, № 25. – P. 165–175.
 16. Vere C.C., Streba C.T., Streba L.M., Ionescu A.G., Sima F. Psychosocial stress and liver disease status // World J. Gastroenterol. – 2009. – **15**, № 24. – P. 2980–2986.

Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
E.mail: prima@imbg.org.ua

Матеріал надійшов до редакції 31.07.2012

Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Глікопротеїни шлункового і дуоденального слизу при ульцерогенезі та при введенні екстракту фенугреку

Проведено оцінку складу глікопротеїнів шлункового та дуоденального захисного пристінкового шару слизу в нормі, при моделюванні виразок у щурів та на фоні введення тваринам з виразковими ушкодженнями екстракту фенугреку. У нормі загальний рівень глікозилювання глікопротеїнів слизу шлунка у 1,7 раза більше, ніж у дванадцятипалій кишці. За умов стресової моделі виразкоутворення у слизі шлунка спостерігається зменшення вмісту гексозамінів (у 1,4 раза), галактози (у 2,2 раза), фукози (у 1,3 раза) і зростання NANA (у 3,6 раза). При цистеаміновій моделі виразкоутворення у слизі дванадцятипалої кишки підвищувався вміст галактози (у 2,7 раза), NANA (у 2,4 раза), фукози (у 1,8 раза), але суттєво знижувався вміст гексозамінів тричі порівняно з контролем. Доведено захисний вплив екстракту фенугреку на склад глікопротеїнів пристінкового слизу слизових оболонок шлунка та дванадцятипалій кишки за умов моделювання виразкоутворення у щурів.

Ключові слова: виразка шлунка, виразка дванадцятипалої кишки, моносахариди глікопротеїнів, екстракт фенугреку.

ВСТУП

Виразкова хвороба – найбільш поширене захворювання органів травлення, яке являє собою не просто локальний дефект у слизовій оболонці шлунка чи дванадцятипалій кишці (ДПК), а є результатом системного патологічного процесу в організмі людини чи тварини [2, 7]. В останнє десятиліття в Україні значно зросла частота виявлення цієї патології, що пов'язано з несприятливою екологічною ситуацією, дією психоемоційних стресів. Під впливом різних чинників порушуються механізми, що забезпечують відтворення функцій та координацію системи саморегуляції. Використання синтетичних або напівсинтетичних препаратів призводить до побічних ускладнень, котрі виснажують захисні сили організму. Нині актуальним є застосування комплексів біологічно активних речовин природного походження для лікування захворювань різного генезу. Прикладом такого засобу є екстракт насіння фенугреку

© Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

(ЕФ; *Trigonella foenum graecum*). Широкий спектр фармакологічної дії фенугреку пояснюється тим, що він містить різноманітні цінні біологічно активні сполуки (полісахариди, флавоноїди, стероїди, амінокислоти, вітаміни, макро- та мікроелементи) [3, 8, 12]. При вивченні патогенезу виразкової хвороби велике значення надається стійкості слизових оболонок гастродуоденальної системи до пошкоджувальних факторів, основну роль у захисті яких відіграє пристінковий шар слизу, превентивні властивості якого реалізуються за рахунок глікопротеїнів (ГП) [2, 6, 9, 10].

Мета нашої роботи – дослідження моносахаридного складу ГП шлункового і дуоденального захисного пристінкового шару слизу в нормі, за умов моделювання гострих виразок шлунка та ДПК, а також введення шурам ЕФ.

МЕТОДИКА

У досліді використовували нелінійних щурів-самців масою 220–240 г. За добу до

проведення експериментів щури мали доступ лише до води. Для виразкоутворення у шлунку застосовано модель іммобілізаційного стресу [1]. Виразки ДПК моделювали пероральним введенням цистеаміну у дозі 30 мг/100 г двічі на добу з 4-годинним інтервалом [13]. ЕФ дослідним тваринам вводили інтрагастрально у концентрації 50 мг/кг двічі на добу протягом 7 діб за умов обох моделей виразкоутворення. Тварин розподілили на п'ять груп: 1-ша – контрольна, 2-га група – тварини, у яких моделювали виразку шлунка, 3-тя група – тварини, яким для корекції виразки шлунка вводили ЕФ, 4-та група – у яких моделювали виразку ДПК та 5-та група – тварини, яким для корекції виразки ДПК вводили ЕФ. Визначали вміст фукози, галактози, гексозамінів, N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA) [4], а також концентрацію білка [12]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики ($M \pm m$) на основі 10–12 повторів. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Постановка експериментів відповідала міжнародним біоетичним принципам, міжнародним угодам і національному законодавству у цій галузі [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ступінь прояву бар'єрних властивостей слизового шару залежить від вмісту та складу його основних структурних компонентів – ГП. Захисна плівка слизових оболонок шлунка і ДПК, яку вони утворюють, відіграє роль фільтра, який здатен пропускати лише низькомолекулярні сполуки і затримувати високомолекулярні, зокрема пепсини, а також компенсувати вплив кислоти через градієнтне зниження рівня рН [2, 7, 9, 10].

Для характеристики складу структурних ГП було розраховано сумарну концентрацію їх моносахаридних залишків та її відношення на масову частку білків слизу, що дає змогу визначити ступінь глікозилювання.

Для характеристики будови олігосахаридних ланцюжків розраховували парціальний склад окремих моносахаридів.

Досліджено склад структурних ГП слизу шлунка і ДПК за умов гострих виразок. Порівняння складу ГП слизу у нормі показало, що загальний рівень їх глікозилювання (показник насичення моносахаридами ГП) слизу шлунка у 1,7 раза більше, ніж у ДПК.

При моделюванні виразкоутворення як в шлунку, так і в ДПК загальний рівень глікозилювання ГП слизу шлунка не змінювався. У ДПК цей показник зростав у порівнянні з контрольними значеннями у 1,7 раза за умов стресу та в 1,9 раза за дії цистеаміну.

За умов виразки шлунка відбувалися зміни у співвідношенні окремих ГП шлункового слизу щурів, що проявлялося у зменшенні вмісту гексозамінів – у 1,4 раза, галактози – у 2,2 раза, фукози – у 1,3 раза та підвищенні вмісту NANA – у 3,6 раза (рис. 1.) відносно контролю.

У пристінковому слизу ДПК спостерігали достовірне підвищення вмісту моносахаридів глікопротеїнів слизу: NANA – у 1,8 раза, фукози в 1,5 раза, галактози в 1,9 раза та гексозамінів у 1,7 раза (рис. 2). При моделюванні виразки ДПК практично не змінився відносний вміст окремих моносахаридів ГП шлункового слизу. За цих умов у ГП ДПК слизу щурів збільшувався вміст галактози в 2,7 раза, фукози в 1,8 раза, NANA – в 2,4 раза, при цьому суттєво знижувався вміст гексозамінів – утричі порівняно з контролем (див. рис. 2).

Найбільш виражене зростання вмісту NANA, очевидно, зумовлено її термінальним положенням у молекулах ГП, що при зниженні вмісту інших їх компонентів може свідчити про синтез укорочених незрілих структур ГП шлункового слизу, а також, можливо, більш розгалужених молекул. Встановлений факт можна розглядати як компенсаторну реакцію на вимушену секрецію незрілих ГП. Оскільки найчастіше фукоза займає кінцеве положення на бічних ланцюгах макромолекул ГП, то зміни її вмісту створюють умови для більш активної дії пептидгідролаз на білкову частину ГП шлунка.

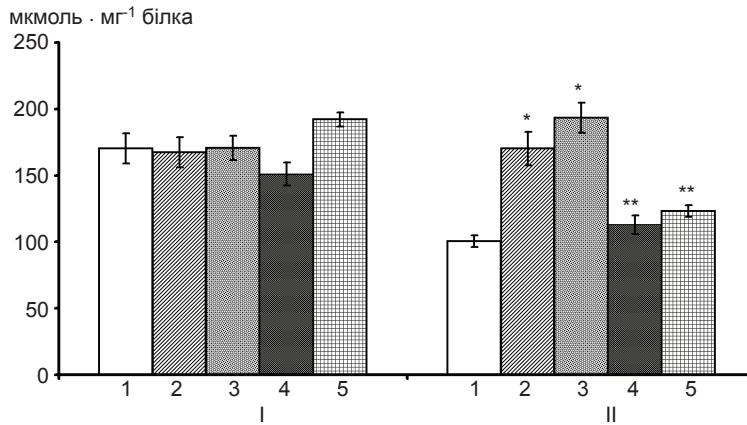


Рис. 1. Загальний вміст моносахаридів глікопротеїнів шлункового та дуоденального слизу за умов стресової та цистеамінової моделі виразкоутворення у щурів та введення екстракту фенугреку: I – шлунок, II – дванадцятипала кишка; 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – цистеамін, 4 – стрес і екстракт фенугреку, 5 – цистеамін і екстракт фенугреку. * $P \leq 0,05$ – достовірно відносно контролю, ** $P \leq 0,05$ – достовірно відносно відповідної моделі уражень

Очевидно, в патологічних умовах, клітина не встигає або втрачає здатність синтезувати

повноцінні ГП, у структурі яких містяться довгі бічні ланцюги моносахаридних залиш-

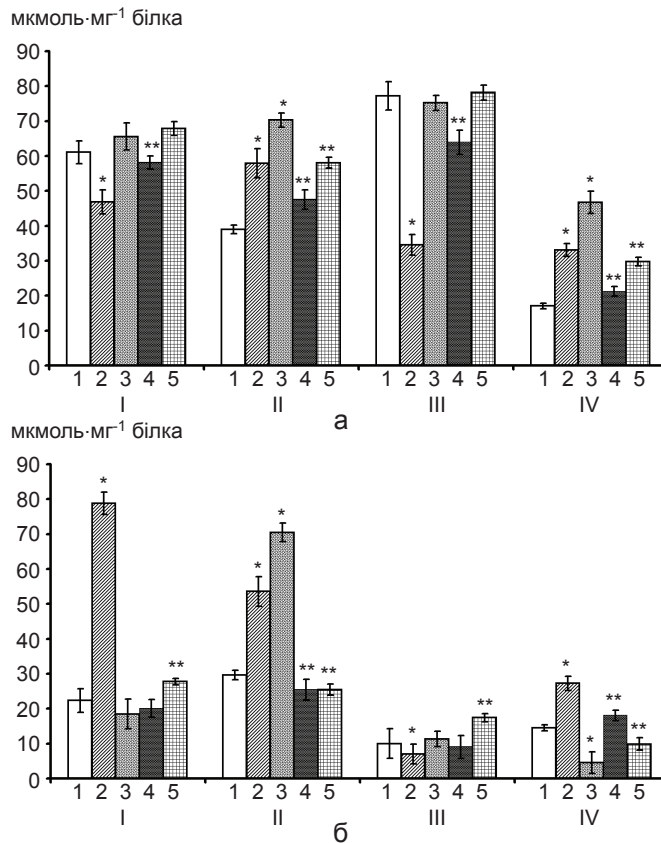


Рис. 2. Вміст моносахаридів глікопротеїнів шлункового та дуоденального слизу в нормі та за умов моделювання стресової та цистеамінової моделі виразкоутворення у щурів та введення екстракту фенугреку: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – цистеамін, 4 – стрес і екстракт фенугреку, 5 – цистеамін і екстракт фенугреку; а – фукоза, б – галактоза, г – нейроацетилнейрамінова кислота, д – гексозаміни. I, III – шлунок, II, IV – дванадцятипала кишка, * $P \leq 0,05$ – достовірно відносно контролю, ** $P \leq 0,05$ – достовірно відносно відповідної моделі уражень

ків. Для відповідних енерго-, ресурсо- та часозатратних процесів потрібний потужний потенціал, за відсутності якого клітина використовує інші механізми. Як відомо, сіалові кислоти забезпечують формування молекулярної сітки слизу, стаючи елементом міжмолекулярних з'єднань ГП. В результаті утворюється структура останніх з вищим ступенем полімеризації, що врешті-решт компенсує незрілість структурних ГП слизу.

Якісно схожий характер розподілу моносахаридів ГП слизу спостерігається і при парціальному аналізі складу ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки за дії цистеаміну. Але треба відмітити, що за цих умов кількісні зміни мають менш виражений характер. Зростання відносної частки NANA ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки відбувалось в основному за рахунок зниження вмісту гексозамінів, а зменшення відносного вмісту таких моносахаридів, як фукоза та галактоза було незначним у порівнянні зі слизовою шлунка за умов експериментальної виразки.

Як свідчать наші результати, характеристики ГП слизу шлунка та ДПК за умов виразкоутворення, мають низку спільних і специфічних рис, які пов'язані з структурно-функціональними відмінностями цих органів. В основі реакції останніх на патологічні процеси виразкоутворення можна чітко виділити два різні механізми: перший – зміни моносахаридного складу ГП, що є характерним як для шлунка, так і ДПК, другий – підвищення загальної кількості моносахаридів ГП слизу, що характерно тільки для ДПК. Здатність останньої значно посилювати нарощування бічних моносахаридних ланцюжків на відміну від шлунка, де загальний рівень глікозилювання ГП практично не змінювався, може бути пов'язаним з різними шляхами слизоутворення. У шлунку слиз продукується в основному спеціалізованими клітинами – мукоцитами, а також деякими іншими, які при його виділенні зберігають свою цілісність, а у

ДПК залозисті клітини злуцуються у просвіт кишки і розпадаються [2, 9, 14]. Таким чином, у ДПК паралельно відбуваються два процеси: з одного боку, інтенсивна фізіологічна регенерація епітелію крипт і ворсинок за рахунок проліферації і спеціалізації епітеліоцитів, а з іншого, – безперервне відторгнення відпрацьованих клітин з утворенням слизу. Отже, можна передбачати, що за умов дії стресу у шлунку та ДПК відбуваються відновлювальні процеси, які забезпечують підвищення резистентності їх слизових оболонок через зростання рівня глікозилювання ГП, без змін відносної частки окремих моносахаридів. За дії цистеаміну зміни відносної частки моносахаридів ГП слизу ДПК є наслідком розвитку виразки ДПК.

Парціальний аналіз складу ГП надепітеліального слизового шару шлунка при виникненні виразки (рис. 3) свідчить про зростання відносної частки NANA з 13 до 47 % та зниження відносної частки решти моносахаридних компонентів при утворенні виразкових дефектів.

Якісно подібний характер розподілу моносахаридів ГП слизу спостерігався і при парціальному аналізі складу ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки (див. рис. 3). При цьому кількісні зміни парціального складу моносахаридів були менш вираженими.

У результаті введення ЕФ шурам з експериментальною виразкою різного походження нормалізувався склад ГП пристінкового шару слизу шлунка та ДПК (див. рис. 1, 2), відновлювався його загальний рівень глікозилювання, вміст окремих моносахаридів. Це може призводити до відновлення його протекторних і бар'єрних властивостей. Встановлений ефект можна пояснити тим, що до складу ЕФ входять полісахариди, які покращують стабільність функціонування клітинних мембран, посилюючи резистентність полісахаридного шару клітин досліджуваних слизових і забезпечуючи противиразковий ефект при будь-якому генезі виразкового уш-

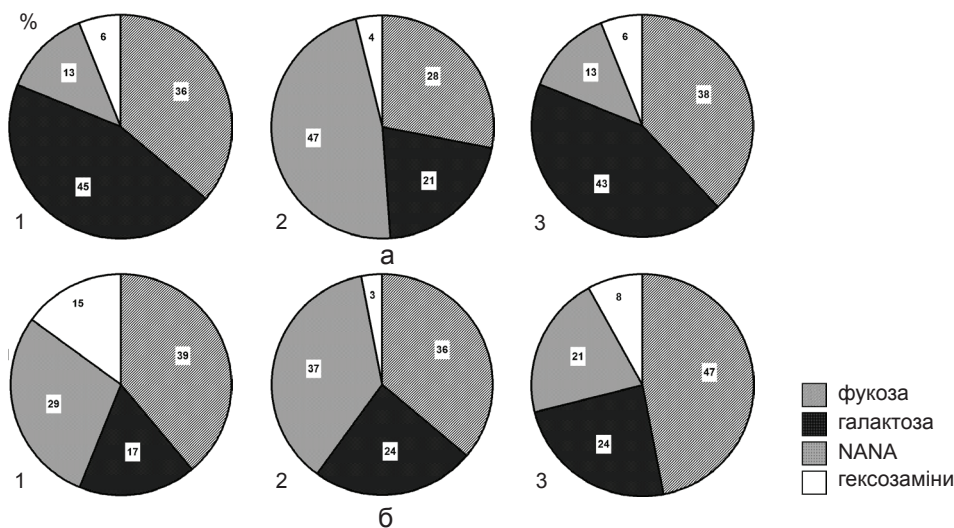


Рис. 3. Співвідношення відносної частки моносахаридних компонентів глікопротеїнів слизу шлунка (а) і дванадцятипалої кишки (б) при експериментальному виразкоутворенні та введенні екстракту фенугреку. На а: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес і екстракт фенугреку, на б: 1 – контроль, 2 – цистеамін, 3 – цистеамін і екстракт фенугреку

кодження [12]. Крім того, продукти розпаду полісахаридного комплексу (олігосахариди) підвищують секрецію власних полісахаридів (гастромукополісахаридів). ЕФ також може проявляти протизапальний ефект. Це пов'язано з наявністю ефірних олій, які крім протимікробної та антивірусної дії мають гальмівний вплив на вільнорадикальні реакції [3, 12]. Комплекс різних за структурою та активністю сполук, які є у ЕФ, завдяки наявності слизистих субстанцій всмоктуються повільно і діють поступово, тривало.

Таким чином, ЕФ завдяки своїм антиоксидантним та цитопротективним властивостям, прискорює регенераційні процеси в слизових і нормалізацію складу ГП шлункового і дуоденального захисного слизу.

ВИСНОВКИ

1. Доведено захисний вплив ЕФ на склад ГП шлункового і дуоденального пристінкового шару слизу, що призводило до нормалізації досліджуваних біохімічних показників захисту клітин слизової оболонки шлунка та ДПК за умов моделювання гострого виразкоутворення у щурів.

2. Отримані результати можуть бути використані у ветеринарії для лікування і профілактики виразкових захворювань.

3. Перспективи подальших досліджень полягають у комплексному вивченні ключових біохімічних показників в модельних експериментах, що допоможе з'ясувати механізми формування виразки та механізмів дії біологічно активних речовин природного походження.

Т.Д. Хилько, И.В. Якубцова,
Т.Д. Преображенская, Л.И. Остапченко

ГЛИКОПРОТЕИНЫ ЖЕЛУДОЧНОЙ И ДУОДЕНАЛЬНОЙ СЛИЗИ ПРИ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА ФЕНУГРЕКА

Проведено сравнительную оценку состава гликопротеинов желудочной и дуоденальной защитной пристеночной слизи в норме, в условиях моделирования язв у крыс и на фоне введения животным с язвенными повреждениями экстракта фенугрека. В норме общий уровень гликозилирования гликопротеинов слизи желудка в 1,7 раза больше, чем в двенадцатиперстной кишке. В условиях стрессовой модели язвообразования в слизи желудка наблюдается уменьшение содержания гексозаминов (в 1,4 раза), галактозы (в 2,2 раза), фукозы (в 1,3 раза) и повышение содержания NANA (в 3,6 раза). При цистеаминовой модели язвообра-

звання в слизи двенадцатиперстной кишки происходило увеличение содержания галактозы (в 2,7 раза), NANA (в 2,4 раза), фукозы (в 1,8 раза), но существенно снижалось содержание гексозаминов в 3 раза по сравнению с контролем. Доказано защитное влияние экстракта фенугрека на состав гликопротеинов пристеночного слоя слизи слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки в условиях моделирования язвообразования у крыс.

