

# Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 2 2014

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

- Маслов В.Ю., Веселовський М.С., Москалюк А.О., М'ясоєдов М.Ф., Шрам С.І., Федулова С.А.* Протекторна дія пептиду пролін-гліцин-пролін на електрофізіологічні властивості культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні . . . . . 3
- Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Данилович Г.В., Костерін С.О.* Оксид азоту як один із регуляторів енергозалежного транспорту  $Ca^{2+}$  в мітохондріях міомерія . . . . . 12
- Гарбузова В.Ю., Полоніков О.В., Строй Д.О., Матлай О.І., Атаман Ю.О., Сухарева В.А., Атаман О.В.* Аналіз впливу поліморфізму  $C^{677T}$  гена  $N^5, N^{10}$ -метилентетрагідрофолатредуктази на розвиток ішемічного інсульту у людей з різними факторами його ризику . . . . . 18
- Компанець І.В., Степанець І.О., Войтенко В.В., Гребіник Д.М., Остапченко Л.І.* Активність інтерферонзалежної 2',5'-олігоаденілатсинтетази в лімфоїдних клітинах тимуса щурів при сумісній дії етанолу та препарату оцтовокислого цинку . . . . . 25
- Владімірова І.А., Філіппов І.Б., Падурару О.Н., Шуба Є.Я., Кулієва Є.М., Шуба Я.М.* Зміни нервово-м'язової передачі в гладеньких м'язах сечового міхура щурів з експериментальним цукровим діабетом . . . . . 31
- Topol I.A., Kamyshny A.M., Abramov A.V., Kolesnik Yu.M.* Expression of XBP1 in lymphocytes of small intestine rats under chronic social stress and modulation of intestinal microflora composition . . . . . 38
- Руццак В.В., Чащин М.О.* Зміни вмісту інсуліну в підшлунковій залозі морських свинок при метаболічному синдромі . . . . . 45
- Фоменко І.С., Бондарчук Т.І., Білецька Л.П., Панасюк Н.Б., Склярів О.Я.* Показники NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу та пригнічення циклооксигенази . . . . . 51

<i>Олещук О.М.</i> Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на біохімічні показники функціонального стану печінки щурів . . . . .	57
<i>Савченко О.А., Вірченко О.В., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Бабенко Л.П., Лазаренко Л.М., Співак М.Я.</i> Розвиток експериментального ожиріння у щурів, викликаного дією глутамату натрію, на тлі введення пробіотиків . . . . .	63
<i>Ковальова В.А., Шевченко А.Є., Остапченко Л.І.</i> Дія природних антиоксидантів аммівіту та сквалену на вміст ліпідів, білків і вуглеводів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментального ульцерогенезу . . . . .	70
<i>Зеленюк В.Г., Заморський І.І., Горошко О.М.</i> Вплив статинів на розвиток ниркової недостатності у білих щурів . . . . .	75
<i>Селюкова Н.Ю., Карпенко Н.О., Коренєва Є.М., Сомова О.В., Смоленко Н.П., Почерняєва С.С., Бречка Н.М.</i> Фітоестрогенізація самців-щурів для соматостатевого розвитку та фертильності їхніх нащадків . . . . .	82
<i>Быков И.М., Есауленко Е.Е., Сепиашвили Р.И., Хильчук М.А.</i> Оценка эффективности антиоксидантных свойств липофильных продуктов растительного происхождения in vitro методом липосомальной модельной тест-системы . . . . .	88
<i>Коцан І. Я., Козачук Н. О., Мамчич Т. І.</i> $\alpha$ -Активність мозку чоловіків і жінок за умов дивергентного мислення . . . . .	93
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Літовка І.Г., Мазепа-Крижанівська У.О., Березовський В.Я.</i> Вплив мелатоніну на метаболізм кісткової тканини . . . . .	102

В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, А.О. Москалюк, М.Ф. М'ясоєдов, С.І. Шрам, С.А. Федулова

## Протекторна дія пептиду пролін-гліцин-пролін на електрофізіологічні властивості культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні

*Досліджено вплив культивування з пептидом пролін-гліцин-пролін (PGP) на електрофізіологічні характеристики нейронів гіпокампа щура в моделі ексайтотоксичного пошкодження, викликаного аплікацією глутамату (100 мкмоль/л, 5 хв). Було встановлено, що нейрони, які культивувались за наявності 10 мкмоль/л пептиду PGP, при ексайтотоксичному пошкодженні зазнавали менших негативних змін у порівнянні з контрольними клітинами. Культивування з пептидом достовірно впливало на зміну наступних параметрів: потенціал спокою ( $-55 \pm 4$  мВ у контролі;  $-29 \pm 6$  мВ після аплікації глутамату;  $-38 \pm 5$  мВ після аплікації глутамату при культивуванні з пептидом), амплітуда ( $91 \pm 4$ ;  $65 \pm 5$ ;  $84 \pm 5$  мВ), тривалість ( $4,3 \pm 0,4$ ;  $9,5 \pm 1,6$ ;  $5,2 \pm 0,7$  мс), швидкості деполяризації ( $56$  [38, 84];  $27$  [21, 35];  $46$  [28, 62] мВ/мс) та реполяризації ( $-29$  [-38, -27];  $-20$  [-21, -18];  $-29$  [-33, -22] мВ/мс) потенціалу дії. Отримані результати свідчать, що нейропротекторні властивості пептиду PGP проявляються на рівні основних електрофізіологічних властивостей нейрона, відповідні клітинні механізми потребують подальших досліджень.*

*Ключові слова: гіпокамп, культура нейронів, ексайтотоксичне пошкодження, нейропротекторна дія, пептид пролін-гліцин-пролін.*