Ключевые слова: язва желудка, язва двенадцатиперстной кишки, моносахариды гликопротеинов, экстракт фенугрека.

**T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova,
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko**

GLYCOPROTEINS OF MUCUS OF GASTRIC AND DUODENAL WALL SURFACE DURING ULCEROGENESIS AND THE IMPACT OF FENUGREEK

The comparative evaluation of qualitative and quantitative composition of glycoproteins of gastric and duodenal wall surface layer of protective mucus in the normal, at the modeling of ulcers in rats and at the introduction to animals with ulcerative lesions of fenugreek extract carried out. It was shown in control (normally) the general level of glycosylation of glycoproteins gastric mucus is 1.7 times more than the duodenum. Under acute stress model ulceration in the stomach mucus decrease in hexosamine (1.4 times), galactose (2.2 times), fucose (1.3-fold) and an increase in NANA (3.6 times) observed. Under cysteamine model ulceration in duodenal mucus increase galactose (2.7 times), NANA (2.4 times), fucose (1.8-fold) but significant decrease in the amount of hexosamines 3 times compared to the control occurred. It was proved the protective effect of fenugreek extract to the wall surface mucus of the stomach and duodenum mucosa under conditions modeling ulceration in rats.

Key words: acute model stress of gastric ulcer, cysteamine model of duodenal ulcer, glycoproteins' monosaccharides, fenugreek extract.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка

у крыс // Деп. в ВИНТИ. – 1979. – №3. – С. 19–24.

2. Allen A., Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – **288**, № 1. – P. 1–19.
3. Belguith-Hadriche O., Bouaziz M., Jamoussi K., El Feki A., Sayadi S., Makni-Ayedi F. Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – **58**, № 4. – P. 2116–2122.
4. Clamp J.R. Analysis of glycoproteins // *Biochem. Soc. Symposia.* – 1974. – **40**. – P. 3–16.
5. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes // *Off. J. Europ. Union.* – 2007. – **50**, № L197. – P. 1–89.
6. Ham M., Kaunitz J. D. Gastroduodenal mucosal defense // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2008. – **24**, № 6. – P. 665–673.
7. Drozdowski L., Thomson A. B. Intestinal mucosal adaptation // *World. J. Gastroenterol.* – 2006. – **12**, № 29. – P. 4614–4627.
8. Hamden K., Masmoudi H., Carreau S., Elfeki A. Immunomodulatory, beta-cell, and neuroprotective actions of fenugreek oil from alloxan-induced diabetes // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2010. – № 9. – P. 26–27.
9. Konturek S.J., Konturek P.C., Pawlik T., Sliwowski Z., Ochmanski W., Hahn E.G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2004. – **55**, Suppl 2. – P. 5–17.
10. Nayeib-Hashemi H., Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defense // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2009. – **25**, № 6. – P. 537–543.
11. Noble J.E., Bailey M.J. Quantitation of protein // *Meth. Enzymol.* – 2009. – **463**. – P. 73–95.
12. Rayyan S., Fossen T., Andersen O.M. Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – **58**, № 12. – P. 7211–7217.
13. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Badalamenti J.N. Cysteamine-induced duodenal ulcers: a new model to test antiulcer agents // *Digestion.* – 1974. – **11**, № 3–4. – P. 199–214.
14. Smits H.L., Kramer M.F. Glycoprotein synthesis in the mucous cells of the vascularly perfused rat stomach. III. Mucous cells of the antrum and the duodenal glands // *Amer. J. Anat.* – 1981. – **161**, № 4. – P. 365–374.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: tkhilko@mail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 15.04.2013*

О.М. Пархоменко, О.С. Гур'єва, Ю.В. Корнацький, С.М. Кожухов, О.О. Сопко

Вплив порушення функції нирок на перебіг інфаркту міокарда, ускладненого серцевою недостатністю зі збереженою систолічною функцією лівого шлуночка серця

Для вивчення впливу функції нирок на розвиток ускладнень гострого інфаркту міокарда (ІМ) з елевацією сегмента ST на електрокардіограмі залежно від наявності гострої серцевої недостатності (СН) у хворих із фракцією викиду лівого шлуночка (ФВ ЛШ) > 40 % було оцінено швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) на 1-шу і 3–10-ту добу ІМ. У пацієнтів із ФВ ЛШ > 40 % і ознаками гострої СН (1-ша група, n = 153) ШКФ < 70 мл/хв у перерахунку на одиницю площі поверхні тіла на 3–10-ту добу ІМ виявилася достовірним незалежним маркером ризику повторного ІМ (співвідношення ризиків (СР) з 95% довірчим інтервалом [95 % ДІ] = 4,08 [1,72–11,73], P < 0,005) і смерті від серцево-судинних захворювань (СР [95 % ДІ] = 3,61 [1,09–11,99], P < 0,05). У хворих із ФВ ЛШ > 40 % без ознак гострої СН (2-га група, n = 338) ШКФ < 68 мл/хв є фактором високого ризику смерті протягом трьох років після інфаркту (СР [95 % ДІ] = 7,13 [2,06–24,74], P < 0,005). Значення ШКФ не мали кореляції із рівнем маркерів ушкодження міокарда. В 1-й групі ШКФ на 3–10-ту добу ІМ має достовірну негативну кореляцію з фактором некрозу пухлини α та фактором росту ендотелію судин і тривалістю реєстрації симптомів гострої СН. У 2-й групі ШКФ не корелює із рівнем маркерів активації системного запального процесу та функції ендотелію, що свідчить про різні механізми розвитку дисфункції нирок у пацієнтів із збереженою систолічною функцією ЛШ з проявами СН та без них на 1-шу добу ІМ з елевацією сегмента ST.

Ключові слова: інфаркт міокарда, гостра серцева недостатність, функція нирок, системне запалення.

ВСТУП

Відомо, що порушення діяльності серця при гострому інфаркті міокарда (ІМ) та серцевій недостатності (СН) впливають на функцію нирок за рахунок гуморальних механізмів, зокрема дії натрій-уретичних гормонів, що призводить до збільшення виділення натрію та води і розглядається як компенсаторні механізми, а також гемодинамічних механізмів, порушення функції ендотелію судин [10].

В останні роки все більше накопичується даних про суттєве значення ниркової дисфункції в патогенезі гострої СН та про вплив функції нирок на перебіг ІМ [4, 8, 13, 21, 22]. Так, Vasaiwala та співавт. у 80 % хворих

© О.М. Пархоменко, О.С. Гур'єва, Ю.В. Корнацький, С.М. Кожухов, О.О. Сопко

з гострим ІМ виявили зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) менше ніж 90 мл/хв у перерахунку на одиницю площі (1,73 м²) і було доведено, що наявність порушення функції нирок є незалежним фактором ризику летальності [22]. Також відомо про взаємозв'язок ниркової дисфункції зі зниженням систолічної функції лівого шлуночка (ЛШ) [3, 11], синдромом гострої СН, наступним формуванням стійкої застійної СН і повторним ІМ [1, 2, 5, 14, 19]. Проте в сучасній літературі практично відсутні відомості про вплив порушень ниркової функції на розвиток ускладнень ІМ у пацієнтів із відносно збереженою систолічною функцією ЛШ і клінічними ознаками гострої СН.

Метою нашої роботи було вивчення показників функції нирок і можливих механізмів їх впливу на перебіг ІМ у пацієнтів з фракцією викиду ЛШ понад 40 % і розвитком гострої СН на 1-шу добу захворювання.

МЕТОДИКА

Роботу виконано на основі ретроспективного аналізу бази даних пацієнтів з ІМ, які знаходилися на стаціонарному лікуванні у відділенні реанімації та інтенсивної терапії національного наукового центру «Інститут кардіології ім. академіка М.Д. Стражеска» НАМН України протягом 1995–2010 рр. та проспективного спостереження за віддаленими наслідками захворювання. Основними критеріями включення були: гострий коронарний синдром з елевацією сегменту ST на ЕКГ, госпіталізація у стаціонар протягом перших 24 год від початку розвитку симптомів захворювання, фракція викиду ЛШ ІМ більше ніж 40 % за даними ехокардіографічного дослідження. Ехокардіографічне обстеження проводили на 1-шу і 10-ту добу ІМ. Діагноз ІМ та лікування відповідали чинним рекомендаціям Європейського товариства кардіологів та Української асоціації кардіологів з діагностики і лікування ІМ з елевацією сегменту ST [6, 7]. Залежно від клінічних ознак гострої СН ретроспективно було сформовано для аналізу дві групи хворих – з наявністю ознак гострої СН за 1-шу добу захворювання (І група, 153 хворих) та без них (ІІ група, 338 хворих).

У пацієнтів при надходженні у стаціонар (n = 491) та в період з 3-ї по 10-ту добу ГІМ (n = 469) досліджували вміст креатиніну у сироватці крові з використанням реагентів фірми “Cormay” (Польща) та “BioSystems” (Іспанія) на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі. ШКФ визначали за формулою: $ШКФ = 186 \times (\text{креатинін сироватки})^{-1,154} \times (\text{вік})^{-0,208} \times (0,742 \text{ для жінок}) \times (1,210 \text{ для афроамериканців})$, де ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації (мл/хв у розрахунку на одиницю площі тіла, яка дорівнює 1,73 м²), вік – у

роках, креатинін сироватки – у мг/дл [15].

Також визначали максимальний рівень “muscle-brain” фракції сироваткової креатинфосфокінази (МВ-КФК) з інтервалом в 4 год протягом перших 2–4 діб захворювання, залежно від часу нормалізації ферментемії МВ-КФК (n = 215). На 1-шу і 10-ту добу оцінювали вміст С-реактивного білка (СРБ). Вміст імунотурбодиметричним методом з використанням діагностичного набору “Cormay” (Польща) за допомогою багатофункціонального біохімічного аналізатора (n = 234 і n = 190 відповідно), фактора некрозу пухлини α (ФНП-α) на напівавтоматичному імунологічному фотометрі твердофазним імуноферментним методом з використанням набору реагентів Pro Con ФНП - α (Росія; n = 116 і n = 90 відповідно), фактора росту ендотелію судин (ФРЕС); імуно-ферментним методом (n = 91 і n = 83 відповідно).

Статистичний аналіз проведено за допомогою програми SPSS 11.0 з використанням теста Фішера, χ²-теста Мантел-Хенсела, критерію t Стьюдента, непараметричного тесту Вілкоксона, тесту Манна-Уїтні, непараметричного кореляційного аналізу Спірмена, аналізу виживання Каплана-Мейера та логранк-тесту, покрокового регресійного аналізу Кокса. Критерієм достовірності відмінностей вважали P < 0,05. Для визначення значущості ШКФ як маркера ризику несприятливих наслідків ІМ у віддаленому періоді було проведено визначення значень показників із максимальною чутливістю та специфічністю за допомогою побудування ROC-кривих (receiver operating curve) [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При вивченні характеристик обстежених виявилось, що в 1-й групі в порівнянні з 2-ю групою пацієнти були старші за віком (57,88±0,77 років 54,25±0,54 відповідно), у них переважала передньо-бокова локалізація ІМ (60,13 %, n = 92 щодо 44,02%, n = 151, P < 0,01) і розмір некрозу міокарда був біль-

шим. Також в 1-й групі спостерігалися нижчі значення фракції викиду ЛШ на 1-шу добу захворювання ($47,97 \pm 0,46$ % щодо $50,56 \pm 0,39$ %, $P < 0,05$) та на 10-ту добу ($48,97 \pm 0,77$ % щодо $50,52 \pm 0,48$ %, $P < 0,05$), формувалася гостра аневризма ЛШ ($15,69$ %, $n = 24$ щодо $4,86$ %, $n = 17$, $P < 0,05$). Частіше розвивався повторний ІМ ($12,4$ %, $n = 19$ щодо $6,41$ %, $n = 22$, $P < 0,05$) та реєструвалася смерть від серцево-судинних захворювань протягом 3 років ($12,4$ %, $n = 15$ щодо $3,47$ %, $n = 15$, $P < 0,05$).

У 1-й групі ШКФ за 10-ту добу була достовірно нижчою, ніж в 2-й групі порівняння ($77,15 \pm 1,93$ щодо $81,96 \pm 1,14$ мл/хв, $P < 0,01$; табл. 1).

При вивченні можливості передбачення несприятливого перебігу захворювання за допомогою оцінки ШКФ виявилось, що в обох групах хворих вихідні значення ниркової функції при госпіталізації з приводу гострого ІМ, не мали кореляції із розвитком повторного інфаркту і виживанням хворих при тривалому спостереженні. Але нами були отримані достовірні результати про

взаємозв'язок ШКФ на 3–10-ту добу із розвитком повторного ІМ і з настанням смерті від серцево-судинних захворювань протягом 3 років і інформативність показників ниркової функції як маркера ризику ускладнень цього захворювання.

В 1-й групі обстежених пацієнтів із повторним ІМ протягом 3 років, ШКФ на 3–10-ту добу захворювання були достовірно вищими порівняно зі значеннями у хворих без розвитку цього ускладнення ($64,90 \pm 4,07$ щодо $81,32 \pm 2,49$ мл/хв). За допомогою статистичної методики побудування ROC-кривих, яка в цей час є стандартною, найбільш точною і широко використовується в наукових дослідженнях [16] визначено, що ШКФ на 3–10-ту добу ІМ має чутливість 75 % і специфічність 69 % у виявленні хворих високого ризику повторного інфаркту. У 1-й групі обстежених при ШКФ ІМ менше ніж 70 мл/хв, співвідношення шансів (СШ) розвитку повторного інфаркту становило $4,84:1$ із відповідними довірчими інтервалами (ДІ) – (СШ [95 % ДІ] = $4,84$ [1,55–15,15], $P < 0,05$).

Таблиця 1. Оцінка маркерів показників функції нирок та активації системного запалення у хворих з гострим інфарктом міокарда з елевацією сегменту ST на електрокардіограмі залежно від наявності гострої серцевої недостатності

Показники	n	1-ша група (M ± m)	n	2-га група (M ± m)
Швидкість клубочкової фільтрації, мл/хв				
1-ша доба	153	$79,94 \pm 2,03$	338	$83,42 \pm 1,25$
10-та доба	142	$77,15 \pm 1,93^*$	327	$81,96 \pm 1,14$
МВ (muscle-brain)-фракція креатинфосфокінази, мкат/л	73	$0,26 \pm 0,01^{**}$	142	$0,22 \pm 0,01$
Розмір некрозу міокарда, г	73	$91,09 \pm 8,92^{**}$	142	$70,93 \pm 3,45$
Фактор некрозу пухлини α , пкг/л				
1-ша доба	38	$67,37 \pm 15,02$	78	$75,90 \pm 13,31$
10-та доба	31	$71,23 \pm 18,93$	59	$73,81 \pm 16,96$
Фактор росту ендотелію судин, пкг/л				
1-ша доба	28	$798,401 \pm 394,16$	63	$254,56 \pm 114,69$
10-та доба	25	$656,97 \pm 262,24$	58	$330,32 \pm 49,243$
С-реактивний білок, ммоль/л				
1-ша доба	78	$29,44 \pm 2,54^*$	156	$22,28 \pm 1,40$
10-та доба	67	$11,52 \pm 1,13$	123	$10,48 \pm 0,84$

Примітка. Тут і в табл. 2 * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Тобто повторний ІМ розвивався в 4,8 раза частіше, ніж у хворих із вищими значеннями цього показника. Також було проведено визначення незалежного значення показників ниркової функції за допомогою покрокового регресійного аналізу пропорційного ризику розвитку повторного ІМ із урахуванням клініко-анамнестичних характеристик пацієнтів (віку, статі, хронічної СН в анамнезі, наявності ішемічних ускладнень в стаціонарному періоді ІМ; рис.1).

Таким чином, результати проведеного статистичного аналізу підтвердили незалежне значення ШКФ < 70 мл/хв на 3–10-ту добу ІМ як маркера ризику повторного інфаркту в 1-й групі хворих, який є в 4 рази вищим, ніж у хворих з цим показником понад 70 мл/хв на одиницю площі (СР [95 % ДІ] = 4,08 [1,72–11,73], $P < 0,005$; див. рис. 1). У 2-й групі хворих значення ШКФ при розвитку повторного ІМ та без ускладнення не відрізнялися.

Найбільш інформативними для оцінки ризику смерті від серцево-судинних захворювань протягом трирічного періоду після перенесеного ІМ були також показники функції нирок, які визначалися на 3–10-ту добу захворювання. В 1-й групі обстежених,

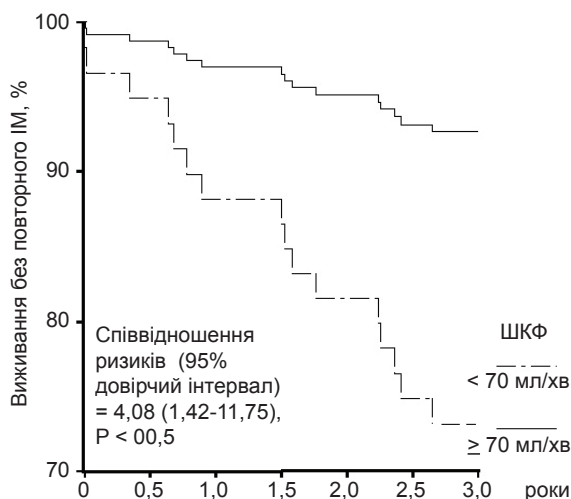


Рис. 1. Порівняння часу до розвитку повторного інфаркту міокарда (ІМ) протягом трьох років у хворих 1-ї групи залежно від показників швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ)

які померли протягом трьох років ШКФ була значно нижчою порівняно з людьми, які вижили: $65,78 \pm 3,97$ щодо $79,24 \pm 2,33$ мл/хв ($P < 0,05$). При виявленні ШКФ нижче ніж 70 мл/хв частота настання смерті після ІМ була в 3,4 раза вищою, ніж у хворих з більшими значеннями цього показника (СШ [95 % ДІ] = 3,44 [1,07–11,07], $P < 0,05$).

У 2-й групі ШКФ на 3–10-ту добу захворювання також була вищою у пацієнтів, які померли протягом трьох років після ІМ, ніж у тих, що вижили ($65,78 \pm 3,97$ щодо $79,24 \pm 2,33$ мл/хв, $P < 0,05$). При ШКФ менше 68 мл/хв летальні випадки спостерігалися майже у 8 разів частіше (СШ [95 % ДІ] = 7,68 [2,28–35,95], $P < 0,001$).

Для з'ясування незалежного значення показників функції нирок в оцінці ризику смерті в обох групах було проведено покроковий регресійний аналіз пропорційного ризику Кокса із урахуванням клініко-анамнестичних характеристик пацієнтів (рис. 2).

При ШКФ, яка не перевищує 70 мл/хв, ризик смерті у 1-й групі хворих був у 3,6 рази більший, ніж при вищих значеннях цього показника (СР [95 % ДІ] = 3,61 [1,09–11,99], $P < 0,05$).

У 2-й групі обстежених пацієнтів, за результатами регресійного аналізу, ШКФ < 68 мл/хв на одиницю площі на 3–10-ту добу захворювання є незалежним маркером ризику смерті протягом трьох років після ІМ (СР [95 % ДІ] = 7,13 [2,06–24,74], $P < 0,005$; див. рис.2,б).