### ВСТУП

До речовин, що мають нейротрофічний, нейромодуляторний та нейропротекторний ефекти, належать синтетичний аналог фрагмента адренокортикотропного гормону (АКТГ) АКТГ(4-10) з амінокислотою послідовністю Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (пептид семакс), синтезований в Інституті молекулярної генетики РАН та продукти його протеолізу, зокрема пептид пролін-гліцин-пролін (PGP). Було показано, що останній, який в нормі наявний у крові як продукт деградації колагену та колагенподібних білків, має протидіабетичну, противиразкову, антикоагулянтну, антистрессорну та протийшемічну дію, стимулює експресію генів нейротрофінів та їх рецепторів у нейронах, а також впливає на поведінкові

показники [1–4]. Окремий інтерес викликає нейропротекторна дія PGP за умов глутаматної ексайтотоксичності. Глутамінова кислота є основним збуджуючим нейротрансмітером у центральній нервовій системі, проте при гострих порушеннях мозкового кровообігу її концентрація в міжклітинному просторі може сягати 1 ммоль/л і викликати пошкодження та загибель нервових клітин [5]. Раніше було встановлено, що при інкубації з PGP на 30 % збільшувалася виживаність культивованих нейронів гіпокампа після ексайтотоксичного впливу [6], однак при цьому зміни електрофізіологічних параметрів нейронів не досліджували. У нашій роботі було проаналізовано вплив довготривалого культивування з пептидом PGP на здатність

© В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, А.О. Москалюк, М.Ф. М'ясоєдов, С.І. Шрам, С.А. Федулова

нейронів гіпокампа щура підтримувати сталі електрофізіологічні властивості соматичної мембрани при ексайтотоксичному пошкодженні.

## МЕТОДИКА

*Культивування нейронів гіпокампа.* Методика культивування нейронів гіпокампа не відрізнялася від описаної раніше [7]. Новонароджених щурів лінії Вістар декапітували, гіпокамп виділяли та оброблювали протягом 10 хв 0,025%-м розчином трипсину при 34°C. Після механічної дисоціації з використанням пастерівських піпеток з різним діаметром отвору клітини висівали на покриті полі-L-орнітином/ламініном чашки Петрі з щільністю близько 30 тис. од/см<sup>2</sup>. Клітини культивували у середовищі такого складу: мінімальне середовище Ігла, 10%-ї кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO<sub>3</sub>, 6 мг/мл інсуліну, 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Для пригнічення проліферації гліальних клітин на 3-тю добу культивування до культурального середовища на 24 год додавали цитозин-А-D-арабіно-фуранозид у концентрації 5 мкмоль/л. Пептид PGP в концентрації 10 мкмоль/л додавали до середовища через годину після висівання та після відмивки клітин від цитозин-А-D-арабіно-фуранозиду. Електрофізіологічні дослідження проводили на 7–10-ту добу культивування.

*Електрофізіологія.* У роботі використовували фізіологічний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, HEPES – 10, глюкоза – 12; рН 7,4 (доведено NaOH). Досліди проводили при кімнатній температурі (22°C). Реєстрацію мембранних потенціалів у конфігурації “ціла клітина” здійснювали з використанням внутрішньоклітинного розчину такого складу (ммоль/л): глюконат калію – 100, KCl – 50, MgCl<sub>2</sub> – 5, EGTA – 10, HEPES – 20; рН 7,4 (доведено KOH). Опір електродів-піпеток становив від 4,5 до 5,5 МОм. Реєстрацію викликаних ПД проводили при мембранно-

му потенціалі -70 мВ, для підтримування якого через нейрон пропускали відповідний постійний гіперполяризувальний струм. Нейрони активували послідовними прямокутними деполяризувальними імпульсами струму тривалістю 500 мс з інкрементом амплітуди 5-10 пА. Після такого контрольного тестування їх піддавали ексайтотоксичному пошкодженню [8]: експериментальну камеру протягом 5 хв перфузували фізіологічним розчином з доданою до нього L-натрієвою сіллю глутамінової кислоти (Glu) у концентрації 100 мкмоль/л. При цьому реєстрували зміни мембранного потенціалу в окремому нейроні, а після відмивання проводили електрофізіологічну реєстрацію від інших клітин, що зазнали ексайтотоксичного впливу. Електрофізіологічні характеристики нейронів визначали у часовому проміжку 20–60 хв після аплікації Glu, при цьому помітного тренду у значеннях досліджуваних параметрів виявлено не було.

Для нейронів, які культивували у звичайному середовищі та за наявності PGP у концентрації 10 мкмоль/л, до та після аплікації Glu визначали потенціал спокою, опір мембрани, частоту тонічної імпульсації (за її наявності) та параметри окремого потенціалу дії (ПД): поріг, амплітуду, тривалість (ширина на половині висоти), максимальні швидкість деполяризації та реполяризації, амплітуду слідової гіперполяризації (відносно порогу). Параметри окремого ПД визначали при стимулі мінімальної амплітуди, прикладання якого викликало генерацію ПД.

Аналіз та статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакета Clampfit 9.0. Для перевірки статистичних гіпотез (P<0,05) використовували дисперсійний аналіз (для нормально розподілених вибірок) і непараметричний критерій Крускала–Волліса (при відмінності від нормального розподілення). Перевірку гіпотези про належність вибірок до нормально розподіленої генеральної сукупності проводили за тестом Шапіро–Вілка. Результати

представлено у вигляді: середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього (при нормальному розподіленні) або у вигляді: вибіркові медіана, перша та третя квартилі (при відмінності від нормального розподілення).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На культивованих нейронах гіпокампа після утворення конфігурації “ціла клітина” у відповідь на прикладання деполяризуючих імпульсів струму спостерігали тонічну або фазну генерацію ПД (вставка на рис. 1, 2). Для контрольних і культивованих з PGP нейронів достовірно не відрізнялись значення потенціалу спокою, опору мембрани та наступні параметри окремого викликаного ПД: поріг, амплітуда, тривалість (ширина на половині висоти), та максимальна швидкість деполяризації/реполяризації. При цьому максимальні швидкості деполяризації та реполяризації мали асиметричне розподілення. Відповідні середні значення, стандартні похибки середнього, медіани та квартилі наведено у таблиці. Статистично достовірну різницю показників ПД у контролі та при культивуванні