Отримані результати свідчать, що у більшій частині хворих на ІМ зі збереженою систолічною функцією реєструються порушення функції нирок. Здебільшого вони пов'язані з чинниками, які викликають прогресування атеросклерозу, погіршення функції ендотелію (гіпертензія, цукровий діабет, паління тощо). Відповідно до міжнародних класифікацій взаємодії серця та нирок слід відмітити, що у хворих на ІМ найчастіше виявляється кардіоренальний синдром І типу (за міжнародною класифікацією ADQI

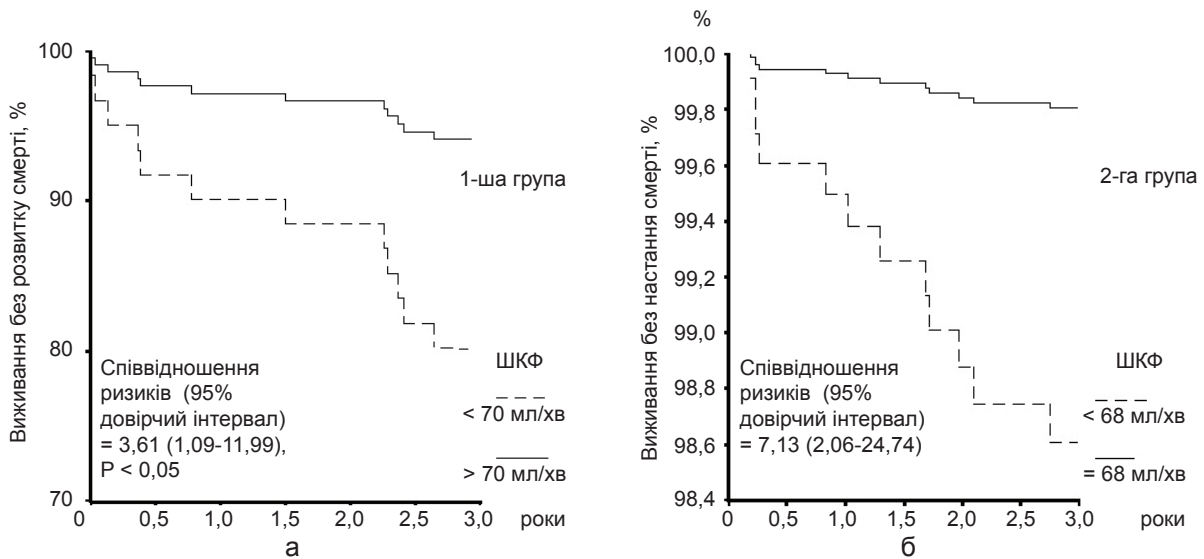


Рис. 2. Порівняння часу до настання смерті від серцево-судинних захворювань протягом трьох років залежно від швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ)

– Acute Dialysis Quality Initiative) [1, 5, 12]. Особливо це має значення при погіршенні стану хворого (навіть за наявності відносно стабільної системної гемодинаміки та збереженої систолічної функції). Найгірший прогноз спостерігається у хворих зі зниженням функції нирок під час початкового періоду ІМ (перші 10 діб), як з ознаками СН, так і без них. Це ставить питання про патогенетичні механізми такої патофізіологічної ситуації. Деякі автори доводять, що це може бути поєднано з активацією системного запального процесу, дисфункцією ендотелію [9, 17, 18]. У частини хворих із ІМ та анамнестичними даними про супутню кардіальну патологію (ішемічну хворобу серця, артеріальну гіпертензію, СН в анамнезі) також спостерігають ознаки кардіоренального синдрому II типу. Проте не виключено, наведені вище механізми можуть відігравати різну роль при наявності і відсутності ознак СН.

За результатами проведеного кореляційного аналізу виявилось що в обох групах хворих ШКФ не корелювала зі значеннями МВ-КФК, розміру некрозу міокарда, СРБ. Виявилось, що в 1-й групі негативний вплив ШКФ був взаємопов'язаний із активацією за-

пального процесу, про що свідчить негативна його кореляція із ФНП- α і ФРЕС відповідно (табл. 2). У 2-й групі не було виявлено достовірної кореляції між ШКФ та активацією системного запального процесу.

Таким чином, в обох групах хворих порушення функції нирок може бути достовірним маркером ризику смерті від серцево-судинних захворювань і не має значної кореляції із розмірами некрозу міокарда. Тобто ниркова дисфункція у хворих з ІМ зі збереженою систолічною функцією ЛШ не є зумовленою безпосередньо гемодинамічними механізмами внаслідок зниження серцевого викиду. Порушення ниркової функції у хворих 1-ї групи має складне патофізіологічне підґрунтя, де важливе місце посідають активація системного запального процесу і функція ендотелію судин, і ймовірно має механізми розвитку, які відрізняються від таких у пацієнтів 2-ї групи.

Подальший пошук, виявлення реальних механізмів прогресування гострого пошкодження нирок в перші доби гострого ІМ допоможуть обґрунтувати і розробити нову стратегію лікування таких важких хворих для попередження не лише госпітальних, але і віддалених ускладнень і смерті.

Таблиця 2. Кореляційний аналіз показників швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) на 1-шу та 5-ту добу із показниками ушкодження міокарда, активації системного запального процесу і фактором росту ендотелію судин залежно від наявності серцевої недостатності на 1-шу добу інфаркту

Показники	1-ша група				2-га група			
	1-ша доба		3–10-та доба		1-ша доба		3–10-та доба	
	n	r	n	r	n	r	n	r
МВ (muscle-brain)-фракція креатинфосфокінази	69	-0,011	60	0,241	130	0,079	101	-0,039
Розмір некрозу міокарда	69	-0,044	60	-0,052	130	0,060	101	0,136
Фактор некрозу пухлини α								
1-ша доба	37	-0,470**	36	-0,416*	66	-0,057	57	-0,012
10-та доба	30	-0,528**	30	-0,393*	54	-0,198	46	-0,137
С-реактивний білок								
1-ша доба	75	-0,054	70	-0,015	145	0,011	132	-0,075
10-та доба	65	0,124	62	0,022	117	0,068	109	-0,151
Фактор росту ендотелію судин								
1-ша доба	28	-0,324*	28	-0,401*	60	0,103	55	0,120
10-та доба	25	-0,408*	25	-0,426*	57	0,052	51	-0,078

ВИСНОВКИ

1. Зниження функції нирок на 3–10-ту добу гострого ІМ (ШКФ < 70 мл/хв·на одиницю площі поверхні тіла) є достовірним маркером ризику повторного інфаркту (співвідношення ризиків = 4,1) і смерті від серцево-судинних захворювань під час трирічного спостереження (співвідношення ризиків = 3,6) у хворих із фракцією викиду ЛШ > 40 % і ознаками гострої СН.

2. Початкові ознаки ниркової дисфункції (ШКФ < 68 мл/хв) є фактором високого ризику смерті протягом трьох років після гострого ІМ з елевацією сегмента ST на ЕКГ у хворих із фракцією викиду ЛШ > 40 % без ознак гострої СН (співвідношення ризиків = 7,1).

3. У хворих с проявами гострої СН та відносно збереженою систолічною функцією ЛШ зниження функції нирок може бути пов'язано з активацією прозапального процесу, про що свідчить негативна кореляція ШКФ із ФНП- α і ФРЕС.

**А.Н. Пархоменко, О.С. Гур'єва,
Ю.В. Корнацький, С.Н. Кожухов, А.А. Сопко**

ВЛИЯНИЕ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕК НА ТЕЧЕНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА, ОСЛОЖНЕННОГО СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ С СОХРАНЕННОЙ СИСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИЕЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА

С целью изучения влияния функции почек на развитие осложненной острой инфаркта миокарда (ИМ) с элевацией сегмента ST на электрокардиограмме в зависимости от наличия острой сердечной недостаточности (СН) у пациентов в фракцией выброса левого желудочка (ЛЖ) > 40 % были оценены значения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) на 1-е и 3–10-е сутки ИМ. У пациентов с острой СН (1-я группа, n = 153) СКФ < 70 мл/мин. В перерасчете на единицу площади поверхности тела на 3–10-е сутки ИМ является независимым маркером риска повторного ИМ (соотношение рисков (СР) и 95 % интервал достоверности (ИД) = 4,08 [1,72–11,73], P < 0,005) и смерти от сердечно-сосудистых заболеваний (СР [95 % ИД] = 3,61 [1,09–11,99], P < 0,05). У пациентов без острой СН (2-я группа, n = 338) СКФ < 68 мл/час·мин является фактором риска смерти в течение трех лет после ИМ (СР [95 % ИД] = 7,13 [2,06–24,74], P < 0,005). Значения СКФ не имели достоверной корреляции с размером некроза миокарда. В 1-й группе СКФ на 3-и-10-и сутки ИМ имеет достоверную обратную корреляцию с фактором некроза опухоли α и уровнем фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), а также длительностью регистрации симптомов

острой СН. Во 2-й групі СКФ не корелюють з рівнем маркерів активації системного запалення і ФРЭС, що свідечує в користь наявності різних механізмів розвитку дисфункції нирок у пацієнтів з наявністю і без симптомів острої СН.

Ключові слова: інфаркт міокарда, остра серцева недостаточність, функція нирок, системне запалення.

**O.M.Parkhomenko, O.S. Gurjeva,
Yu. V. Kornatsky, S.N.Kozhukhov, O.O.Sopko**

IMPACT OF RENAL DYSFUNCTION ON CLINICAL COURSE OF MYOCARDIAL INFARCTION COMPLICATED BY ACUTE HEART FAILURE IN PATIENTS WITH PRESERVED SYSTOLIC FUNCTION

Aiming to assess the relationships between renal function and ST-segment elevation myocardial infarction (MI) clinical course and remote outcomes in patients with preserved systolic left ventricular (LV) function (LV ejection fraction >40%) estimated glomerular filtration rates (eGFR) were evaluated on 1st and 3rd-10th MI day (n = 491). On 3rd-10th day of MI in patients with acute heart failure (HF) symptoms on admission day (1st group, n = 153) eGFR < 70 ml/min · per body surface unit was independent marker of re-infarction (Hazard Ratio (HR) with 95% confidence intervals (95% CI) = 4,08 [1,72 – 11,73], P < 0,01) and cardiovascular death (CVD) (HR [95% CI] = 3,61 [1,09 - 11,99], P = <0,05) during three years of follow-up. In patient without acute HF (2nd group, n = 338) eGFR < 68 ml/min was predictive of CVD within three years post-MI (HR [95% CI] = 7,13 [2,06 – 24,74], P = 0,002). eGFR did not correlate with myocardial damage markers. In the 1st group eGFR on the 3rd MI day was negatively correlated with tumor-necrosis factor alpha (TNF-α) and vascular endothelial growth factor levels. There were no correlation between systemic inflammation activation with eGFR in 2nd study group indicating different mechanisms of renal dysfunction in patients with and without acute HF and preserved LV function. Key words: myocardial infarction, acute heart failure, renal function, systemic inflammation.

National Science Centre "M.D. Strazhesko Institute of Cardiology NMAS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Al Suwaidi J., Reddan D.N., Williams K., Pieper K.S., Harrington R.A., Califf R.M. Prognostic implications of abnormalities in renal function in patients with acute coronary syndromes // *Circulation*. – 2002. – **106**. – P.974–980.
2. Anavekar N.S., Solomon S.D., McMurray J.J., Maggioni A., Rouleau J.L., Califf R. Comparison of renal function and cardiovascular risk following acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus

// *Amer. J. Cardiol.* – 2008. – **101**. – P.925–929.

3. Anzai A., Anzai T., Naito K., Kaneko H., Mano Y., Jo Y., Nagatomo Y., Maekawa Y., Kawamura A., Yoshikawa T., Ogawa S. Prognostic significance of acute kidney injury after reperfused ST-elevation myocardial infarction: synergistic acceleration of renal dysfunction and left ventricular remodeling // *J. Cardiol. Fail.* – 2010. – **16**. – P.381–389.
4. Bruetto R.G., Rodrigues F.B., Torres U.S., Otaviano A.P., Zanetta D.M., Burdmann E.A. Renal function at hospital admission and mortality due to acute kidney injury after myocardial infarction // *PLoS One*. – 2012. – **7**(4). – P. 3546–3549.
5. Davenport A., Anker S.D., Mebazaa A., Palazzuoli A., Vescovo G., Bellomo R., Ponikowski P., Anand I., Aspromonte N., Bagshaw S., Berl T., Bobek I., Cruz D.N., Daliento L., Haapio M., Hillege H., House A., Katz N., Maisel A., Mankad S., McCullough P., Ronco F., Shaw A., Sheinfeld G., Soni S., Zamperetti N., Zanco P., Ronco C. Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) consensus group. ADQI 7: the clinical management of the Cardio-Renal syndromes: work group statements from the 7th ADQI consensus conference // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2010. – **25**. – P.2077–2089.
6. De Werf F.V., Bax J., Betriu A., Blomstrom-Lundqvist C. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology // *Europ. Heart J.* – 2008. – **29**. – P.2909–2945.
7. Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G., McMurray J.J., Ponikowski P., Poole-Wilson P.A., Strömberg A., van Veldhuisen D.J., Atar D., Hoes A.W., Keren A., Mebazaa A., Nieminen M., Priori S.G., Swedberg K. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) // *Eur. Heart J.* – 2008. – **29**(19). – P.2388–2442.
8. Gibson C.M., Pinto D.S., Murphy S.A., Morrow D.A., Hobbach H.P., Wiviott S.D. Association of creatinine and creatinine clearance on presentation in acute myocardial infarction with subsequent mortality // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2003. – **42**. – P.1535–1543.
9. González M., Ruiz-Ros J.A., Pérez-Paredes M., Lozano M.L., García-Almagro F.J., Martínez-Corbalán F., Giménez D.M., Carrillo A., Carnero A., Cubero T., González J.J., Ureña I., Vicente V. Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2007. – **60**. – P.1233–1241.
10. Haase M., Müller C., Damman K., Murray P.T., Kellum J.A., Ronco C., McCullough P.A. Pathogenesis of Cardio-renal Syndrome Type 1 in Acute Decompensated Heart Failure: Workgroup Statements from the Eleventh Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative

- (ADQI) // *Contrib. Nephrol.* – 2013. – **182**. – P.99–116.
11. Hamdan A., Kornowski R., Solodky A., Fuchs S. Predictors of left ventricular dysfunction in patients with first acute anterior myocardial infarction undergoing primary angioplasty // *Israel Med. Assoc. J.* – 2006. – **8**. – P.532 – 525.
 12. Ismail Y., Kasmikha Z., Green H.L., McCullough P.A. Cardio-renal syndrome type 1: epidemiology, pathophysiology, and treatment // *Semin. Nephrol.* – 2012. – **32**. – P.18–25.
 13. Langston R.D., Presley R., Flanders W.D., McClellan W.M. Renal insufficiency and anemia are independent risk factors for death among patients with acute myocardial infarction // *Kidney Internat.* – 2003. – **64**. – P.1398–1405.
 14. Latchamsetty R., Fang J.M., Kline-Rogers E., Mukherjee D., Otten R.F., LaBounty T.M. Prognostic value of transient and sustained increase in in-hospital creatinine on outcomes of patients admitted with acute coronary syndrome // *Amer. J. of Cardiol.* – 2007. – **99**. – P.939–942.
 15. Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B., Greene T., Rogers N., Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – **130**. – P.461–470.
 16. Mossman D., Somoza E. ROC curves, test accuracy, and the description of diagnostic tests // *J. Neuropsych. and Clin. Neurosc.* – 1991. – **3**(3). – P.330–333.
 17. Mielniczuk L.M., Pfeffer M.A., Lewis E.F., Blazing M.A., de Lemos J.A., Mohanavelu S., Rouleau J., Fox K., Pedersen T.R., Califf R.M. Acute decline in renal function, inflammation, and cardiovascular risk after an acute coronary syndrome // *Clin. J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2009. – **4**. – P.1811–1817.
 18. Mielniczuk L.M., Pfeffer M.A., Lewis E.F., Blazing M.A., de Lemos J.A., Shui A. Estimated glomerular filtration rate, inflammation, and cardiovascular events after an acute coronary syndrome // *Amer. Heart J.* – 2008. – **155**. – P.725–731.
 19. Parikh C.R., Coca S.G., Wang Y., Masoudi F.A., Krumholz H.M. Long-term prognosis of acute kidney injury after acute myocardial infarction // *Arch. Intern. Med.* – 2008. – **168**. – P. 987–995.
 20. Ronco C., McCullough P., Anker S.D., Anand I. Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) consensus group. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative // *Europ. Heart J.* – 2010. – **31**. – P.703–711.
 21. Smith G.L., Masoudi F.A., Shlipak M.G., Krumholz H.M., Parekh C.R. Renal impairment predicts long-term mortality risk after acute myocardial infarction // *J. Amer. Society Nephrol.* – 2008. – **19**. – P. 141–150.
 22. Vasaiwala S., Cannon C.P., Fonarow G.C., Peacock W.F., Laskey W., Schwamm L.H., Liang L., Hernandez A.F., Peterson E.D., Rosas S.E., Bhatt D.L. Quality of care and outcomes among patients with acute myocardial infarction by level of kidney function at admission: report from the get with the guidelines coronary artery disease program // *Clin. Cardiol.* – 2012. – **35**. – P.541–547.

ДУ «Нац. наук. центр «Ін-т кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска» НАМН України
E-mail: ogurjeva@yahoo.com

Матеріал надійшов до редакції 25.06.2013

Н.М. Веселовська, З.Ф. Веселовська, І.М. Слободянюк, М.І.Слободянюк

Вплив умов професійної діяльності лікарів-мікрохірургів на ризик розвитку судинної патології органа зору

В роботі досліджено динаміку регіонального та системного кровообігу та особливості нейроархітекτονіки сітківки ока в умовах тривалої дії професійного навантаження у лікарів хірургічного та терапевтичного профілю. Визначено, що у лікарів-мікрохірургів тривала робота в операційній призводить до більш значних змін показників гемодинаміки на рівні очної артерії та магістральних судин шії, ніж у лікарів терапевтичного профілю. Слід відмітити, що у лікарів-мікрохірургів збільшені основні томографічні показники нейроархітекτονіки сітківки, що в сукупності з регулярними змінами кровообігу в системі очної артерії внаслідок професійного навантаження створює умови підвищеного ризику судинних захворювань органа зору.

Ключові слова: ризик, судинна патологія, нейроархітектоніка, сітківка, зоровий нерв, оптико-когерентна томографія, ультразвукова доплерографія.

ВСТУП

В останні роки в Україні та світі щорічно зростає поширеність системних судинних захворювань та їх ускладнень. За аналізом професійної патології медичних працівників визначено, що в структурі захворюваності лікарів хірургічного профілю кардіоваскулярна патологія теж зайняла пріоритетні позиції [1, 6, 8, 9]. Постійне психоемоційне та нервово навантаження, тривале статичне напруження від вимушеного положення тіла під час операцій сприяють ризику розвитку функціональних порушень судинної, нервової та зорової систем [1, 3, 4, 7]. Більше того, тривале професійне навантаження з частими стресами може призвести до розвитку синдрому «професійного вигорання», а робота за операційним мікроскопом, яка супроводжується значним зоровим навантаженням, може спричиняти функціональні розлади акомодатції, гостроти зору, світлової та кольорової чутливості, [2, 5, 1, 6, 9]. Враховуючи тяжкий перебіг очних ускладнень

системних судинних захворювань, вивчення особливостей морфофункціонального стану очей дає можливість оцінити ризик розвитку судинної патології органа зору у лікарів мікрохірургічного профілю в умовах тривалої дії професійного навантаження. В сучасній літературі таких відомостей немає.

Мета роботи – вивчення морфофункціональних особливостей органа зору у лікарів хірургічного профілю за даними прижиттєвого морфологічного аналізу нейроархітектоніки сітківки та доплерографічного обстеження регіонального кровообігу.

МЕТОДИКА

Обстежено 90 лікарів віком від 30 до 60 років ($45,8 \pm 14,2$ роки): 60 лікарів-мікрохірургів (30 офтальмохірургів та 30 судинних хірургів), а також 30 лікарів терапевтичного профілю (15 терапевтів та 15 невропатологів), які були розподілені на шість груп: I, II, III групи (основні) – лікарі-мікрохірурги; IV, V, VI групи

© Н.М. Веселовська, З.Ф. Веселовська, І.М. Слободянюк, М.І.Слободянюк

(контрольні) – лікарі терапевтичного профілю. До I групи ввійшли особи віком від 30 до 40 років (чоловіків 16, жінок 4), до II групи – від 41 до 50 років (чоловіків 14, жінок 6), до III групи – від 51 до 60 років (чоловіків 14, жінок 6), до IV – 10 жінок-терапевтів віком від 30 до 40 років, до V – 10 терапевтів віком від 41 до 50 років (чоловіків 2, жінок 8), до VI – 10 терапевтів віком від 51 до 60 років (чоловіків – 1, жінок – 9).

Офтальмологічне обстеження включало визначення гостроти зору, рефракції на авторефрактометрі «Humphry» (Німеччина), внутришньоочного тиску на безконтактному тонометрі АТ-550 (США), комп'ютерну квантитативну кампіпериметрію (КККП) на комп'ютерному периметрі «Humphrey field analyzer» (Німеччина), оптично-когерентну томографію сітківки та зорового нерва на ОКТ «Стратус-3000» (США) та ультразвукове доплерографічне обстеження судин на апараті MyLab 25 («Esaote», Італія). Товщину сітківки макулярної ділянки та шару нервового волокна аналізували за програмами «Macula» та «Optic nerve fibers». Аналіз комплексу гангліозних клітин сітківки визначали за розробленим нами способом (декларційний патент України на корисну модель № №77115 від 25.01. 2013). Методика дослідження полягає в тому, що через 15 хв після інстиляції очних крапель 0,5%-го розчину мідріацилу для досягнення мідріазу виконують безконтактну оптично-когерентну томографію сітківки за програмою «Macula» та «Optic nerve fibers». На комп'ютерних томограмах макулярної ділянки в мануальному режимі проводять ідентифікацію гангліозного шару та вибіркового комп'ютерний вимір товщини обраних зон з інтервалом в 10 мкм по меридіанах з інтервалом 30^0 від 0 до 500 мкм, результати якого фіксують у таблицях. Математичне обчислення результатів дає змогу отримати повну характеристику комплексу гангліозних клітин сітківки, сформуванню цифрову та кольорову картограму, визначити його зміни за числовими показниками та провести

порівняльний аналіз з даними ОКТ за програмою «Макула» та «Товщина шару нервового волокна». Схема дослідження включала проведення відповідної діагностики з подвійною ультразвуковою доплерографією судин до та після операційного дня тривалістю 4–5 год, на початку та по закінченні робочого дня тривалістю 5–6 год у лікарів терапевтичного профілю (контроль) з реєстрацією індексу резистентності (IP), максимальної систолічної (V_c) та кінцевої діастолічної швидкостей течії крові (V_d).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У лікарів усіх вікових груп визначений рівномірний розподіл рефракції: еметропії, міопії ($\leq - 3,0$ Д) та гіперметропії слабого ступеня ($\leq +2,0$ Д) у співвідношенні 30, 35 та 35 % у групі I, 35, 40, 25 % у групі II, 30, 40, 30 % у групі III. Рівень гостроти зору був 0,9 та 1,0 з корекцією окулярами у 100 % обстежених осіб. Результати КККП показали, що патологічних змін у основних і контрольних групах не було визначено: чутливість сітківки становила $2119,45 \pm 32,12$ та $2212,32 \pm 44,21$ Гц. У результаті ультразвукової доплерографії (УЗДГ) визначені деякі вікові відмінності кровообігу у всіх досліджених судинах, які характеризувалися поступовим зменшенням значень V_c та V_d (табл. 1). Для очної артерії характерне незначне зниження V_c (2,9–3,5 %), V_d (4,0–5,8 %) та IP (1,5–4,4 %) в групі II. У групі III спостерігали зменшення V_c в очній артерії (3,2–3,8 %) та IP (1,5–4,5 %) при збільшенні V_d (11,4–13,5 %), що не виходило за межі фізіологічної норми (табл. 2). Визначено деякі відмінності у показниках правого та лівого ока: на правому оці зміни були менш значущими.

Оцінка показників у мікрохірургів після 4-годинної роботи за операційним мікроскопом виявила певні, але достовірні порушення системної та регіональної гемодинаміки у всіх вікових групах, як при порівнянні з вихідним рівнем, так і при порівнянні по групах

Таблиця 1. Порівняльний аналіз показників ультразвукового доплерографічного обстеження кровообігу до початку операційного дня

Зона дослідження	I група			II група			III група		
	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності
a. carotis com.	87,0	22,0	0,75	80,9*	22,4*	0,72*	74,1* ⁰	20,5*,**	0,72*,**
a. carotis int. D	62,5	23,7	0,59	53,2*	21,0*	0,58	55,3* ⁰	21,7*,**	0,59**
a. carotis in. S	56,5	22,7	0,58	55,4*	23,2*	0,58	55,1*	23,9*	0,57*,**
a. carotis ext. D	63,4	17,8	0,58	63,0*	18,0*	0,58	62,7*	16,9*	0,57*,**
a. carotis ext. S	57,9	15,5	0,59	61,2*	19,2*	0,58*	59,3*	18,0*,**	0,57*,**
a. vertebralis D	36,5	13,1	0,63	35,4*	13,2*	0,61*	35,1*	14,9*,**	0,56*,**
a. vertebralis S	36,1	14,8	0,61	34,8*	14,8	0,54*	35,1*	14,7*	0,58*,**
a. ophthalm. D	31,2	10,6	0,67	30,1*	9,98*	0,64*	30,0*	11,8*,**	0,63*,**
a. ophthalm. S	31,0	10,4	0,65	30,1*	9,98*	0,64*	30,0*	11,8*,**	0,63*,**

*P<0,005 достовірність показників відносно I групи; **P<0,001 – відносно II групи.

(див. табл. 2). У I групі визначено достовірне зменшення значень V_c , V_d та IP у крупних судинах, тоді як в очній артерії виявлено збільшення V_c (3,5–3,9 %) та IP (0,1–0,5 %) при зменшенні V_d (2,5–8,6 %). В II та III групах на тлі зменшення V_c спостерігали збільшення V_d та IP у магістральних судинах ший та в очній артерії. Так, по закінченні операційного дня в II і III групах V_c зменшилася на 5,7 % та 1,6 % V_d збільшилася на 22,7 та 7,8 %, а IP – на 37,0 та 1,5 % відповідно.

Таким чином, професійне навантаження призвело до збільшення V_c тільки у лікарів I групи, тоді як у решти груп, навпаки, при незначному зменшенні V_c помірно збільшилася V_d . Найбільші зміни V_d були в II групі. Стосовно змін IP, то після операційного навантаження визначено його збільшення в усіх групах. Порівняно з показниками I групи збільшення IP у старших вікових групах (II та III) було більш істотним та становило 0,04–0,05 (5,9 %–7,6 %) та 0,01 (10,3 %) відповідно.

Результати обстеження лікарів терапевтичного профілю контрольних груп до початку та після закінчення робочого дня свідчили про аналогічний характер змін

показників УЗДГ в очній артерії. Проте в молодому віці достовірних відмінностей у змінах V_c , V_d та IP порівняно зі значеннями у лікарів-мікрохірургів не виявлено. В більш старшому віці відмінності були більш істотними. Так, у V групі V_c зменшилася на 4,5 %, а V_d та IP збільшилися в середньому на 15,0 % та на 3,2 % відповідно та були достовірно меншими на 2,4, 7,5 та 3,9 % від аналогічних показників у лікарів-мікрохірургів II групи. В VI групі по завершенні робочого дня зміни V_c , V_d та IP становили в середньому 0,8, 14,0 та 0,8 % відповідно, а їх відмінності від контролю були меншими ніж у віковій групі 41–50 років та становили 0,45, 13,3 та 0,45 % відповідно.

Результати морфологічного дослідження сітківки та зорового нерва з кількісно-якісним аналізом їх нейроархітекτονіки показали, що у II та III групах поступово зменшується товщина сітківки у центральній одноміліметровій зоні макулярної ділянки в межах 6,6 %, загальний об'єм сітківки – в межах 7,7 %, середня товщина сітківки макулярної ділянки – в межах 12,0 %, товщина комплексу гангліозних клітин сітківки та товщина шару нервових волокон в межах 11,5 та 3,2 % від-

Таблиця 2. Порівняльний аналіз змін показників ультразвукового доплерографічного обстеження кровообігу після операційного дня

Зона дослідження	I група				II група				III група			
	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності	Максимальна систолічна швидкість течії крові	Кінцева діастолічна швидкість течії крові	Індекс резистентності			
a.carotis com.	-8,5	-1,5	-0,006	-6,75	+6,4	+0,04	+1,4	+10,75	+0,04			
a. carotis int. D	-5,5	-0,7	-0,009	-5,8	+3,0	+0,022	+8,0	+3,452	+0,02			
a. carotis int. S	-1,9	-0,5	-0,006	-1,65	+1,55-	+0,02	+6,4	+3,027	+0,09			
a. carotis ext. D	-6,0	-0,2	-0,002	-2,5	+1,75	+0,003	+2,9	+1,97	+0,07			
a. carotis ext. S	-4,1	-0,9	-0,003	-3,95	+2,7	+0,002	+0,4	+1,50	+0,06			
a.vertebralis D	-1,1	-0,6	-0,021	-0,15	+0,7	+0,02	+1,9	+2,03	+0,05			
a.vertebralis S	-0,1	-0,6	0,017	-0,45	+0,7	+0,04	+0,9	+1,714	+0,02			
a.ophthalmica D	+1,08	-0,92	+0,001	-0,35	+2,27	+0,05	-0,49	+2,06	+0,01			
a.ophthalmica S	+1,22	-0,26	+0,003	-1,73	+2,73	+0,04	-0,28	+4,37	+0,01			

повідно (табл. 3). Разом з тим відзначено, що вихідний рівень середньої товщини сітківки макулярної ділянки та загальний її об'єм були на верхній межі норми. Порівняльний аналіз результатів оптичної когерентної томографії у різних вікових групах визначив поступове зменшення практично всіх показників, у тому числі і товщини комплексу гангліозних клітин сітківки, що свідчило про їх вікові зміни

[11, 12]. Проте у лікарів-мікрохірургів всі томографічні показники були вищими, ніж у лікарів терапевтичного профілю.

Таким чином, у лікарів-мікрохірургів після 4-годинної роботи за операційним мікроскопом відбувалися певні коливання значень V_c та V_d зі збільшенням ІР як у магістральних судинах, так і в очній артерії. У лікарів терапевтичного профілю по закін-

Таблиця 3. Показники оптично-когерентної томографії сітківки та зорового нерва у лікарів-мікрохірургів (основні групи) та лікарів терапевтичного профілю (контрольні групи; $M \pm m$)

Показники, мкм	Основні групи			Контрольні групи		
	I, n=20 (40)	II, n=20 (40)	III, n=20 (40)	IV, n=10 (20)	V, n=10 (20)	VI, n=10 (20)
Товщина сітківки 1 мм	212,32±11,01*	199,25±8,12*	194,15±10,2*	189,52±12,4	187,34±9,11	184,05±11,16
Загальний об'єм сітківки	7,12±0,02*	6,80± 1,11*	6,55± 0,12*	6,72±0,93	6,54±0,75	6,15±1,17
Середня товщина сітківки макулярної ділянки	107,67±4,03*	102,94±8,21*	94,06±3,07*	105,67±11,05	100,94±12,29	93,06±4,23
Товщина комплексу гангліозних клітин сітківки	90,94± 5,04*	86,95± 2,11*	80,05± 2,29*	89,95± 3,25	85,92± 3,31	79,08±8.23
Товщина шару нервових волокон	23,56±2,11*	23,69±1,09*	22,79±1,14*	23,66±2,02	23,99± 2,11	22,78±1,71

* $P < 0,05$ достовірність показників відносно контролю.

ченні робочого часу зміни досліджених показників мали менш виразний характер. Зміни показників мікроциркуляції в очній артерії характеризувалися зменшенням максимальної систолічної швидкості току крові при збільшенні діастолічної та опору судинної стінки. Означені функціональні зміни кровообігу в системі очної артерії свідчать про існування певних змін і у системі задніх ціліарних артерій, які, за умов особливостей судинної топографії ока, завжди випереджають зміни кровообігу в очній артерії. Треба відзначити збільшення показників оптично-когерентної томографії сітківки у лікарів-мікрохірургів, що можна розглядати як специфічну реакцію сітківки на регулярні короточасні зменшення інтенсивності регіонального кровообігу в умовах тривалого нервового та статичного навантаження. Проте не виключено, що певний вплив на морфофункціональний стан нейроархитектоники сітківки можуть здійснювати і інші фактори.

Н.Н. Веселовская, З.Ф. Веселовская, И.М. Слободянюк, М.И. Слободянюк

ВПЛИВ УМОВ ПРОФЕСІОНАЛЬНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ ВРАЧЕЙ-МІКРОХІРУРГІВ НА РИСК РАЗВИТТЯ СОСУДИСТОЇ ПАТОЛОГІЇ ОРГАНА ЗРЕННЯ

В работе исследованы изменения регионального и системного кровообращения и особенности нейроархитектоники сетчатки глаза в условиях длительного действия профессиональной нагрузки у врачей хирургического и терапевтического профиля. Установлено, что у врачей-микрохирургов работа за операционным микроскопом приводит к более выраженным изменениям показателей гемодинамики в глазничной артерии и в магистральных сосудах шеи, чем у врачей терапевтического профиля. Следует отметить, что у врачей-микрохирургов увеличены основные томографические показатели нейроархитектоники сетчатки, что в совокупности с регулярными перепадами в системе глазничной артерии и сосудов шеи в результате длительных профессиональных нагрузок повышает риск сосудистых заболеваний органа зрения.

Ключевые слова: риск, сосудистая патология, нейроархитектоника сетчатки, зрительный нерв, оптико-когерентная томография, ультразвуковая доплерография.

Київ. міськ. офтальмол. центр
E-mail: zveselovskaya@yahoo.com

**N.N. Veselovska, Z.F. Veselovska,
I.M. Slobodyanuk, M.I. Slobodyanuk**

INFLUENCE OF PROFESSIONAL PECULIARITIES AS RISK FACTOR OF THE DEVELOPMENT OF VASCULAR EYE PATHOLOGY IN SURGEONS.

This work was devoted to study of the peculiarities of morphology of the retina with ganglion cells complex and the peculiarities of regional and systemic blood circulation in surgeons and therapists. It was revealed that longtime work under operative microscope results in a decrease of all parameters of blood circulation, that with the data of optical coherent tomography of the retina and optic nerve in surgeons demonstrate the signs of the existence of more high risk of vascular eye pathology then that observed in therapists.

Key words: risk, vascular pathology, neuroarchitecture, retina, optic nerve, optical coherent tomography, ultrasound dopplerography, doctors, microsurgions.

Kyiv Eye Center, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баке М.Я., Леусе И.Ю., Спруджа Д.Р., Кузнецова В.М., Русакова Н.Е. Факторы риска здоровья медицинских работников // Медицина труда и пром. экология. – 2002. – №3. – С. 28–33.
2. Водоп'янова Н.Є., Старченкове Є.С. Синдром вигорання: діагностика та профілактика. – СПб.: Питер, 2005. – 336 с.
3. Измеров Н.Ф., Денисов Э.И., Молодкина Н.Н., Радионова Г.К. Методология оценки профессионального риска в медицине труда. – В кн.: Социально-гигиенический мониторинг: практика применения и научное обеспечение. – Сб. науч. тр. – М., 2000. – С. 118–181.
4. Косарев В.В., Бабанов С.А. Профессиональные болезни медицинских работников // Справочник поликлин. врача. – 2010. – №11. – С. 55–64.
5. Костюк І.Ф., Капустник В.А. Професійні хвороби // Підручник-2-ге вид. перероб. і доп. – К.: Здоров'я, 2003. – 636 с.
6. Кравченко О.К. Задачи и возможности оптимизации условий труда медицинских работников, обслуживающих современное высокотехнологичное медицинское оборудование // Медицина труда и пром. экология. – 2007. – № 4. – С. 5–11.
7. Кречковский Е.А. Гигиеническая характеристика условий труда и профессиональной деятельности врачей хирургических специальностей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Киев, 1979. – 41 с.
8. Кундієв Ю.І. Восьма глобальна нарада представників центрів, що співпрацюють з ВООЗ у галузі медицини праці (Женева, 18–23 жовтня 2009 р.) // Укр. журн. з промбл. медицини праці. – 2010. – № 1 (21). – С. 80–83.
9. Федина Н.В. Клинико-гигиеническое обоснование профилактики цереброваскулярной патологии у врачей: Автореф. дис. ... канд. мед наук. – 2008. – Мытищи. – 23 с.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.06.2013*

Д.О. Мінченко, К.І. Кубайчук, О.В. Губеня, І.В. Кривдюк, Є.В. Хоменко,
Р.М. Герасименко, Р.В. Сулік, Н.К. Мурашко, О.Г. Мінченко

Стрес ендоплазматичного ретикулума та ангіогенез

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) – надзвичайно чутлива до змін гомеостазу внутрішньоклітинна органела, що проводить дуже точний контроль якості протеїнів, які проходять тут процес згортання і дозрівання перед переходом їх до апарату Гольджі, причому всі незгорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються й обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на незгорнуті в ЕР протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і називається стресом ЕР. Цей стрес є фундаментальним явищем, що надійно захищає клітини від дії різноманітних чинників. Він забезпечує широкий спектр протікання різних фізіологічних процесів розвитку та метаболізму, особливо у деяких спеціалізованих клітинах з високим рівнем синтезу секреторних протеїнів, зокрема таких, як β -клітини, гепатоцити та остеобласти і є необхідним протягом усього життя. Стрес ЕР, як і гіпоксія – обов'язкові компоненти злоякісного росту, вони тісно взаємодіють і контролюють процеси росту та метаболізму, активуючи ангіогенез. Цей стрес опосередковується трьома сенсорно-сигнальними шляхами (PERK, ATF6 та ERN1), причому виключення функції одного з них (ERN1) призводить до зниження інтенсивності росту пухлин за допомогою пригнічення ангіогенезу та процесів проліферації. Аналізуються дані про взаємозв'язок функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 і експресії про- та антиангіогенних генів.

Ключові слова: стрес ендоплазматичного ретикулума, ангіогенез, гіпоксія, експресія генів, ERN1, HIF, проліферація.