з PGP спостерігали для амплітуди слідової гіперполяризації, відповідні середні значення становили  $22 \pm 2$  ( $n=14$ ) та  $27 \pm 2$  мВ ( $n=25$ ). У відповідь на деполяризацію тривалістю 500 мс тонічну генерацію ПД спостерігали у 9 з 16 контрольних нейронів (56 %) з середньою частотою імпульсації  $21 \pm 3$  с<sup>-1</sup>, тоді як при культивуванні з пептидом – у 22 з 24 (92 %) при середній частоті  $17 \pm 4$  с<sup>-1</sup>. Відмінності у амплітуді слідової гіперполяризації та характері імпульсації нейронів визначаються потенціалзалежними калієвими провідностями мембрани, вплив пептиду на які може бути опосередковано його описаною раніше стимулювальною дією на експресію генів нейротрофінів (і відповідних рецепторів) [3, 4], які в свою чергу активують широкий спектр клітинних процесів [9], а також безпосередньо впливають на калієві канали та, відповідно, збудливість і характер імпульсації нейрона [10].

На рис. 1 представлено реєстрацію змін мембранного потенціалу нейрона при аплікації Glu (100 мкмоль/л, 5 хв), яка призводила до високочастотної генерації ПД, що тривала кілька секунд, після чого розвивалася стійка

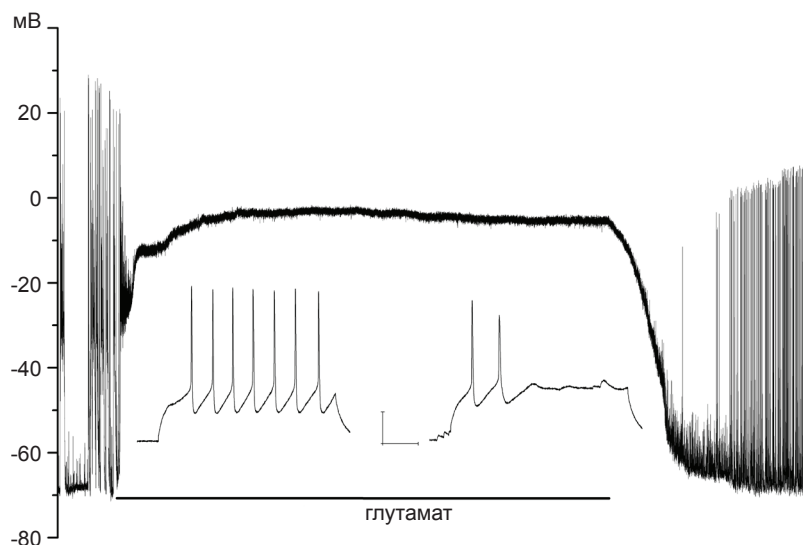


Рис. 1. Вплив аплікації глутамату на зміни мембранного потенціалу та викликані відповіді культивованого нейрона гіпокампа. Представлено реєстрацію мембранного потенціалу в конфігурації “ціла клітина” культивованого нейрона гіпокампа при аплікації глутамату в концентрації 100 мкмоль/л тривалістю 5 хв (суцільна лінія). Всь ординат: мембранний потенціал. На вставці – відповіді нейрона на деполяризуючий імпульс струму (30 пА, 500 мс) до (ліворуч) та після аплікації глутамату (праворуч). Калібрування на вставці: 20 мВ, 20 мс

деполяризація нейрона при мембранному потенціалі, значення якого було в межах від  $-40$  до  $3$  мВ. При цьому достовірної різниці середніх значень потенціалу при стійкій деполяризації у контролі та для нейронів, що культивували з PGP, не спостерігали: відповідні значення становили  $-16 \pm 6$  ( $n=7$ ) та  $-14 \pm 6$  мВ ( $n=10$ ). Це свідчить про те, що при такій постановці дослідів практично виключається протекторний вплив пептиду за рахунок теоретично можливого, хоча і прямо не підтвердженого, безпосереднього зв'язування PGP з глутаматним рецептором [11]. Таким чином, описані далі нейропротекторні ефекти пов'язані, вірогідно, з клітинними механізмами, що опосередковано впливають на електрофізіологічні характеристики нейронів. При відмиванні Glu потенціал спокою частково відновлювався, в окремих нейронах також спостерігали відновлення спонтанної активності (реєстрація з таким відновленням представлена на рис. 1).

Після аплікації Glu відведення в конфігурації "ціла клітина" від частини нейронів було неможливим – незважаючи на утворення гігаомного контакту, одразу після прориву мембрани значення гіперполяризувального струму, необхідного для підтримання потенціалу  $-70$  мВ, була понад  $1$  нА, а потенціал спокою був близьким до нуля. Частка таких контрольних клітин становила приблизно половину від загальної кількості, а при культивуванні з пептидом – третини, що узгоджується з даними Сторожевих та співавт. [6] про вплив PGP на виживаність культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні. Такі пошкоджені нейрони при визначенні середніх значень електрофізіологічних показників не враховувалися (наприклад, використовуючи відповідні вагові коефіцієнти), що, очевидно, не може послабити висновки щодо протекторної дії пептиду. При триваліших (10–15 хв) аплікаціях Glu електрофізіологічне відведення у