ВСТУП

Детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції основних метаболічних циклів і різноманітних процесів як на рівні клітин, так і на рівні організму, ідентифікація окремих ключових факторів сигнальної мережі, відповідальних за ініціацію тих чи інших патологічних процесів, – надзвичайно актуальний напрямок фундаментальних досліджень у біохімії, молекулярній фізіології та інших медико-біологічних науках. Сигнальна мережа клітин представлена численними транскрипційними факторами, протеїнкіназами та протеїнфосфатазами, які є основною складовою регуляторних каскадів клітин і відіграють надзвичайно важливу роль у динамічних механізмах регуляції біохімічних процесів як у нормі, так і за різних патологічних станів.

Протягом останнього десятиліття досить інтенсивно вивчаються молекулярні механізми стресу ендоплазматичного ретикулума (ЕР), як фундаментального явища захисту клітин від дії різноманітних чинників, а також при зміні внутрішньоклітинного та позаклітинного гомеостазу, як і його фізіологічної ролі у протіканні певних процесів у деяких спеціалізованих клітинах, пов'язаних з синтезом великої кількості протеїнів для секреції [16, 33, 78, 98]. Але стрес ЕР задіяний також у розвитку багатьох патологій, зокрема, він є облігатним фактором росту злоякісних пухлин і причетний до розвитку інсулінорезистентності [16, 33, 90].

Велика кількість біохімічних та фізіологічних стимулів, зокрема порушення кальцієвого гомеостазу, оксидативний стрес, підвищений синтез секреторних протеїнів,

© Д.О. Мінченко, К.І. Кубайчук, О.В. Губеня, І.В. Кривдюк, Є.В. Хоменко, Р.М. Герасименко, Р.В. Сулік, Н.К. Мурашко, О.Г. Мінченко

експресія неправильно згорнутих протеїнів, дефіцит глюкози, зміни у глікозилюванні протеїнів або підвищення вмісту холестеролу можуть порушувати гомеостаз ЕР, в результаті чого в його люмені накопичуються незгорнуті або неправильно згорнуті протеїни і розвивається стрес [75, 78, 90].

Велика частина протеїнів після синтезу в цитоплазмі переміщується до ЕР, а це переважно мембранні протеїни та ті, що секретуються, де за допомогою молекулярних шаперонів відбувається їх дозрівання та згортання (фолдинг) до нативної конформації, причому котрансляційні та посттрансляційні модифікації протеїнів, включаючи формування в них дисульфідних містків та N-глікозилювання. Ці посттрансляційні модифікації протеїнів є важливими для їх структури та активності і відіграють значну роль у згортанні протеїнів та формуванні олігомерних комплексів [16, 46, 76]. ЕР забезпечує високоякісний контроль за дозріванням і згортанням трансмембранних і секреторних протеїнів, а тому лише правильно згорнуті протеїни можуть бути транспортовані за межі ЕР, тоді як незгорнуті чи неправильно згорнуті залишаються в ЕР і знищуються [78].

Розвиток стресу ЕР у результаті накопичення в його каналцях незгорнутих протеїнів або протеїнів з помилковою конформацією призводить не лише до зниженого надходження нових протеїнів, а і до посиленої деградації незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [16]. Крім того, стрес ЕР є відповідальним також і за загальне зниження ініціації трансляції на тлі вибіркової трансляції певних мРНК, що кодують синтез залежних від стресу протеїнів [13, 64]. Таким чином, функція стресу ЕР полягає саме у реорганізації метаболічних процесів у клітині для забезпечення їх виживання або знищення клітин через апоптоз у разі наявності незворотних змін [46, 83]. Більше того, реакція клітин на накопичення в ЕР незгорнутих чи помилково згорнутих протеїнів є також дуже важливою реакцією саме для збереження

функціональної його цілості та попережджує розвиток оксидативного стресу [34].

Таким чином, за наявності змін гомеостазу в люмені ЕР порушується згортання протеїнів, а це активує основні сигнальні каскади у ньому, що називається реакцією на незгорнуті протеїни або стресом ЕР. Цей стрес розпізнається трьома основними спеціалізованими сенсорно-сигнальними системами, які розпочинаються з люмену ЕР, де локалізується їх сенсорна частина, і досягають цитоплазми та ядра: PERK (PRK-like ER kinase; подібна до PRK кіназа ЕР), ERN1 (Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1; від ЕР до ядра 1), ензим, який ще називається IRE1 (Inositol Requiring Enzyme-1; залежний від інозитулу ензим-1) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6; активуючий транскрипційний фактор 6), але ERN1 є найбільш важливою сенсорно-сигнальною системою стресу ЕР [46, 75, 76, 90].

Основні сенсорно-сигнальні системи стресу ЕР. Три основні сенсорно-сигнальні системи стресу ЕР представлені трансмембранними ензимами та транскрипційним фактором, які локалізовані таким чином, що їх сенсорна частина знаходиться в люмені та взаємодіє з шаперонами, основним із яких є HSPA5 (70 кДа протеїн 5 теплового шоку), відомий також як BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein; протеїн, що зв'язується з тяжким ланцюгом імуноглобулінів) або GPR78 (протеїн 78, що регулюється глюкозою) [5, 8]. Шаперон BiP функціонує як негативний регулятор усіх трьох сенсорно-сигнальних ензимів стресу ЕР, оскільки він є асоційованим з усіма трьома сигнальними системами за нормальних умов і відщеплюється від них лише за появи в ньому незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [8].

Таким чином, шаперон HSPA5 забезпечує одночасну негативну регуляцію роботи всіх трьох сигнальних шляхів відповіді на порушення фолдингу протеїнів [8]. Варто відмітити, що за умов стресу ЕР у клітинах запускаються процеси, які спрямовані на регуляцію роботи різних шаперонів. Пока-

зано підвищений рівень експресії шаперону HSPA5 у більшості злоякісних пухлин, що робить його цікавою мішенню для розробки нових і перспективних способів протипухлинної терапії [5,43].

На рис. 1 схематично зображена реакція клітин на стрес ЕР, яка необхідна клітині для пошуку можливих шляхів виходу зі стану стресу, зумовленого накопиченням незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів, і яка опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами, що починаються в люмені ЕР за умов накопичення в ньому незгорнутих протеїнів і закінчуються у цитоплазмі та ядрі [6, 84]. Індукція стресу ЕР призупиняє входження до нього *de novo* синтезованих протеїнів і сприяє як правильному згортанню протеїнів, що уже знаходяться в ньому, так і деградації неправильно згорнутих протеїнів, для виживання клітин за умов дії на них чинників, що індукують цей стрес, або смерті клітин через систему апоптозу, асоційовану з ЕР [84].

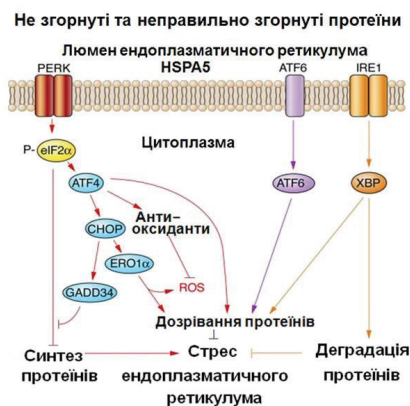


Рис. 1. Основні сенсорно-сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулума (PERK, ATF6 та IRE1), що починаються в його люмені за умов накопичення в ньому незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів і ініціюють тотальну репресію ініціації трансляції, фосфорилуючи α -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 (EIF2A), та активацію транскрипції стресзалежних генів шляхом утворення активної форми транскрипційних факторів ATF6 та ATF4, а також альтернативного сплайс-варіанта транскрипційного фактора XBP1 (X-бокс протеїн-1), що контролює експресію сотень генів [17]

Всі три сенсорно-сигнальні ензими стресу ЕР мають трансмембранний домен, що закріплює їх у його мембрані, а також цитоплазматичний домен, який має enzymatic activity або являє собою транскрипційний фактор, що відіграє роль передачі сигналів з люмену ЕР до з'єднаних з ними сигнальних каскадів цитоплазми та ядра [13, 16, 74, 85].

Сенсорно-сигнальний шлях PERK представлений протеїнкіназою ЕР, подібною до протеїнкінази, що активується дволанцюговою РНК (PRK кінازی; double stranded RNA activated protein kinase) [74]. Протеїнкіназа PERK являє собою кіназу 3 α -субодиниці фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (EIF2AK3; eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3), яка інактивує α -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (EIF2A), фосфорилуючи її. Підвищена активність протеїнкінази PERK за дії стресу ЕР призводить до тотальної блокади біосинтезу протеїнів у клітинах швидким пригніченням ініціації трансляції мРНК, а, відповідно, і до зниженого надходження синтезованих протеїнів до ЕР для їх подальшого фолдингу та дозрівання [74].

І хоча фосфорильована форма фактора EIF2A забезпечує тотальне пригнічення трансляції мРНК на рибосомах, біосинтез деяких протеїнів при цьому істотно зростає. Це стосується тих протеїнів, що індукуються сигнальними шляхами стресу ЕР для їх участі у нормалізації фолдингу та дозрівання протеїнів у ньому, а також розщепленні неправильно згорнутих протеїнів. До цих протеїнів відноситься і транскрипційний фактор ATF4 (активуючий транскрипційний фактор 4), який індукується протеїнкіназою PERK і відіграє важливу роль у регуляції багатьох процесів, у тому числі і у диференціації остеобластів та утворенні кістки за допомогою активації експресії необхідних для остеогенезу генів [74].

Більше того, активація експресії транскрипційного фактора ATF4 за умов стресу ЕР, що опосередкована сенсорно-сигнальною

системою PERK, виявилася досить важливою як для росту різних злоякісних пухлин, так і для їх резистентності до гіпоксії [10, 23]. Так, нещодавно було показано, що фосфорилування EIF2A призводить до зниження індукваного статинами апоптозу за допомогою пригнічення стабілізації та транслокації TP53 (Tumor Protein 53; протеїн пухлин 53) до мітохондрій [45]. Крім того, було виявлено, що кіназа фактора EIF2A задіяна в індукції саліцилатом натрію апоптозу та залежних від стресу ER генів [24]. Таким чином, реакція клітин на стрес ER, що опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами, є необхідною клітині для пошуку можливих шляхів виходу із стану стресу, зумовленого накопиченням незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у люмені ER [50].

Активованій стресом ER синтез транскрипційного фактора ATF4 також посилює експресію низки інших генів, включаючи GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34; протеїн 34, який індукується при пошкодженні ДНК і зупиняє ріст) та CHOP (протеїн, гомологічний C/EBP), що називається ще DDIT3 або GADD153. Протеїн CHOP є транскрипційним фактором, що відноситься до родини протеїнів, які зв'язуються з енхансером CCAAT (C/EBP), причому він виконує функцію домінантнегативного інгібітора при формуванні гетеродимерів з іншими членами родини C/EBP. Зокрема, це стосується C/EBPA та LAP (активаторний протеїн печінки). Протеїн CHOP попереджує їх зв'язування з ДНК, що є важливим у регуляції адипогенезу та еритропоезу і сприяє апоптозу [14, 82]. Більше того, транскрипційний комплекс CHOP-C/EBPA пригнічує експресію гена SLC29A1 і транспорт адеозину в ендотеліальних клітинах судин за діабету вагітних через NO-залежний шлях [21]. Встановлено також, що індукція експресії CHOP за стресу ER пригнічується при взаємодії подібних до TOLL-рецепторів (TLR) 3 або 4 з TRIF-залежним сигнальним шляхом [87].

Протеїн GADD34 – регуляторна (інгібіторна) субодиниця 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A), яка є серин/треоніною протеїнфосфатазою і дефосфорилує α -субодиницю фактора ініціації трансляції EIF2A/EIF2S1 [14, 50]. Саме таким чином PPP1R15A знімає виключення ініціації синтезу протеїнів, індукваного стрес-залежними кіназами, та опосередковує вихід клітини зі стресу.

Більше того, протеїнфосфатаза 1 може блокувати сигнальний шлях TGFB1, дефосфорилуючи його. Транскрипційний фактор ATF4 може також активувати апоптоз, індукуючи фосфорилування TP53 по Ser-15, та експресію гена ERO1 α , який відповідає за продукцію активних форм кисню (ROS) і при цьому сприяє згортанню протеїнів. Було також встановлено, що Т-кадгерин істотно послаблює PERK сигнальний шлях стресу ER і таким чином захищає ендотеліальні клітини судин від індукції апоптозу, індукваного цим стресом [42].

Сенсорно-сигнальний шлях стресу ER ATF6 представлений трансмембранним попередником транскрипційного фактора ATF6, який при індукції стресу переходить до апарату Гольджі, де розщеплюється протеазами S1P (site-1-protease, сайт-1-протеаза) та S2P (site-2-protease, сайт-2-протеаза) з утворенням розчинної форми ATF6. Ця форма відповідає за регуляцію транскрипції низки залежних від стресу ER генів, причому ATF6 може працювати як окремо, так і синергічно з іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу [16, 34, 50, 84].

Сенсорно-сигнальний шлях ERN1 представлений біфункціональним трансмембранним ферментом, який має сенсорну частину, локалізовану в люмені ER, а також трансмембранний домен і цитоплазматичну частину з двома ферментативними активностями: серин/треоніною кінази та ендорибонуклеази, що зображено на рис. 2.

За індукції стресу ER активується кіназа, яка аутофосфорилує ERN1, в результаті чого відбувається його активація та димери-

зація в його мембрані [36, 46, 91]. Основна функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вирізанні короткого фрагмента з кодуючої частини мРНК транскрипційного фактора ХВР1 (протеїн-1, що зв'язується з Х-боксом), в результаті чого утворюється вкорочений альтернативний сплайс-варіант мРНК ХВР1 (ХВР1s), який кодує синтез більшого за розміром транскрипційного фактора зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця внаслідок порушення рамки зчитування. Саме цей альтернативний сплайс-варіант відповідальний за регуляцію експресії декількох сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також деградації неправильно згорнутих протеїнів [2, 84].

Інша функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вибіркового розщепленні (деградації) певних мРНК за умов стресу ЕР, що мабуть є надзвичайно важливим у виключенні певних сигнальних шляхів, які можуть заважати виходу клітини зі стану стресу [29]. Таким чином, для активації ендорибонуклеази необхідною умовою є аутофосфорилування ERN1 кіназою цього біфункціонального ензиму і його димеризація, але є дані про те, що пригнічення кінази за допомогою специфічного інгібітора активує ендорибонуклеазу і забезпечує клітині протікання найважливіших метаболічних змін для

виходу ЕР із стресового стану [26, 27]. Більше того, якщо його гомеостаз не відновлюється, то запускається шлях апоптозу для знищення клітин, причому у переключенні на апоптоз вирішальну роль відіграє саме ERN1-сигнальний шлях, ендорибонуклеаза якого вибірково розщеплює певні мРНК, зокрема шаперонів, що є одним із пускових механізмів апоптотичної смерті клітин [26, 89]. Водночас високий рівень експресії шаперонів у клітинах злоякісних пухлин значною мірою відповідає за життєздатність пухлинних клітин у результаті пригнічення апоптозу [5, 43].

Недавно було показано, що біфункціональний сенсорно-сигнальний ензим ERN1 має ще одну надзвичайно важливу функцію. Так, було встановлено, що пептиди, які утворюються при розщепленні цього сигнального ензиму мають унікальні властивості і здатні модулювати активність ензиму ERN1, захищаючи клітини від стресу ЕР [12].

Роль стресу ЕР в ангиогенезі та рості злоякісних пухлин. Підвищена активність ЕР у процесах згортання, дозрівання та транспорту протеїнів є необхідною умовою злоякісного росту, що асоціюється з гіпоксією, зумовленою, з одного боку, зниженим споживанням кисню, а з іншого – індукцією залежного від гіпоксії фактора HIF через сигнальні шляхи стресу ЕР [19,23, 93]. Але гіпоксія – також важливий фактор росту злоякісних пухлин і також сильний індуктор накопичення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ретикулумі та активації відповідних сенсорно-сигнальних шляхів стресу, але ця стресова реакція клітин надає їм резистентності до гіпоксії [10, 22]. Таким чином, наявні експериментальні дані свідчать, що відповідь на стрес ЕР та на гіпоксію є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного швидкого поділу та мають високу стійкість до хіміотерапії.

ЕР є ключовою органелою у відповіді клітини на гіпоксію, що характерно для більшо-

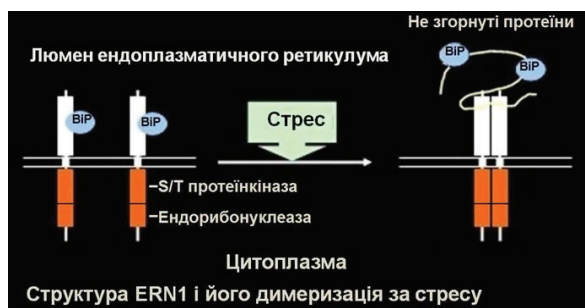


Рис. 2. Структура ERN1 в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР): сенсорна N-кінцева частина знаходиться у люмені ЕР, а біфункціональна ензиматична частина – з цитозольного боку мембрани, причому ближче до трансмембранної частини знаходиться ділянка серин/треонінової кінази, а далі – ендорибонуклеази. За умов стресу ЕР ERN1 димеризується і проявляється ензиматична активність

сті злоякісних пухлин, вірніше, вона – один із обов'язкових факторів злоякісного росту, оскільки виражено активує як процеси ангиогенезу, так і проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу та пентозо-фосфатного циклу через опосередковані транскрипційним фактором HIF (фактор, що індукується за гіпоксії) механізми і тісно пов'язана не лише з ростом пухлин, а і з метастазуванням та резистентністю до лікування [11, 22, 47, 62, 65, 72]. Експресія великої кількості генів, що активуються транскрипційним фактором HIF, збільшується у клітинах злоякісних пухлин: HK2, PFKFB, PFKFB3, PFKFB4, VEGFA, NOTCH1, цикліни, фактори росту та інші, які є потужними проонкогенними чинниками в багатьох злоякісних новоутвореннях, відіграють важливу роль у реалізації ефектів гіпоксії на ангиогенез, проліферацію, інвазивність та хеморезистентність [4, 7, 20, 52, 59–61].

Варто відмітити, що всі три сенсорно-сигнальні шляхи стресу ER, ключової органели клітини у відповіді на незгорнуті чи помилково згорнуті протеїни, є вирішальними як за фізіологічних умов, так і за різноманітних патологій [9, 39]. Стрес ER можна розглядати як один із компонентів реакції пухлинних клітин на гіпоксію [22, 62]. Більше того, зв'язок гіпоксії зі стресом ER є HIF-опосередкованим процесом, у зв'язку з чим саме транскрипційний фактор HIF може бути містком між гіпоксією та стресом ER [47, 62].

Показано, що ефекти гіпоксії на міграцію клітин аденокарциноми грудної залози можуть бути опосередковані сенсорно-сигнальним шляхом стресу ER PERK через ATF4 та LAMP3 [65]. Через PERK-сигнальну систему стресу ER реалізується і гіпоксична регуляція синтезу протеїнів, за якої спостерігається виражена активація фосфорилування α -субодиниці фактора ініціації трансляції [11].

Стрес ER, будучи одним із центральних необхідних факторів росту злоякісних пухлин, забезпечує такі зміни в метаболізмі клітин, які направлені на активацію ростових і прозапальних процесів, потужно активує

ангиогенез, а також генерує толерантність до гіпоксії, причому як стрес ER, так і прозапальні процеси не залишаються ізольованими у пухлинних клітинах, а поширюються від них до мієлоїдних клітин [9, 39, 48, 49, 72, 73]. Більше того, в більшості випадків дерегуляція гомеостазу ER корелює саме з різними патологічними станами, зокрема з ростом злоякісних новоутворень, що чітко виявляється як на рівні посттрансляційної модифікації протеїнів ретикулула, так і на рівні їх секреції [39, 62].

Крім того, суттєвий вплив на функцію ER мають зміни в мікрооточенні пухлинних клітин, зокрема дефіцит кисню, глюкози чи інших поживних речовин. У різних злоякісних пухлинах дійсно сильно змінюється експресія великої кількості протеїнів, що є резидентами ER, зокрема шаперонів GRP78 (BiP; HSPA5) та GRP94, функціональна роль яких полягає у забезпеченні нормального і правильного згортання протеїнів та у протистоянні проапоптотичним впливам, а також шаперону GRP170, функція якого асоціюється з виходом із пухлинних клітин ендотеліального фактора росту судин VEGF-A для їх виживання за умов гіпоксії [66, 68, 84, 85]. VEGF-A діє як фактор виживання епітеліальних клітин кришталика за умов гіпоксії acts за допомогою збереження сталої експресії протеїну BCL-2, який попереджує транслокацію протеїну BAX із цитозолу до зовнішньої мембрани мітохондрій [66]. Підвищена експресія шаперону HSPA5 у багатьох злоякісних новоутвореннях робить його перспективною мішенню для пошуку нових шляхів протипухлинної терапії [84]. Більше того, саме експресія шаперону HSPA5 значною мірою визначає чутливість до хіміотерапії [63].

Разом з тим численними дослідженнями було встановлено, що основним сенсорно-сигнальним шляхом реалізації ефектів стресу ER на ріст злоякісних пухлин є ERN1, причому він – органічно пов'язаний з гіпоксією та ішемією [20, 56, 58, 62, 72, 73, 84].

Це було чітко продемонстровано переважно на клітинах гліоми, найбільш агресивних із відомих злоякісних пухлин з вираженим ангиогенезом та посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку [54, 55, 59, 62]. Гіпоксія та сигнальний шлях стресу ER тісно пов'язані з процесами ангиогенезу та росту злоякісних пухлин. В експериментах на клітинах гліоми та аденокарциноми легень було встановлено, що повна блокада функції сигнального ензиму ERN1 призводила до вираженого пригнічення росту пухлин із таких клітин на ембріонах курчат та у мозку мишей внаслідок змін в експресії про- та антиангіогенних генів, пухлинних супресорів та циклінів і, відповідно, зниження інтенсивності процесів ангиогенезу та проліферації [4, 20, 31, 32, 40, 41, 53, 57, 59].

Доцільно відмітити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ER ERN1 не є ізольованим у клітині, від тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6), але всі ці шляхи контролюються також низкою важливих протеїнкіназ та факторів [3, 44, 69, 92].

Виключення функції сигнального ензиму ERN1, який контролює процеси апоптозу,

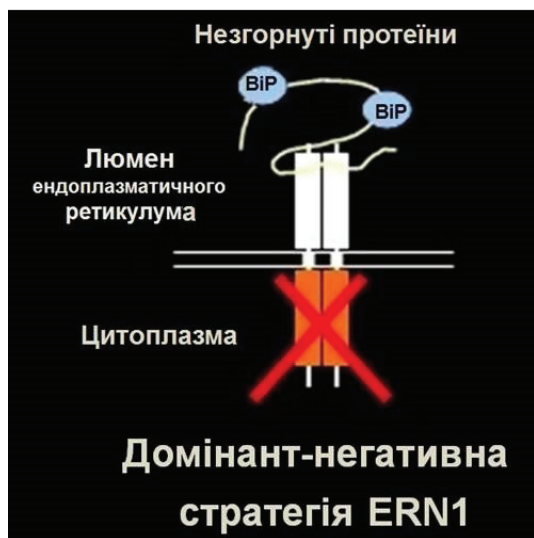


Рис. 3. Структура доміантнегативної ERN1 в ендоплазматичному ретикулумі, в якій видаляється біфункціональна ензиматична частина, що розташована у цитоплазмі

ангіогенезу та росту злоякісних пухлин, було досягнуто за допомогою технології доміантнегативних кДНКових конструкцій, якими проводили трансфекцію клітин з подальшою селекцією клонів. На рис. 3 схематично зображена структура ERN1 у мембрані ER з перекресленою цитоплазматичною частиною, яка була видалена для створення доміантнегативної конструкції без обох ензиматичних активностей [4, 20, 31]. Ефективність пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми оцінювали за вмістом фосфорильованої форми ERN1 та експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1 (ХВР1s) за умов індукованого тунікаміцином стресу ER (рис. 4). Так, у контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором, тунікаміцин збільшує вміст як фосфорильованої за серином 724 форми ERN1,

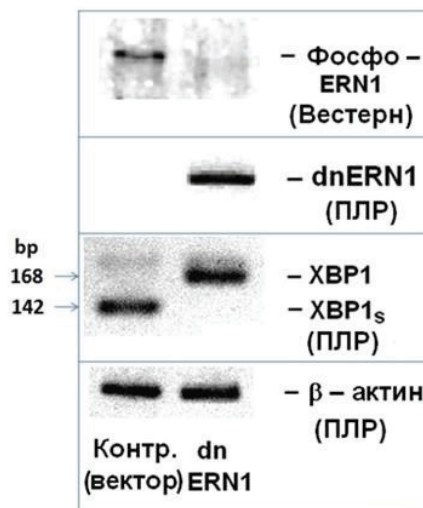


Рис. 4. Ефективність пригнічення сенсорного ензиму ERN1 доміантнегативною конструкцією dnERK1, яку визначали за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, індукованого тунікаміцином (0,01 мг/мл – 2 год), за вмістом фосфорильованої форми ERN1 (фосфо-ERK1; вестерн-аналіз), а також за рівнем експресії мРНК доміантнегативної конструкції ERN1 (dnERK1) і транскрипційного фактора (ХВР1) та його альтернативного сплайс-варіанта (ХВР1s) за даними полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором (Контр.), та у сублінії цих клітин, стабільно трансфєкованих dnERK1 конструкцією [54]

так і альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1, що кодує синтез ключового транскрипційного фактора ERN1 сигналіngu за умов стресу ЕР. Водночас у клітинах гліоми, стабільно трансфектованих домінантнегативною конструкцією ERN1, ефект тунікаміцину не проявляється, а це переконливо свідчить про відсутність у клітинах функціонально активної форми сигнального ензиму ERN1 [59]. Встановлено, що швидкість росту пухлин із клітин гліоми з пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази, на ембріонах курчат знижувалася майже у 4 рази, причому різко знижується і їх васкуляризація (рис. 5) [4, 31].

Варто відмітити, що процес ангіогенезу є досить складним і у різних клітинах експресуються сотні про- та антиангіогенних генів, які утворюють регуляторну його мережу. Так, детальний аналіз клітин меланоми від різних пацієнтів не виявив значного збільшення експресії певних про- чи антиангіогенних генів, а у 97 % пацієнтів ці клітини мали змінену експресію генів, як правило, одного із цих ангіогенних факторів, що переконливо свідчить про досить складну систему контролюючих ангіогенез факторів, причому порушення навіть одного із них може призвести до змін

ангіогенезу [30]. Більше того, транскрипційна і посттранскрипційна регуляція проангіогенних факторів знаходиться під контролем стресу ЕР, що було показано насамперед для ендотеліального фактора росту судин А (VEGF-A) [4, 20, 59, 70].

Найбільш дослідженими із них є VEGF-A та низка інших факторів, зокрема епірегулін (EREG), фактор росту, що зв'язується з гепарином і подібний до епідермального фактора росту (HB-EGF) та фактор росту фібробластів-2 (FGF2) [18, 25, 37, 51, 79, 81]. Як видно з рис. 6, пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 різко знижує рівень експресії генів, відповідальних за активацію ангіогенезу: EREG та HB-EGF, а також VEGF-A та VEGF-B [1, 20, 59]. Більше того, за умов гіпоксії також істотно знижується вміст мРНК як EREG, так і HB-EGF у контрольних клітинах гліоми. Водночас у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена EREG значно менший порівняно з контрольними клітинами, а на експресію гена HB-EGF – зовсім відсутній [1].

Значне зниження рівня експресії у клітинах гліоми з блокадою функції ензиму

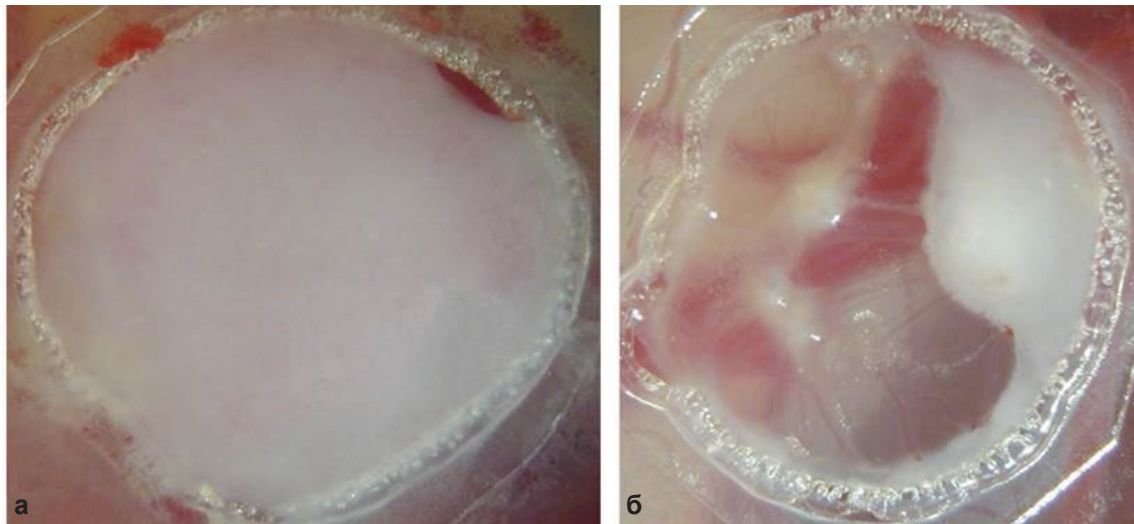


Рис. 5. Ріст пухлин із контрольних клітин гліоми (а) та клітин з пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази (б) на ембріонах курчат; 4 доби [71]

ERN1 було показано також для генів FGF2 та ADAM металопептидази 5 з мотивом тромбоспондину типу 1 (ADAMTS5), що задіяні у посиленні ангіогенезу, але гіпоксія мала протилежну дію на експресію цих генів: знижувала експресію гена FGF2 і посилювала експресію гена ADAMTS5 [40]. Таким чином, результати цих досліджень відкрили деякі сторони молекулярних механізмів пригнічення росту гліоми за умов виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 через різке зниження експресії проангіогенних генів EREG, HB-EGF, ADAMTS5, VEGF та FGF2, причому за цих експериментальних умов знижується або блокується і ефект гіпоксії на експресію більшості цих генів.

У регуляторній сітці регуляції ангіогенезу вагоме місце займають численні антиангіогенні фактори, зокрема такі, як інгібітор металопептидази 2 та 3 (TIMP2, TIMP3), тромбоспондин 1 та 2 (THBS1 та THBS2), а також інгібітор ангіогенезу-2, специфічний для мозку, (BAI2) та кислий і збагачений на

цистеїн протеїн, що секретується (SPARC). Деякі із них мають плейотропні властивості і в залежності від ситуації, що складається у клітині, можуть проявляти не лише анти-, а і проангіогенні властивості [35, 67, 71, 77]. Так, TIMP2 проявляє свою антиангіогенну та пухлино-супресорну дію через взаємодію з рецептором інтегрину $\alpha 3 \beta 1$, а через індукцію експресії генів пригнічує клітинний цикл та міграцію клітин [77].

Надзвичайно цікавими є результати дослідження експресії генів антиангіогенних факторів у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 [40]. Так, значне посилення експресії генів було виявлено у клітинах гліоми за умов пригнічення функції ензиму ERN1 для таких антиангіогенних факторів, як TIMP2, TIMP3, THBS1, THBS2, SPARC та специфічний для мозку інгібітор ангіогенезу BAI2. На рис. 7 представлені дані про експресію генів TIMP2 та TIMP3 у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1, а також за умов гіпоксії. Експресія обох TIMP-генів посилювалася за гіпоксії у нормальних клітинах гліоми, а клітинах з пригніченим геном ERN1 збільшувалася

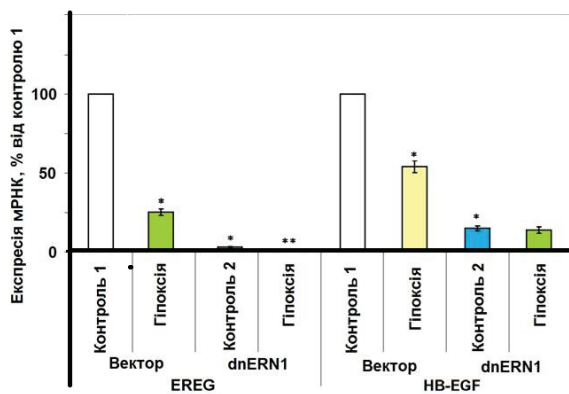


Рис. 6. Ефект гіпоксії (3 % кисню протягом 16 год) на рівень експресії мРНК епірегуліну (EREG) та фактора росту, що зв'язується з гепарином і є подібним до епідермального фактора росту (HB-EGF), у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та її варіанта з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERN1). Величину експресії генів HB-EGF та EREG визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції, нормалізували за рівнем транскриптів β -актину і представляли як відсоток від контролю 1. * $P < 0,05$ порівняно з контролем 1, ** $P < 0,05$ – з контролем 2 [88]

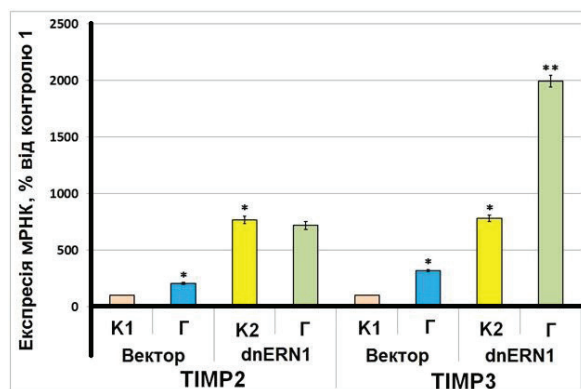


Рис. 7. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК інгібітора металопептидази TIMP 2 та 3 (TIMP2 та TIMP3) у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та її варіанта з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERN1). Значення експресії мРНК TIMP2 та TIMP3 нормалізували за експресією мРНК β -актину і представляли як відсоток від контролю 1. * $P < 0,05$ порівняно з контролем 1, ** $P < 0,05$ – з контролем 2 [74]

експресія лише гена TIMP3. Тобто блокада функції гена ERN1 знімала повністю залежність експресії гена TIMP2 від гіпоксії [40].

Таким чином, сенсорно-сигнальний шлях ERN1 є ключовим модулятором злоякісного росту, оскільки саме він забезпечує основну регуляцію експресії сотень генів, серед яких гени про- та антиангіогенних факторів, гени, які контролюють процеси проліферації, апоптозу та інвазивності пухлинних клітин, причому регулює він експресію цих генів переважно через транскрипційний фактор ХВР1. Сюди відносяться гени ростових і ангіогенних факторів, генів біологічного годинника, протеїнази та протеїнофосфатаз, транскрипційних факторів і пухлинних супресорів, циклінів і циклінозалежних кіназ, генів шаперонів і апоптотичних факторів, ензимів і регуляторів транспорту та метаболізму глюкози тощо [2, 4, 8, 32, 40, 53, 56, 58].

Варто відмітити також, що всі три сенсорно-сигнальні шляхи стресу ER тісно взаємодіють, в тому числі і в регуляції ангиогенезу, і при виключенні одного із них інші два частково компенсують його відсутність. Більше того, різні фактори регуляції ангиогенезу знаходяться в одній сітці регуляції і також дуже тісно взаємодіють. Так, TIMPs інгібують металопротеїнази матриксу, які розщеплюють CTGF (фактор росту сполучної тканини, який ще має назву IGFBP8, протеїн 8, що зв'язується з подібним до інсуліну фактором росту) і таким чином реактивують VEGF [28]. Виключення функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ER, пригнічує ріст пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії генів, що контролюють процеси гліколізу, ангиогенезу та проліферації [31, 32, 40, 41, 53, 55–59]. Залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 можна пояснити тим, що ефекти гіпоксії здебільшого опосередковані транскрипційним фактором HIF, а його вміст залежить не лише від вмісту кисню, а і від сигнальних шляхів, що опосередковують процеси проліферації,

зокрема від PI3K, AKT та MAPK шляхів, які в свою чергу залежать від ERN1 сигнального шляху [3].

Д.А. Минченко, Е.И. Кубайчук, Е.В. Губеня, И.В. Кривдюк, Е.В. Хоменко, Р.Н Герасименко, Р.В. Сулик., Н.К. Мурашко, А.Г. Минченко

СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И АНГИОГЕНЕЗ

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) – чрезвычайно чувствительная к изменениям гомеостаза внутриклеточная органелла, что проводит очень точный контроль качества протеинов, которые проходят здесь процесс сворачивания и созревания перед переходом их в аппарат Гольджи, причем все несвернутые или неправильно протеины задерживаются и обязательно уничтожаются. Поэтому реакция клеток на несвернутые в ЭР протеины необходима для сохранения его функциональной целостности и называется стрессом ЭР. Этот стресс – фундаментальное явление, которое надежно защищает клетки от действия различных факторов. Он обеспечивает также широкий спектр протекания различных физиологических процессов развития и метаболизма, особенно в некоторых специализированных клетках с высоким уровнем синтеза секреторных протеинов, в частности таких, как β-клетки, гепатоциты и остеобласты, и необходим на протяжении всей жизни. Стресс ЭР, как и гипоксия, являются обязательными компонентами злокачественного роста, они тесно взаимодействуют и контролируют процессы роста и метаболизма, активируя процессы ангиогенеза. Этот стресс опосредуется тремя сенсорно-сигнальными путями (PERK, ATF6 и ERN1), причем выключение функции одного из них (ERN1) приводит к снижению интенсивности роста опухолей путем угнетения ангиогенеза и процессов пролиферации. Анализируются данные о взаимосвязи функции сигнального энзима ERN1 и экспрессии про- и антиангиогенных генов.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикула, ангиогенез, гипоксия, экспрессия генов, ERN1, HIF, пролиферация.