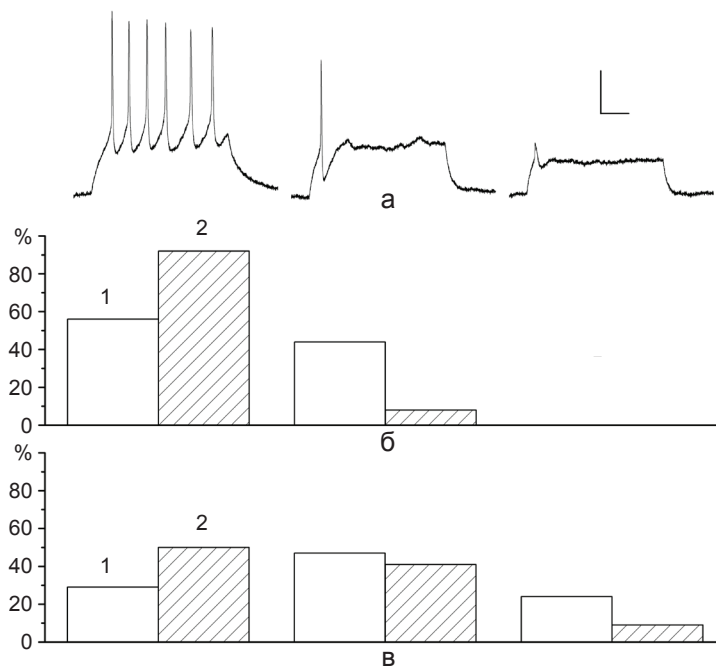


Рис. 2. Викликані деполяризацією потенціали дії нейронів гіпокампа: а – реєстрації різних типів викликаних відповідей (тонічна, фазна, відсутність потенціалу дії) на деполяризувальний імпульс струму трьох різних нейронів гіпокампа. Калібрування: 20 мВ, 100 мс. На діаграмах представлено значення часток нейронів у контролі (1) та нейронів, що культивувалися з пептидом пролін-гліцин-пролін (2), з відповідним типом викликаної відповіді до (б) та після (в) аплікації глутамату



конфігурації “ціла клітина” виявилось практично неможливим. Це суттєво ускладнює порівняння отриманих в нашій роботі результатів з літературними даними, адже переважна більшість досліджень клітинних механізмів ексайтотоксичності біохімічними та молекулярно-біологічними методами виконана при значно триваліших аплікаціях Glu (десятки хвилин, години, а в окремих роботах застосовувалась інкубація протягом кількох діб) [5].

Після аплікації Glu нейрони, потенціал спокою яких становив кілька десятків мілівольт, та для яких гіперполяризувальний струм, необхідний для підтримування потенціалу  $-70$  мВ, становив сотні пікоампер, у відповідь на деполяризувальний імпульс струму могли відповідати тонічною або фазною генерацією, у деяких нейронів (4 в контролі та 2 при культивуванні з пептидом) ПД був практично відсутній (див. рис. 2). Тонічну генерацію ПД спостерігали у 5 з 17 контрольних нейронів (29 %) з середньою частотою імпульсації  $16 \pm 2$  с<sup>-1</sup>, тоді як при культивуванні з пептидом – у 11 з 22 (50 %) при середній частоті  $18 \pm 2$  с<sup>-1</sup>. Розподіл нейронів з різним типом відповідей на деполяризацію до та після аплікації Glu представлено на рис. 2.

Середнє значення потенціалу спокою нейронів, що зазнали ексайтотоксичного пош-

кодження, становило  $-29 \pm 6$  мВ (n=18) у контролі та  $-38 \pm 5$  мВ (n=27) для нейронів, що культивувалися з PGP (різниця середніх статистично достовірна). В контролі та при культивуванні з пептидом після аплікації Glu достовірно відрізнялися наступні середні значення показників окремого викликаного ПД: амплітуда  $65 \pm 5$  та  $84 \pm 5$  мВ; тривалість  $9,5 \pm 1,6$  та  $5,2 \pm 0,7$  мс відповідно. Після аплікації Glu значення вибіркової медіани та квартилей для максимальних швидкостей деполяризації та реполяризації контрольних нейронів були 27, [21, 35] мВ/мс та  $-20$ ,  $[-21, -18]$  мВ/мс, а для нейронів, що культивувалися з пептидом – 46, [28, 62] мВ/мс та  $-29$ ,  $[-33, -22]$  мВ/мс відповідно. Середні значення опору мембрани, порога ПД та амплітуди слідової гіперполяризації достовірно не змінювалися. Відповідні середні значення, стандартні похибки середнього, медіани та квартилі наведено у таблиці.

Реєстрації окремих викликаних ПД та середні значення їх параметрів показано на рис. 3. Для зручності представлення результатів на діаграмі наведено середнє значення та похибка тривалості ПД, помножені на 10; для швидкостей деполяризації та реполяризації наведено середні значення та похибки середнього, які були розраховані формально

**Електрофізіологічні характеристики культивованих нейронів гіпокампа**

Параметр потенціалу дії	Контроль (n=14)	Контроль і глутамат (n=13)	Культивування з пептидом (n=25)	Культивування з пептидом і глутамат (n=25)
Потенціал спокою, мВ	$-55 \pm 4$	$-29 \pm 6$ *	$-56 \pm 4$	$-38 \pm 5$ **
Опір мембрани, ГОм	$0,55 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,11$ *	$0,57 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,07$
Поріг, мВ	$-29 \pm 1$	$-28 \pm 1$	$-30 \pm 1$	$-30 \pm 1$
Амплітуда, мВ	$91 \pm 4$	$65 \pm 5$ *	$95 \pm 3$	$84 \pm 5$ **
Тривалість, мс	$4,3 \pm 0,4$	$9,5 \pm 1,6$ *	$3,9 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,7$ **
Швидкість деполяризації, мВ/мс	56 (38; 84)	27 (21, 35) *	59 (42; 81)	46 (28, 62) **
Швидкість реполяризації, мВ/мс	$-29$ (-38; -27)	$-20$ (-21, -18) *	$-33$ (-41; -32)	$-29$ (-33, -22) **
Амплітуда гіперполяризації, мВ	$22 \pm 2$	$23 \pm 2$	$27 \pm 2$	$22 \pm 2$

\* статистично достовірна (P<0,05) різниця у порівнянні з контрольними значеннями (вплив ексайтотоксичного пошкодження). \*\* статистично достовірна (P<0,05) різниця у порівнянні зі значеннями після аплікації глутамату (вплив культивування з пептидом).

та не використовувалися для перевірки статистичних гіпотез.

Зміни показників ПД при ексайтотоксичному пошкодженні та стабілізуючий вплив на них культивування з пептидом можуть бути наочно зображені з використанням наступної діаграми розсіювання (рис. 4). Клітина, здатна до генерації ПД, представлена на діаграмі точкою (або двома – до та після аплікації Glu), абсциса якої відповідає максимальній швидкості деполяризації, а ордината – реполяризації. До аплікації ці параметри розподілені у достатньо широких межах (без достовірного впливу культивування з пептидом). Ділянка розсіювання для контрольних нейронів, що

знали ексайтотоксичного впливу, суттєво зменшується та зміщується в напрямку початку координат (див. рис. 4, а), а для нейронів, що культивувалися з пептидом – залишається подібною до такої у контролі (див. рис. 4, б), хоча відповідні значення медіан швидкостей деполяризації/реполяризації при розвитку ПД достовірно відрізняються (критерій Крускала-Волліса).

Було б логічним очікувати, що нейрони, від яких під час аплікації проводилося електрофізіологічне відведення у конфігурації “ціла клітина”, будуть за своїми параметрами відрізнятися від решти, адже кальцієвий буфер EGTA, який в концентрації 10 ммоль/л

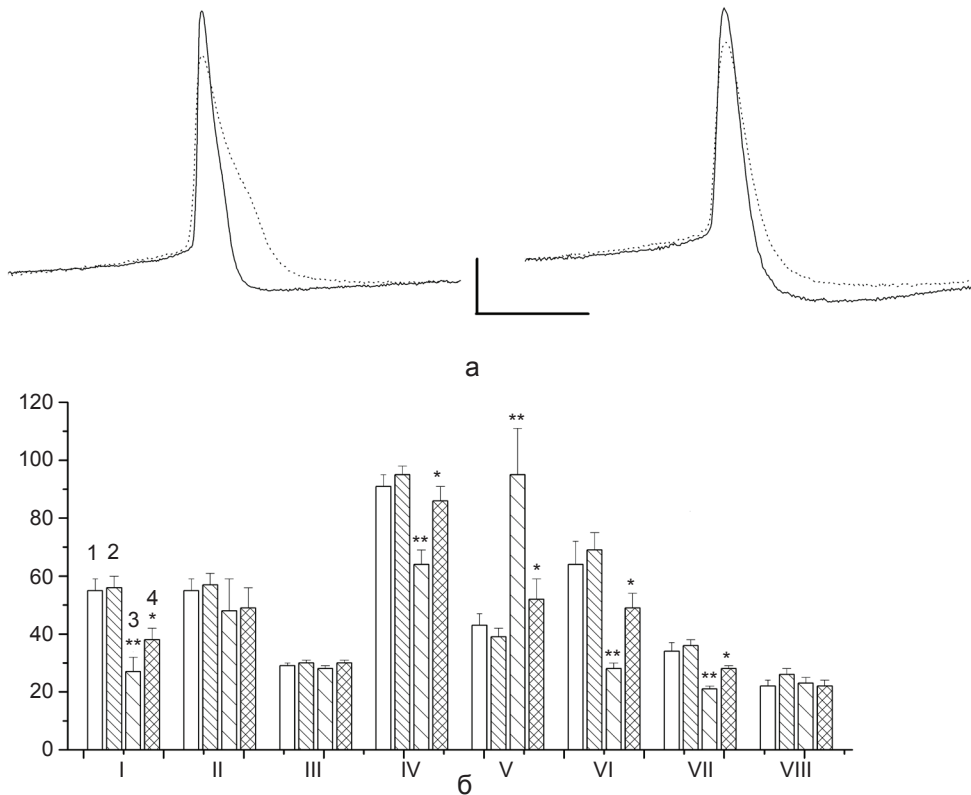


Рис. 3. Зміни форми окремого викликаного потенціалу дії нейронів гіпокампа під впливом аплікації глутамату: а – реєстрації викликаних потенціалів дії до (суцільна лінія) та після аплікації глутамату (пунктир) для контрольного нейрона (ліворуч) та нейрона, що культивувався з пептидом пролін-гліцин-пролін (праворуч), калібрування: 20 мВ, 10 мс, б – середні значення та стандартні похибки середнього досліджуваних електрофізіологічних характеристик: 1 – контроль, 2 – пептид, 3 – контроль і глутамат, 4 – пептид і глутамат; I – потенціал спокою, мВ, II – опір мембрани, ГОм, параметри потенціалу дії: III – поріг, мВ, IV – амплітуда, мВ, V – тривалість, мс, VI – швидкість деполяризації, мВ/мс, VII – швидкість реполяризації, мВ/мс, VIII – амплітуда гіперполяризації, мВ. \* $P < 0,05$  достовірна різниця у порівнянні з контролем (ефект ексайтотоксичного пошкодження); \*\* $P < 0,05$  достовірна різниця у порівнянні зі значеннями відповідних параметрів після аплікації глутамату (ефект культивування з пептидом)



був у внутрішньоклітинному розчині, міг виявляти певну протекторну дію. Проте таких відмінностей не було виявлено. Це може свідчити про те, що за таких умов основну роль у змінах характеристик нейронів відіграє збільшення вмісту внутрішньоклітинного натрію. Виявлена різниця показників ПД не може виникати внаслідок зменшення опору мембрани, яке у двох досліджених групах достовірно не змінювалось, а концентрація іонів натрію в нейроні під час відведення в конфігурації “ціла клітина” визначається складом внутрішньоклітинного розчину (виготовленим без додавання натрію). З літературних даних відомо, що після аплікації Glu тривалістю 5 хв протягом десятків хвилин спостерігається підвищення концентрації внутрішньоклітинного натрію до