D.O. Minchenko, K.I. Kubaichuk, O.V. Hubenia, I.V. Kryvdiuk, E.V. Khomenko, R.M. Herasymenko, R.V. Sulik, N.K. Murashko, O.H. Minchenko

ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND ANGIOGENESIS

The endoplasmic reticulum is a dynamic intracellular organelle with exquisite sensitivity to alterations in homeostasis, and provides stringent quality control systems to ensure that the only correctly folded proteins transit to the Golgi and unfolded or misfolded proteins are retained and ultimately

degraded. The endoplasmic reticulum stress represents the unfolded protein response to cope with the accumulation of unfolded or misfolded proteins and is required to maintain the functional integrity of the endoplasmic reticulum. The endoplasmic reticulum stress is a fundamental phenomenon which provides a secure protection of the cells from different factors. This stress provides a wide spectrum of physiological roles in diverse developmental and metabolic processes, especially for professional secretory cells with high-level secretory protein synthesis, such as pancreatic beta cells, hepatocytes and osteoblasts and is required throughout the entire life. The endoplasmic reticulum stress and hypoxia are the obligate components of malignant tumor growth, are interconnected and activate angiogenesis via growth and metabolism control. The endoplasmic reticulum stress is mediated by three by three sensor and signaling pathways (PERK, ATF6 and ERN1), besides that blockade one (ERN1) leads to a decrease of tumor growth through suppression of angiogenesis and proliferation. The data concerning the interaction of signaling enzyme ERN1 and pro- and anti-angiogenic gene expressions is analyzed. Key words: endoplasmic reticulum stress, angiogenesis, hypoxia, gene expressions, ERN1, HIF, proliferation.

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Bogomolets National Medical University, Kyiv;

Shupik National Medical Academy of Post-Graduate Education, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Кубайчук К., Мінченко Д., Ратушна О., Мінченко О. Вплив гіпоксії та ішемії на експресію проангіогенних генів у клітинних гліоми U87 з пригніченою функцією гена ERN1 // Вісн. КНУ ім. Т. Шевченка. – 2012. – **58**. – С. 46–50.
- Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Mol. Cell.* – 2007. – **27**, № 1. – P. 53–66.
- Agani F., Jiang B.H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2013. – **13**, №3. – P. 245–251.
- Auf G., Jabouille A., Guerit S. et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**, № 35. – P. 15553–15558.
- Backer M. V., Backer J. M., Chinnaiyan P. Targeting the unfolded protein response in cancer therapy // *Methods Enzymol.* – 2011. – **491**. – P. 37–56.
- Badiola N., Penas C., Minano-Molina A. et al. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12 // *Cell death & disease.* – 2011. – **2**. – P. e149.
- Bartrons R., Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – **39**, № 3. – P. 223–229.
- Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L. M. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response // *Nature Cell Biol.* – 2000. – **2**, № 6. – P. 326–332.
- Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth // *EMBO J.* – 2005. – **24**, № 19. – P. 3470–3481.
- Blais J. D., Filipenko V., Bi M. et al. Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – **24**, № 17. – P. 7469–7482.
- Bobrovnikova-Marjon E., Grigoriadou C., Pytel D. et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage // *Oncogene.* — 2010. — **29**, № 27. — P. 3881–3895.
- Bouchecareilh M., Higa A., Fribourg S., Moenner M. et al. Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1alpha modulate IRE1alpha activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress // *FASEB J.* – 2011. – **25**, № 9. – P. 3115–3129.
- Bravo R., Parra V., Gatica D. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2013. – **301**. – P. 215–290.
- Cao J., Dai D.L., Yao L. et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway // *Mol. Cell. Biochem.* – 2012. – **364**, № 1–2. – P. 115–129.
- Cao S.S., Kaufman R.J. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2013. – **17**, № 4. – P. 437–448.
- Chakrabarti A., Chen A.W., Varner J.D. A review of the mammalian unfolded protein response // *Biotechnol. Bioengineer.* – 2011. – **108**, № 12. – P. 2777–2793.
- Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2006. – **9**, № 5. – P. 535–539.
- Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – **7**, № 7. – P. 505–516.
- Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – **8**, № 9. – P. 705–713.
- Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – **67**. – P. 6700–6707.
- Farias M., Puebla C., Westermeier F. et al. Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBPalpha in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes // *Cardiovascular. Res.* – 2010. – **86**, № 1. – P. 45–54.
- Feldman D. E., Chauhan V., Koong A. C. The unfolded

- protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors // *Mol. Cancer Res.* – 2005. – **3**, № 11. – P. 597–605.
23. Fels D.R., Koumenis C. The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth // *Cancer Biol. Therap.* – 2006. – **5**, № 7. – P. 723–728.
24. Gentz S.H., Bertollo C.M., Souza-Fagundes E.M., da Silva A.M. Implication of eIF2 α kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2013. – **65**, № 3. – P. 430–440.
25. Giltaire S., Lambert S., Poumay Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways // *J. Cell. Physiol.* – 2011. – **226**, № 6. – P. 1651–1659.
26. Han D., Lerner A.G., Vande Walle L.V. et al. IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates // *Cell.* – 2009. – **138**, № 3. – P. 562–575.
27. Han D., Upton J. P., Hagen A. et al. A kinase inhibitor activates the IRE1 α RNase to confer cytoprotection against ER stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – **365**, № 4. – P. 777–783.
28. Hashimoto G., Inoki I., Fujii Y. et al. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 39. – P. 36288–36295.
29. Hollien J., Lin J. H., Li H. et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *J. Cell Biol.* – 2009. – **186**, № 3. – P. 323–331.
30. Hose D., Moreaux J., Meissner T. et al. Induction of angiogenesis by normal and malignant plasma cells. // *Blood.* – 2009. – **114**, № 1. – P. 128–143.
31. Jabouille A., Auf G., Guérit S., Pineau R., Favereaux A., Maitre M., Gaiser T., von Deimling A., Minchenko O.H., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. IRE1 in glioma angiogenesis and invasiveness // In: *Angiogenesis.* – Helsinki, Finland. – 2009. – P. 24.
32. Karbovskiy L.L., Minchenko D.O., Danilovskiy S. et al. Endoplasmic reticulum–nuclei signaling enzyme-1 knockdown modulates effect of hypoxia and ischemia on the expression of circadian genes in glioma cells // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, № 2. – P. 37–50.
33. Kaufman R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease // *J. Clin. Invest.* – 2002. – **110**, № 10. – P. 1389–1398.
34. Kaufman R. J., Back S. H., Song B. et al. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in beta-cells // *Diabetes, obesity & metabolism.* – 2010. – **12**, Suppl. 2. – P. 99–107.
35. Kee H.J., Koh J.T., Kim M.Y. et al. Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) in normal and ischemic brain: involvement of BAI2 in the ischemia-induced brain angiogenesis // *J. Cerebral Blood Flow Metab.* – 2002. – **22**, № 9. – P. 1054–1067.
36. Korenykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 // *Nature.* – 2009. – **457**, № 7230. – P. 687–693.
37. Koshikawa N., Mizushima H., Minegishi T. et al. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells // *Cancer Sci.* – 2011. – **10**, № 1. – P. 111–116.
38. Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression // *Curr. Mol. Med.* – 2006. – **6**, № 1. – P. 55–69.
39. Koumenis C., Naczki C., Koritzinsky M. et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – **22**, № 21. – P. 7405–7416.
40. Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Danilovskiy S.V. et al. Hypoxic regulation of the expression of anti-angiogenic genes in U87 glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function // *Studia Biologica.* – 2012. – **6**, № 3. – P. 15–28.
41. Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Moenner M., Minchenko O.H. Blockade of ERN1 induces anti-angiogenic gene expressions and suppresses tumor growth. – In: *Molecular and Cellular Mechanisms in Angiogenesis.* Capri, Italy. – 2012. – P. 75.
42. Kyriakakis E., Philippova M., Joshi M.B. et al. T-cadherin attenuates the PERK branch of the unfolded protein response and protects vascular endothelial cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *Cell. Signall.* – 2010. – **22**. – P. 1308–1316.
43. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 8. – P. 3496–3499.
44. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis // *Nat Med.* – 2011. – **17**, № 10. – P. 1251–1260.
45. Lee S.K., Kim Y.S. Phosphorylation of eIF2 α attenuates statin-induced apoptosis by inhibiting the stabilization and translocation of p53 to the mitochondria // *Int. J. Oncol.* – 2013. – **42**, № 3. – P. 810–816.
46. Liu C.Y., Kaufman R.J. The unfolded protein response // *J. Cell Sci.* – 2003. – **116**, Pt 10. – P. 1861–1862.
47. Magagnin M. G., Koritzinsky M., Wouters B. G. Patterns of tumor oxygenation and their influence on the cellular hypoxic response and hypoxia-directed therapies // *Drug Resistance Updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* – 2006. – **9**, № 4–5. – P. 185–197.
48. Mahadevan N. R., Rodvold J., Sepulveda H. et al. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – **108**, № 16. – P. 6561–6566.
49. Mahadevan N. R., Zanetti M. Tumor stress inside out: cell-extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the

- tumor microenvironment // *J. Immunol.* – 2011. – **187**, № 9. – P. 4403–4409.
50. Marciniak S.J., Ron D. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease // *Physiol. Rev.* – 2006. – **86**. – P. 1133–1149.
 51. McIntyre E., Blackburn E., Brown P.J. et al. The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – **122**. – P. 105–110.
 52. Minchenko A.G., Leshchinsky I., Opentanova I.L. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 8. – P. 6183–6187.
 53. Minchenko D., Hubenya O., Terletsky B. et al. Blockade of the endoplasmic reticulum stress sensor inositol requiring enzyme-1 changes the expression of cyclin and growth arrest-specific genes in glioma cells // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska.* – 2010. – **23**, № 3. – P. 179–184.
 54. Minchenko D.O., Hubenya O.V., Terletsky B.M. et al. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in glioma cell line U87 and its subline with suppressed activity of signaling enzyme endoplasmic reticulum-nuclei-1 // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2011. – **83**, № 1. – P. 18–29.
 55. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S. V. et al. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line // *Amer. J. Mol. Biol.* – 2012. – **2**, № 1. – P. 21–31.
 56. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S.V. Kharkova A.P., Minchenko O.H. Expression of casein kinase genes in glioma cell line U87: effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation // *Nat. Sci.* – 2012. – **4**, № 1. – P. 38–46.
 57. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danylovskiy S.V. et al. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of mRNA of the retinoblastoma binding proteins in glioma cells // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, № 1. – P. 57–68.
 58. Minchenko D.O., Kharkova A.P., Hubenya O.V., Minchenko O.H. Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRA D, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation // *Endocr. regulation.* – 2013. – **47**, № 1. – P. 15–26.
 59. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Ratushna O.O. et al. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown // *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – **2**, № 2, 198–206.
 60. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I.L. Ogura T., Minchenko D.O., Caro J., Komisarenko S.V., Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors // *Biochimie.* – 2005. – **87**, № 11. – P. 1005–1010.
 61. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *FEBS Lett.* – 2004. – **576**, № 1. – P. 14–20.
 62. Moenner M., Pluquet O., Bouche-careilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 22. – P. 10631–10634.
 63. Mozos A., Roue G., Lopez-Guillermo A. The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large b-cell lymphoma // *Am. J. Pathol.* – 2011. – **179**, № 5. – P. 2601–2610.
 64. Muaddi H., Majumder M., Peidis P. et al. Phosphorylation of eIF2α at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency // *Mol. Biol. Cell.* – 2010. – **21**, № 18. – P. 3220–3231.
 65. Nagelkerke A., Bussink J., Mujcic H. et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response // *Breast Cancer Res.* – 2013. – **15**, № 1. – P. R2.
 66. Neelam S., Brooks M.M., Cammarata P.R. Lenticular cytoprotection. Part 1: The role of hypoxia inducible factors-1α and -2α and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell survival in hypoxia // *Mol. Vis.* – 2013. – **19**. – P. 1–15.
 67. Neill T., Painter H., Buraschi S. et al. Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3 // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, № 8. – P. 5492–5506.
 68. Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M. et al. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, № 10. – P. 6397–6404.
 69. Park S.W., Zhou Y., Lee J. et al. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation // *Nat Med.* – 2010. – **16**, № 4. – P. 429–437.
 70. Pereira E.R., Liao N., Neale G.A., Hendershot L.M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response // *PLoS One.* – 2010. – **5**, № 9. – P. e12521.
 71. Rivera L.B., Bradshaw A.D., Brekken R.A. The regulatory function of SPARC in vascular biology // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – **68**, № 19. – P. 3165–3173.
 72. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth // *Cancer Research.* – 2004. – **64**. – P. 5943–5947.
 73. Romero-Ramirez L., Cao H., Regalado M.P. et al. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas // *Translat. Oncology.* – 2009. – **2**, № 1. – P. 31–38.
 74. Saito A., Ochiai K., Kondo S. et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-

- ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2 // *J. Biol. Chem.* – 2011. – **286**, № 6. – P. 4809–4818.
75. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – **65**, № 6. – P. 862–894.
76. Schröder M., Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – **74**. – P. 739–789.
77. Seo D.W., Saxinger W.C., Guedez L. et al. An integrin-binding N-terminal peptide region of TIMP-2 retains potent angio-inhibitory and anti-tumorigenic activity in vivo // *Peptides*. – 2011. – **32**, № 9. – P. 1840–1848.
78. Shen X., Zhang K., Kaufman R.J. The unfolded protein response – a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum // *J. Chem. Neuroanat.* – 2004. – **28**, № 1–2. – P. 79–92.
79. Svensson K.J., Kucharzewska P., Christianson H.C. et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – **108**, № 32. – P. 13147–13152.
80. Thorpe J.A., Schwarze S.R. IRE1 α controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1 // *Cell Stress & Chaperones*. – 2010. – **15**, № 5. – P. 497–508.
81. Tolino M.A., Block E.R., Klarlund J.K. Brief treatment with heparin-binding EGF-like growth factor, but not with EGF, is sufficient to accelerate epithelial wound healing // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2011. – **1810**, № 9. – P. 875–878.
82. Wang M., Ye R., Barron E. et al. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2010. – **17**, № 3. – P. 488–498.
83. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease // *J. Cell. Biol.* – 2012. – **197**, № 7. – P. 857–867.
84. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease // *J. Cell. Biol.* – 2012. – **197**, № 7. – P. 857–867.
85. Woehlbier U., Hetz C. Modulating stress responses by the UP α osome: a matter of life and death // *Trends Biochem. Sci.* – 2011. – **36**, № 6. – P. 329–337.
86. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J. et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme // *J. Exp. Med.* – 2011. – **208**, № 2. – P. 313–326.
87. Woo C.W., Cui D., Arellano J. et al. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – **11**, № 12. – P. 1473–1480.
88. Wu J., Kaufman R.J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response // *Cell Death Differ.* – 2006. – **13**, № 3. – P. 374–384.
89. Yuzefovych L.V., Musiyenko S.I., Wilson G.L., Rachek L.I. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice // *PLoS One*. – 2013. – **8**, № 1. – P. e54059.
90. Zhang K., Kaufman R.J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease // *Neurology*. – 2006. – **66**, № 2. – Suppl 1. – S102–S109.
91. Zhou J., Liu C.Y., Back S.H. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – **103**, № 39. – P. 14343–14348.
92. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. // *Nat. Med.* – 2011. – **17**, № 3. – P. 356–365.
93. Zou J., Li P., Lu F. et al. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells // *J. Hematol. Oncol.* – 2013. – **6**, № 1. – P. 3.

*Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Нац. мед. академія післядиплом. освіти ім. П.Л. Шупика, Київ
E-mail: ominchenko@yahoo.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 10.04.2013.*

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



К ЮБИЛЕЮ АЛЬБЕРТА МИХАЙЛОВИЧА ЗАЙЧИКА

8 января 2013 г. исполнилось 75 лет видному российскому патофизиологу профессору Альберту Михайловичу Зайчику. Он родился в 1938 г. в Ленинграде, в семье врача. Всесторонне одаренного юношу увлекали самые различные сферы деятельности, в которых он добивался успеха: джазовая музыка, планизм, мотоциклетный спорт, радиодело. Но семейные медицинские традиции привели его в Ленинградский санитарно-гигиенический медицинский институт, который А.М. Зайчик и окончил в 1962 г. Еще в студенческие годы он начал заниматься экспериментальной медициной в кружке СНО кафедры патологической физиологии и стал ближайшим учеником легендарного советского патофизиолога Л.Р. Перельмана (1900–1969), к которому поступил в аспирантуру. Л.Р. Перельман – выдающийся представитель школы академика А.А. Богомольца (1881–1946) в патофизиоло-

гии, один из создателей учения о цитотоксинах, привил своему ученику блестящую культуру экспериментальной работы и передал ему интерес к проблемам физиологического и патологического аутоиммунитета и к иммуноэндокринологии. В 1965 г. А.М. Зайчик с блеском защитил кандидатскую диссертацию на тему «О роли щитовидной железы в реакциях системы передняя доля гипофиза – кора надпочечников». В 1965–1970 гг. он работал ассистентом кафедры патологической физиологии Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института, а затем (1970–1977 гг.) – доцентом той же кафедры. В 1974 г. ему была присуждена ученая степень доктора медицинских наук (тема диссертационной работы – «К механизмам стимуляции гормонообразования в корковом веществе надпочечников и щитовидной железе»). В декабре 1976 г. А.М. Зайчик был избран на должность заведующего кафедрой патологической физиологии Ленинградского педиатрического медицинского института. В июне 1978 г. ему было присвоено звание профессора. Именно на этой кафедре, которой когда-то (1938–1950 гг.) заведовал его учитель Л.Р. Перельман, А.М. Зайчик вступил в пору творческого расцвета. Работы А.М. Зайчика и его сотрудников привели к получению иммуноглобулинов, стимулирующих генетический аппарат эндокринных клеток, влияющих на рост и функции эндокриноцитов. Обладая мировой новизной, эти труды продолжают линию исследований, начатых еще учениками И.И. Мечникова (1845–1916) – основателем кафедры патофизиологии Педиатрического института Е.С. Лондоном (1869–1939) и Л.Р. Перельманом – и касаются проблемы регуляторной роли физиологических аутоантител. Начатые задолго до создания Н. Эрне (1911–1994) идиотип-антиидиотипической концепции иммунной системы, они в

дальнейшем блестяще в нее вписались и во многом опередили свое время. Разработанная А.М. Зайчиком теория иммуноглобулиновой регуляции клеточных функций, отводящая аутоантителам роль «указующего перста» в синхронизации морфофункциональных процессов различных клеток многоклеточного организма, нашла множество сторонников в разных странах мира. С 2005 г. проводятся Московские международные симпозиумы по проблемам физиологического и патологического аутоиммунитета, участники которых – ученые множества стран – считают работы А. М. Зайчика классическими для всего этого направления.

Прекрасный организатор и яркий педагог, обладающий личным инженерным талантом, А.М. Зайчик так преобразил научную и учебно-методическую базу своей кафедры, что превратил ее в передовой научный и учебный центр отечественной патофизиологии того периода, настоящую кузницу научно-преподавательских кадров, колыбель творческих инициатив, не имевших до этого аналогов в отечественном медицинском образовании. Это обеспечило высочайший уровень преподавания патофизиологии, приблизило тематику и методы научной работы на кафедре к передовым мировым образцам.

Начиная с 1986 г. по инициативе и под руководством профессора Зайчика в Белоруссии и России была реализована большая медико-социальная программа по изучению и преодолению медицинских последствий Чернобыльской аварии и других радиоэкологических катастроф. В ходе этого были разработаны новаторские медикосоциальные технологии, в дальнейшем нашедшие широкое применение в деле детской и подростковой диспансеризации.

Около 90 учеников А. М. Зайчика защитили под его руководством диссертации, стали кандидатами и докторами наук, руководят кафедрами, клиниками или лабораториями и трудятся во многих вузах, научных и лечебных учреждениях по всему миру. Многие тысячи учащихся слушали его незабываемые

лекции в студенческие годы. Так, его учениками на разных жизненных этапах были сотрудники медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета А.С. Колбин, Л.А. Слепых, В.Н. Тимченко, А.Н. Шишкин, В.И. Утехин, Л.П. Чурилов и другие.