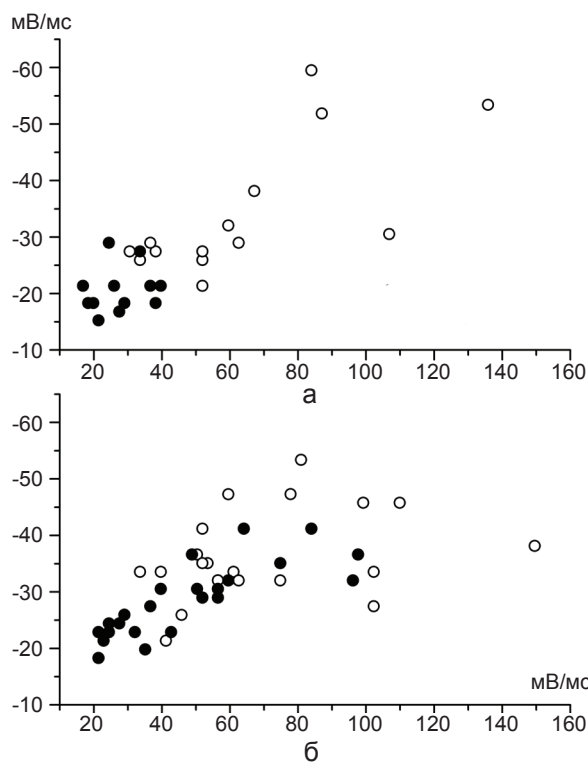


Рис. 4. Діаграми розсіювання значень максимальних швидкостей деполяризації та реполяризації потенціалів дії нейронів гіпокампа. Вісь абсцис – швидкість деполяризації, вісь ординат – швидкість реполяризації. Представлено результати до (○) та після (●) аплікації глутамату для контрольних нейронів (а) та нейронів, що культивувались з пептидом пролін-гліцин-пролін (б)

рівня близько 100 ммоль/л [12], що в свою чергу викликає зменшення кількості (інтерналізацію) потенціалзалежних натрієвих каналів на мембрані нейрона [13]. Тому є цілком вірогідним, що механізм протекторної дії пептиду пов'язаний з активацією АТФ-залежних процесів регуляції вмісту внутрішньоклітинного натрію. Зменшенням кількості функціональних натрієвих каналів можна пояснити і зміни розподілу нейронів за характером (тонічна/фазна) відповіді на деполяризацію. Для підтвердження цієї гіпотези потрібні дослідження змін окремих типів потенціалзалежних мембранних струмів при ексайтотоксичному пошкодженні.

З наших попередніх праць [7] і літературних даних [8] відомо, що інтенсивні синаптичні контакти між нейронами гіпокампа новонароджених щурів утворюються після 11-ї доби культивування. У цій роботі електрофізіологічне відведення від нейронів здійснювали на 7–10-ту добу культивування для запобігання впливу спонтанних постсинаптичних подій на показники викликаних ПД. Спонтанну активність спостерігали у 3 з 25 проаналізованих нейронів (12 %), при культивуванні у звичайному середовищі, а за наявності PGP – у 13 з 27 (48 %). Спонтанно активним після ексайтотоксичного пошкодження виявився один з 18 (6 %) контрольних нейронів та 7 з 27 (26 %) таких, що культивувались за наявності пептиду. Цей факт свідчить про певну активацію процесів синаптогенезу пептидом, що узгоджується з описаними в літературі властивостями гліпролінів і пептиду PGP зокрема [1–6] та потребує окремого дослідження. Також вірогідним може бути і певний кондиціонуючий вплив підвищеної спонтанної активності на збільшення стійкості нейронів до ексайтотоксичного пошкодження [14].

Отримані результати свідчать, що після аплікації Glu потенціал спокою, амплітуда, тривалість, максимальні швидкості деполяризації/реполяризації ПД нейронів гіпокампа щура, що культивувались за наявності

10 мкмоль/л пептиду PGP, зазнавали менших негативних змін у порівнянні з контрольними клітинами. Таким чином, нейропротекторні властивості пептиду PGP при ексайтотоксичному пошкодженні проявляється на рівні електрофізіологічних властивостей нейрона, відповідні клітинні механізми потребують подальших досліджень.

*Ця робота є частиною проекту спільних українсько-російських наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень "З'ясування природи нейротропних ефектів пептидів групи гліпролінів у нормі та на моделях пошкодження нейронів" (№ реєстрації 0112U004111).*

**В.Ю. Маслов, Н.С. Веселовский,  
А.А. Москалюк, Н.Ф. Мясоедов, С.И Шрам,  
С.А. Федулова**

#### **ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ПРОЛИН-ГЛИЦИН-ПРОЛИН НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИПОКАМПА ПРИ ЭКСАЙТОТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ**

Исследовано влияние культивирования с пептидом пролин-глицин-пролин на электрофизиологические характеристики нейронов гиппокампа крысы в модели эксайтотоксического повреждения, вызванного аппликацией глутамата (100 мкмоль/л, 5 мин). Было установлено, что нейроны, которые культивировались в присутствии 10 мкмоль/л пептида пролин-глицин-пролин, при эксайтотоксическом повреждении подвергались меньшим негативным изменениям по сравнению с контрольными клетками. Культивирование с пептидом достоверно влияло на изменение следующих параметров: потенциал покоя (-55±4 мВ в контроле; -29±6 мВ после аппликации глутамата; -38±5 мВ после аппликации глутамата при культивировании с пептидом), амплитуда (91±4; 65±5; 84±5 мВ), длительность (4,3±0,4; 9,5±1,6; 5,2±0,7 мс), скорости деполяризации (56 [38, 84]; 27 [21, 35]; 46 [28, 62] мВ/мс) и реполяризации (-29 [-38, -27]; -20 [-21, -18]; -29 [-33, -22] мВ/мс) потенциала действия. Полученные данные свидетельствуют, что нейропротекторные свойства пептида PGP проявляются на уровне основных электрофизиологических свойств нейрона, соответствующие клеточные механизмы требуют дальнейших исследований. Ключевые слова: гиппокамп, культура нейронов, эксайтотоксическое повреждение, нейропротекторное действие, пептид пролин-глицин-пролин.

**V.Yu. Maslov, N.S. Veselovsky, A.A. Moskalyuk,  
N.F. Myasoedov, S.I. Shram, S.A. Fedulova**

#### **PRETECTIVE ACTION OF PEPTIDE PROGLY-PRO ON ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONES DURING EXCITOTOXIC DAMAGE**

Electrophysiological characteristics of hippocampal neurones cultured with Pro-Gly-Pro peptide were studied using glutamate excitotoxicity model (excitotoxic damage was induced by 100 μM glutamate application during 5 min). It was found that negative changes in neurones cultured with 10 μM Pro-Gly-Pro were less prominent if compared with control ones. Culturing with the peptide significantly affected the following parameters: resting potential (-55±4 mV in control; -29±6 mV after glutamate application; -38±5 mV cultured after glutamate application), action potential amplitude (91±4; 65±5; 84±5 mV), duration (4,3±0,4; 9,5±1,6; 5,2±0,7 ms), depolarization (56 [38, 84]; 27 [21, 35]; 46 [28, 62] mV/ms) and repolarization (-29 [-38, -27]; -20 [-21, -18]; -29 [-33, -22] mV/ms) rates. The data obtained suggest that PGP exhibit its neuroprotective properties on a level of basic electrophysiological characteristics, appropriate cellular mechanisms require further investigations. Key words: hippocampus, neurones culturing, excitotoxicity, neuroprotective action, Pro-Gly-Pro peptide.

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;  
Institute of Molecular genetics, RAS, Moscow, Russia*

#### **REFERENCES**

1. Kopylova GN, Badmaeva SE, Levitskaya NG, Samonina GE, Umarova BA, Guseva AA. Effect of peptide Pro-Gly-Pro on stress-induced behavioral changes in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2004; **138**(1):5-7.
2. Martynova KV, Andreeva LA, Klimova PA, Kirillova IuG, Shevchenko VP, Nagaev Iu, Shram Iu, Shvets VI, Miasoedov NF. Structural-functional study of glycine- and proline-containing peptides (glyprolines) as potential neuroprotectors. *Bioorg. Khim.* 2009; **35**(2):165-171.
3. Stavchanskii VV, Tvorogova TV, Botsina AIu, Skvortsova VI, Limborskaia SA, Miasoedov NF, Dergunova LV. The effect of semax and its C-end peptide PGP on expression of the neurotrophins and their receptors in the rat brain during incomplete global ischemia. *Mol. Biol (Mosk)* 2011; **45**(6):1026-1035.
4. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010; **30**(1):71-79.
5. Khodorov B.I. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*

- 2004; **86**:279-351.
6. Storozhevykh TP, Tukhbatova GR, Senilova YE, Pinelis VG, Andreeva LA, Myasoyedov NF. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; **143**(5):601-604.
  7. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., Romanyuk S.G., Veselovsky N.S. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci* 1999; **92**(4):1217-1230.
  8. Norris C.M., Blalock E.M., Thibault O., Brewer L.D., Clodfelter G.V., Porter N.M., Landfield P.W. Electrophysiological mechanisms of delayed excitotoxicity: positive feedback loop between NMDA receptor current and depolarization-mediated glutamate release. *J. Neurophysiol.* 2006; **96**(5):2488-2500.
  9. Guo L., Yeh M.L., Cuzon Carlson V.C., Johnson-Venkatesh E.M., Yeh H.H. Nerve growth factor in the hippocamposeptal system: evidence for activity-dependent anterograde delivery and modulation of synaptic activity. *J. Neurosci.* 2012; **32**(22):7701-7710.
  10. Jia Z., Bei J., Rodat-Despoix L., Liu B., Jia Q., Delmas P., Zhang H. J. NGF inhibits M/KCNQ currents and selectively alters neuronal excitability in subsets of sympathetic neurons depending on their M/KCNQ current background. *Gen. Physiol.* 2008; **131**(6):575-587.
  11. V'unova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Shevchenko VP, Bobrov MY, Bezuglov VV, Myasoedov NF Binding of tripeptide Pro-Gly-Pro labeled at the C-terminal proline residue to plasma membranes of the rat forebrain. *Dokl Biol Sci* 2008; **419**:95-96.
  12. Kiedrowski L., Costa E. Glutamate-induced destabilization of intracellular calcium concentration homeostasis in cultured cerebellar granule cells: role of mitochondria in calcium buffering. *Mol. Pharmacol.* 1995; **47**(1):140-147.
  13. Dargent B, Couraud F. Down-regulation of voltage-dependent sodium channels initiated by sodium influx in developing neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**(15):5907-5911.
  14. Marini A.M., Jiang X., Wu X., Pan H., Guo Z., Mattson M.P., Blondeau N., Novelli A., Lipsky R.H. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids* 2007; **32**(3):299-304.