Профессор Зайчик опубликовал около 400 научных трудов. Высокую оценку специалистов получили учебные пособия по общей патологии и по патофизиологии сердечно-сосудистой системы и книги «Иммунологическая регуляция клеточных функций» и «Нарушения иммунитета и метаболические расстройства», изданные под его редакцией. Многократно переиздавался и очень широко цитируется не только в учебной, но и в научной литературе положенный в основу преподавания во многих странах СНГ трехтомник А.М. Зайчика и Л.П. Чурилова «Патофизиология» (1999–2008). Заслуженным признанием пользуются практикум «Введение в экспериментальную патологию» коллектива авторов (2003) и руководство «Эндокринология подростков» Ю.И. Строева и Л.П. Чурилова (2004), вышедшие под редакцией профессора А.М. Зайчика. Он избран почетным членом Нью-Йоркской академии наук, действительным членом Международной Академии наук высшей школы и членом-корреспондентом Академии информатизации, президентом благотворительного Детского фонда Рауля Валленберга, оказавшего значительную помощь городскому детскому здравоохранению в трудные 90-е годы и содействовавшего развитию российско-шведского медицинского сотрудничества. Активный член Социально-экологического союза СССР, А.М. Зайчик внес большой вклад в дело охраны озера Байкал и другие социально значимые медико-экологические проекты.

Характерная особенность научно-профессионального подхода А.М. Зайчика – единство и взаимопроникновение фундаментальных и клинических интересов и задач. Его фундаментальные разработки в области имму-

нофизиологии и иммуноэндокринологии, пионерское применение им и его сотрудниками в патофизиологии ряда новых методов, базирующихся на передовых достижениях биофизики и биохимии (микрокалориметрия, иммуноконкурентный анализ), сочетаются с широким спектром прикладных клинико-патофизиологических работ, выполненных под его руководством. Здесь и трансплантология (в этой области у Альберта Михайловича 2 патента), и педиатрия, и детские инфекции, а в последнее время – экспериментальное и

клиническое применение стволовых клеточных технологий и разработка оптимальных методов эфферентной терапии.

Широкая эрудиция профессора Зайчика, его творческое горение и энтузиазм, присущий ему уникальный сплав интеллигентности и решительности, большое человеческое обаяние всегда оказывали огромное влияние на тех, кому выпало счастье учиться у него и работать с ним.

Желаем юбиляру здоровья, долголетия и новых творческих успехов.



Роман Іванович Янчій
(до 70-річчя з дня народження)

22 липня 2013 року виповнилося 70 років з дня народження і 40 років наукової та педагогічної діяльності доктора біологічних наук, завідувача відділу імунології і цитотоксичних сироваток Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, професора Романа Івановича Янчія. Р.І. Янчій народився 22 липня 1943 р. в с. Саджавка Надвірнянського району Івано-Франківської області в селянській сім'ї. Трудову діяльність розпочав в 1962 р. ветеринарним санітаром Чортківської райветлікарні на Тернопільщині, а після закінчення Бучацького зооветеринарного технікуму (1963 р.) працював зооветтехніком навчально-дослідного господарства Копичинського сільськогосподарського технікуму. Після служби в лавах Радянської Армії (1964–1967 рр.) закінчив біологічний факультет Чернівецького державного університету ім. Юрія Федьковича (1972 р.). Подальша професійно наукова діяльність Р.І. Янчія пов'язана з Інститутом фізіології ім.

О.О. Богомольця НАН України: він пройшов шлях від стажиста-дослідника, аспіранта, молодшого, старшого та провідного наукового співробітника до завідувача відділу імунології та цитотоксичних сироваток. У 1980 р. захистив кандидатську дисертацію на тему «Электрофизиологическое исследование действия антикардиальных антител на сердечную мышцу», науковим керівником був проф. Ильевич М.В. Наукова тематика відділу (а раніше він мав назви: відділ біологічно активних речовин, експериментальної терапії, якими керував відомий вчений професор Ю.О. Спасокукоцький) була продовженням ідей О.О. Богомольця з вивченням дії специфічних імунних сироваток на організм тварин і людини. В 2001 р. захистив докторську дисертацію «Механізми антитілоіндукованої модуляції кальцієвого гомеостазу в клітинах мішенях» (науковий консультант – д.б.н. І.М. Алексеева). Р.І. Янчій був піонером у використанні електрофізіологічних методичних підходів для з'ясування клітинно-молекулярних механізмів дії серцевих антитіл на організм. Виконані наукові праці і їх публікації сприяли визнанню використання методичних підходів і отриманню нових даних з механізму дії антитіл і дали можливість Р.І. Янчію на запрошення Б. Янковича (Югославія) в 1989 р. працювати в його лабораторії з електрофізіологічних досліджень впливу антитіл на процеси збудження в нервових клітинах. Основні напрямки його багатогранної наукової діяльності пов'язані з вивченням молекулярно-генетичних механізмів дії специфічних імунних чинників на організм людини і тварин, що є продовженням досліджень, закладених академіком О.О. Богомольцем – про реактивуючу і патогенетичну дію антитіл. Р.І. Янчію належать оригінальні модельні електрофізіологічні й імунологічні дослідження супротиорганних антитіл на серце, печінку та статеві клітини жіночих і чоловічих систем, які дають змогу з'ясувати їх природу,

біологічну і функціональну дію. На основі теоретичних і прикладних технологій ним розроблені методичні підходи і отримані нові біологічні стимулятори для підвищення продуктивної здатності і відтворюючої функції тварин (корів – АОЦС-к і свиноматок – АОЦС-с), які знайшли своє практичне застосування на великих промислових тваринницьких комплексах в Україні, Білорусі та Росії. Він є автором двох препаратів для лікування безпліддя гормонального генезу в жінок і розладів статевої функції у чоловіків. Нині Роман Іванович і його співробітники вивчають молекулярно-генетичні процеси розвитку гамет ссавців для оцінки їх фізіологічної придатності та можливості використання в новітніх репродуктивних технологіях екстракорпорального запліднення. Чимало сил і енергії віддає Р.І. Янчій педагогічній роботі та підготовці наукових кадрів. Багато років Р.І. Янчій працює професором Національного технічного університету «Київський політехнічний інститут», де розробив програмні матеріали і читає лекції з основ фізіології, біомедицини, молекулярної біології. Він підготував 12 магістрів і 10 спеціалістів з біології, електроніки і біомедицини. Доречно відзначити, що Р.І. Янчій є одним із перших викладачів природничого факультету при відновленні навчального закладу Києво-Могилянська академія та кафедр біофізики та фізіології медичного інституту Асоціації

народної медицини. Р.І. Янчій є членом редакційних рад трьох журналів медико-біологічного профілю та двох спеціалізованих рад із захисту кандидатських і докторських дисертацій, є лауреатом премії О.О. Богомольця НАН України, нагороджений медаллю «XX лет победы в ВОВ 1941–1945 гг.», нагороджений почесною грамотою Президії НАН України, йому присвоєно звання «Кращий винахідник НАН України», він брав активну участь у громадсько-корисній роботі Інституту, де в 1986–1988 рр. очолював профспілкову організацію. Одна з найбільших заслуг Р.І. Янчія – його постійна увага і піклування про молодь. Він завжди радіє успіхам своїх учнів, опікується їх подальшим науковим шляхом. Серед його учнів – 3 кандидати та 2 доктори наук. Р.І. Янчій є автором і співавтором двох монографій, 220 наукових праць, 4 методичних рекомендацій, 5 авторських свідоцтв і патентів України. В особі Р.І. Янчія поєднані прекрасні організаторські здібності, людська невідкупна доброта, наукова інтуїція і творчий пошук, висока професійна вимогливість до себе та колег по роботі. Свій ювілей Роман Іванович зустрічає в розквіті творчих сил, життєвої енергії і наукових задумів.

Співробітники Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ щиро і сердечно вітають ювіляра, бажають йому доброго здоров'я, щастя, радості, наснаги та нових задумів і злетів.



Віктор Миколайович Єльський
(до 80-річчя з дня народження)

19 липня 2013 р. виповнилося 80 років з дня народження професора, доктора медичних наук, члена-кореспондента АМН України, завідувача кафедри патофізіології Донецького державного медичного університету Єльського Віктора Миколайовича.

В.М. Єльський народився в м. Новоросійську Краснодарського краю. Його батьки були засновниками Донецького медичного інституту (ДМІ) у 1930 р. У 1958 р. Віктор Миколайович закінчив з відзнакою лікувальний факультет ДМІ. Згодом став аспірантом у професора М.М. Транквілітаті на кафедрі патофізіології. Після курсів з медичної радіології в Центральному інституті вдосконалення лікарів (Москва) він створив на кафедрі радіоізотопну лабораторію, у якій вивчав проникність судинних і клітинних мембран і всіх гістогематичних бар'єрів внутрішніх органів при травматичному, гістаміновому, пептоновому й анафілактичному шоках. У 1965 р. захистив кандидатську дисертацію на тему «Проницаемость гематоэнцефаличес-

кого барьера при шоке (по данным опытов с P^{32} и $Bг^{32}$)».

У 1966 р. В. М. Єльський став доцентом кафедри патофізіології і почав вивчати регіонарну гемодинаміку й обмін гістаміну при гетеротрансфузійному та геморагічному шоках, їхню корекцію Н-холінолітиками. У 1967 р. в Інституті загальної патології та патофізіології (Москва) у академіка О.М. Чернуха він ознайомився з методом дослідження мікроциркуляції, а в лабораторії патофізіології Інституту швидкої допомоги (Ленінград) освоїв дослідження гемодинаміки при шоку на системному, органному і мікроциркуляторному рівнях. Цю роботу було проведено на кафедрі патофізіології ДМІ.

У 1968 р. Віктор Миколайович пройшов курси в Центральному інституті вдосконалення лікарів (Москва) з патофізіології обміну та гормональної регуляції під керівництвом Заслуженого діяча науки професора С.М. Лейтеса і переобладнав біохімічну лабораторію кафедри, оснастивши її сучасною апаратурою, що дає змогу проводити дослідження на субклітинному і молекулярному рівнях.

У 1977 р. В.М. Єльський в Інституті загальної та патологічної фізіології АМН СРСР у Москві захистив докторську дисертацію на тему «Функция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и обмен биогенных аминов при шоке от длительного раздавливания мягких тканей». Вона лягла в основу монографії «Синдром длительного раздавливания» (Кишинів, 1984), яка одержала позитивну оцінку Ленінградського інституту швидкої допомоги і була відзначена ювілейною медаллю засновника інституту – І.І. Джанелідзе (1986).

Віктор Миколайович відкрив новий перспективний напрямок дослідження проблем екстремальних станів, для реалізації якого у 1973 р. Постановою ДКНТ СРСР на базі кафедри патофізіології ЦНДЛ ДМІ під його науковим керівництвом була створена

міжкафедральна міжвідомча лабораторія з вивчення шоку. У 70–80-х роках проведено роботу з ідентифікації травматичного токсину, ліпідної пероксидації й її фармакокорекції при СТР та видано монографію «Антиоксидантная и антигипоксанта́ная терапия травматического шока» (1992). У 1997 р. за цю працю Віктор Миколайович був нагороджений премією Президії АМН України за кращу роботу з теоретичної медицини.

З 1981 р. В.М. Єльський – професор кафедри патофізіології ДМІ. У 1982 р. його призначили членом Проблемної комісії АМН СРСР «Эстремальные и терминальные состояния», з 1984 р. і до теперішнього часу Віктор Миколайович – заступник голови комісії. У 1985 р. він член Ради з фізіології людини і тварин АН СРСР.

У 80-ті роки лабораторія з вивчення шоку була залучена до виконання наукових програм з проблеми «Травма военного времени», що здійснювалися за завданням уряду. У зв'язку з цим було проведено спільні дослідження з ДонНДІТО і гірничорятувальною службою Донбасу МВП України з прогнозування травматичної хвороби. Дані цих досліджень стали надалі матеріалом для видання книги «Медицинская сортировка пострадавших при стихийных бедствиях и крупных катастрофах» (Рига, 1990), що одержала Велику медаль ВДНГ СРСР (1990). Матеріали з патогенетичної фармакокорекції шоку були подані на ВДНГ України (1991). Проблема етіології та патогенезу травматичної хвороби протягом багатьох років успішно розробляється на кафедрі патофізіології й у ДонНДІТО, особливо після того, як В.М. Єльський з 1997 р. став консультантом і членом Ради цього інституту. Підсумок співробітництва – видання монографії «Избранные аспекты патогенеза и лечения травматической болезни» (2002).

У 90-ті роки В.М. Єльський визначив на кафедрі новий, надзвичайно актуальний науковий напрямок – вивчення вибухової шахтної травми. У 1992 р. на Симпозіумі Міжнародного товариства патофізіологів у Лодзі

В.М. Єльського за доповідь з екстремальної шахтної патології було нагороджено медаллю Польського фізіологічного товариства.

З 1999 р. В.М. Єльський бере активну участь у становленні Інституту невідкладної та відновлювальної хірургії АМН України, будучи консультантом, членом Ради інституту, а також членом Спеціалізованої Ради з хірургії та дитячої хірургії при цьому інституті. У результаті виконання комплексних розробок була видана спільна монографія «Взрывная шахтная травма» (2002), за яку було отримано премію Президії АМН України (2003).

В.М. Єльський зробив великий внесок у вивчення вітчизняної патофізіології, зокрема екстремальної патології. Він отримав оригінальні результати в трьох актуальних (особливо для Донбасу), нових, перспективних напрямках: 1) порушення нейрогуморального (ендокринного) гомеостазу і методи його патогенетичної корекції з застосуванням нейротропних препаратів різного фармакогенезу; 2) порушення метаболізму «шокової» клітини на субклітинному рівні, її біоенергетики і гіпоксії, шляхи їхнього відновлення за допомогою субстратів і ферментів, антигіпоксантів та антиоксидантів, гіпербаричної оксигенації; 3) шокова токсемія і детоксикація з використанням ліпосом та оригінального діалізатора на рідких динамічних мембранах. Узагальнення великого матеріалу з гуморальної та функціональної діагностики, вибір найбільш інформативних критеріїв прогнозування виходу з шоку, кореляційно-регресійний їхній аналіз дозволили створити найпростіші планіметричні пристрої для практичного використання їх на дошпитальному етапі. Отримані нові результати послужили для аргументації побудови концепції та теорії травматичної хвороби.

У 1993 р. Віктора Миколайовича обрано членом ВАК України, а у 1994 р. – членом-кореспондентом Академії медичних наук України за фахом «патофізіологія» та членом наукової Ради з теоретичної та профілактич-

ної медицини при Президії АМН України. У 2002 р. В.М. Єльський – член Спеціалізованих вчених рад з хірургії і дитячої хірургії при ІНВХ АМНУ, у 2004 р. з ревматології і патофізіології при ДОНДМУ. Він автор понад 800 друкованих наукових праць, з них 16 номографій, 21 винаходів, 100 міжнародних публікацій, член 3 міжнародних товариств (з патофізіології, нейроендокринології і Європейського Shock Society), член редколегій 13 журналів.

В.Н. Єльський зробив великий особистий внесок у вітчизняну патофізіологію (екстремальна патофізіологія), збагатив науку значними досягненнями. Висококваліфікований спеціаліст, один з ведучих учених у галузі патофізіології. Він створив наукову школу (19 докторів і 18 кандидатів наук), його учні очолюють інститути, кафедри та лабораторії в Україні, Росії та за кордоном.

Протягом 30 років В.М. Єльський завідує кафедрою патофізіології, проводить велику роботу з удосконалення й оптимізації навчального процесу.

Віктор Миколайович – талановитий організатор, завжди лідер у колективі, прекрасний

громадський працівник, освічена, висококультурна, інтелігентна людина. Протягом багатьох років він займався естетичним вихованням студентської молоді, був членом Головної ради товариства охорони пам'ятників історії та культури України, активно працює в товаристві Польської культури Донбасу. Нагороджений 6 державними медалями та 4 науковими медалями (Росія, Польща, Німеччина, Великою медаллю ВДНГ).

У 2008 р. Рада університету вручила Віктору Миколайовичу медаль Національної академії наук України “за визначний особистий внесок у розвиток науки та вищої освіти”, а також медаль “Захиснику Вітчизни”.

В.М. Єльський 30 років завідувач кафедри патофізіології, чудовий лектор, проводить активну роботу з удосконалення та оптимізації навчального процесу, використання навчальних відеофільмів та комп'ютерних технологій, займається видавничою діяльністю.

Від усього серця і з любов'ю, повагою та вдячністю бажаємо ювілярові міцного здоров'я, плідної праці і подальших успіхів у виконанні творчих задумів у науковій і педагогічній роботі.

CONTENTS

V.F. Sagach, T.V. Shimanskaya, Y.V. Goshovska. Effects of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous hydrogen sulfide at myocardial ischemia-reperfusion	8
R.B. Strutynskiy, A.V. Kotsuruba, R.A. Rovenets, N.A. Strutynska, Yu.L. Yagupolskii, V.F. Sahach, A.A. Moibenko. Biochemical mechanisms of K _{ATP} channels opener flocalin (medical form) cardioprotective action at ischemia–reperfusion of myocardium	16
O.V. Lun'ko, O.A. Fedorenko S.M. Marchenko. The effect of Ca ²⁺ on the properties of the large conductance cation channels of the nuclear envelope of the cerebellar neurons	28
V.V. Voytenko, V.V. Konopelnyuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Appearance of prediabetic state under chronic alcohol intoxication	33
L.D. Liubych, V.M. Semenova, N.I. Lisyany. The comparative pathomorphological evaluation of the mice-recipient's brain cell-tissue reactions by the intracerebral implantation of syngeneic and allogeneic neurocells	40
R.I. Yanchiy, O.N. Kalejnikova, T.Yu. Voznesenskaya, T.V. Blashkiv, Yu.P. Bidzilya. Mice myometrial contractivity features in conditions of mitochondrial functional changes	51
O. Y. Andrieieva, O. O. Soldatov. Functional morphology of nucleic erythrocytes during hypoxia (in vitro experiments)	56
V.V. Shukhtin, A.I. Gozhenko, A.P. Lebitskiy. Disbiotic aspects of pathogenesis of skin injury in rats with immunodeficit	63
O.V. Maksymchuk, M.O. Chashchyn. Stress-induced changes in the content of cytochrome P ₄₅₀ 2E1 in the liver of mice with chronic psycho-emotional overexertion	67
T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova, T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko. Glycoproteins of mucus of gastric and duodenal wall surface during ulcerogenesis and the impact of fenugreek	74
O.M. Parkhomenko, O.S. Gurjeva, Yu. V. Kornatrskiy, S.N. Kozhukhov, O.O. Sopko. Impact of renal dysfunction on clinical course of myocardial infarction complicated by acute heart failure in patients with preserved systolic function	80
N.N. Veselovska, Z.F. Veselovska, I.M. Slobodyanuk, M.I. Slobodyanuk. Influence of professional peculiarities as risk factor of the development of vascular eye pathology in surgeons.	88

REVIEWS

D.O. Minchenko, K.I. Kubaichuk, O.V. Hubenia, I.V. Kryvdiuk, E.V. Khomenko, R.M. Herasymenko, R.V. Sulik, N.K. Murashko, O.H. Minchenko. Endoplasmic reticulum stress and angiogenesis	93
--	----

JUBILEE DATES