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

*Ин-т молекулярної генетики РАН, Москва, РФ*

*E-mail: masl@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 07.10.2013*

Ю.В. Данилович, О.В. Коломієць, Г.В. Данилович, С.О.Костерін

## Оксид азоту як один із регуляторів енергозалежного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ в мітохондріях міомеріа

*Досліджено вплив донора та попередника NO, а саме 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію та нітриту натрію на енергозалежний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольовані мітохондрії міомеріа щурів. Зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій оцінювали за допомогою методу спектрофлуориметрії та кальційчутливого зонда Fluo-4 AM.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-залежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями за наявності сукцинату суттєво стимулюється оксидом азоту, зокрема, нітропрусид натрію посилював транспорт в 1,6 раза відносно його контрольних значень. Ефект NO ставав значущим лише за умови попередньої інкубації мітохондрій з досліджуваними сполуками. Оскільки акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  за наявності нітропрусиду натрію ефективно пригнічувалася протонофором СССР і рутенієвим червоним (10 мкмоль/л), зроблено висновок про стимуляцію кальцієвого уніпортеру внутрішньої мітохондріальної мембрани оксидом азоту. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями за наявності нітропрусиду натрію виявилася не чутливою до дії специфічного інгібітора пори перехідної провідності циклоспорину (5 мкмоль/л). Це вказує на те, що роль пори перехідної провідності є менш суттєвою, ніж кальцієвого уніпортеру у процесах транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за умови дії на них оксиду азоту. Отже, оксид азоту стимулює енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями міомеріа, опосередковану функціонуванням кальцієвого уніпортеру їхньої внутрішньої мембрани.*

*Ключові слова: мітохондрії, оксид азоту, кальцій, кальцієвий уніпортер, міомеріа.*

### ВСТУП

Оксид азоту характеризується широким спектром функціональної активності, яка включає регуляцію серцево-судинної, нервової, ендокринної, імунної, репродуктивної систем організму [1–4]. Фізіологічні ефекти NO часто опосередковуються взаємодією із численними внутрішньо- та позаклітинними ефекторними молекулами і супрамолекулярними комплексами, включаючи хромопротеїни, тіоли, супероксид-аніон [5–7]. Оскільки мітохондрії (МХ) мають багато хромопротеїнів, зокрема, цитохромоксидазу, глутатіон, цистеїнівмісні білки і залізосірчані комплекси, а також виступають джерелом супероксид-аніона, вони є потенційною мішенню дії оксиду азоту або його редокс-форм [8–12]. Відкриття протягом останніх років можливості власного синтезу NO в МХ, зумовленого роботою мітохондріальної

© Ю.В. Данилович, О.В. Коломієць, Г.В. Данилович, С.О.Костерін

NO-синтази і нітрит/нітрат – редуктазною здатністю компонентів електронно-транспортного ланцюга [9, 12, 13], переконливо доводить важливість оксиду азоту у регуляції функціонування МХ.

Біологічна активність МХ істотно залежить від змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі та матриксі. Іони кальцію відіграють роль активаторів мітохондріальних дегідрогеназ і регулюють функціонування електронно-транспортного ланцюга.  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечує нормальне функціонування відповідних підтипів калієвих каналів у МХ, які є важливими для передачі сигналів та осморегуляції органел [14–16].

Доведена роль МХ як депо іонів кальцію в клітинах. Наводяться переконливі докази ключового їх значення в термінації кальцієвого сигналу, зокрема клітин гладеньких м'язів [14–17].

Надмірне підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі, яке є однією з причин і супроводжує мітохондріальну дисфункцію, викликає незворотну та тривалу деполяризацію внутрішньої мембрани МХ, що призводить до апоптотичної загибелі клітини [14, 15, 17].

Наразі достатньо з біохімічної та біофізичної точок зору охарактеризована система енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ (кальцієвий уніпортер їхньої внутрішньої мембрани), рушійною силою якого є наявність високого негативного потенціалу (близько – 180 мВ), що генерується в процесі функціонування електронно-транспортного ланцюга і транспорту протонів з матриксу у міжмембранний простір МХ [14–16, 18]. Хоча відомості про молекулярні структури, які забезпечують електрофоретичний, чутливий до рутенієвого червоного, транспорт іонів кальцію в МХ нині суперечливі [15, 19], не викликає сумнівів його суттєва роль у механізмах підтримки кальцієвого гомеостазу гладеньких м'язів, зокрема міометрія [18, 20].

Здатність оксиду азоту викликати розслаблення гладенького м'яза матки є встановленим експериментальним фактом, водночас біохімічні механізми цієї утерорелаксуючої дії мало досліджені [2, 4]. Недостатньо вивчені іонні, мембранні та молекулярні закономірності кальційзалежного розслаблення міометрія під впливом NO, парціальний внесок у цей процес субклітинних енергозалежних транспортних систем, зокрема локалізованих у МХ.

Спроможність оксиду азоту модулювати процес енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  МХ міометрія не з'ясована, проте в дослідях *in vivo* наводяться переконливі докази такої можливості для кардіоміоцитів, гладенького м'яза судин і тканини печінки [21–23].

Аналіз літературних даних і власних результатів [20, 24] дає підставу використати суспензію ізольованих МХ міометрія та флуоресцентний зонд Fluo-4 AM для вивчення дії оксиду азоту на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  органелами.

Метою нашої роботи було з'ясувати мож-

ливість впливу донора і попередника NO (нітропрусиду та нітриту натрію) на АТФ-залежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  ізольованими МХ міометрія матки шурів і дослідити його особливості.

## МЕТОДИКА

*Одержання фракції МХ міометрія.* Препарат ізольованих МХ одержували із міометрія невагітних шурів за допомогою методу диференційного центрифугування [20, 24]. Наркотизували тварин за допомогою інгаляції діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після виділення матки й очищення її від жирової та сполучної тканини препарат зберігали у 0,9%-му розчині NaCl. Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин при 4°C такого складу (ммоль/л): HEPES – 10 (рН 7,4), сахароза – 250, EGTA – 1. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатора типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин становила 1 : 9. Гомогенат і супернатант центрифугували при 4 °C протягом 15 хв при 1000 і 12000 г відповідно. Осад ресуспендували у робочому розчині і знову центрифугували протягом 15 хв при 12000 г при 4 °C. Впродовж експерименту одержану фракцію ізольованих МХ зберігали на льоду.

Визначали вміст білка у фракції МХ за стандартним методом Bradford [25].

*Процедура навантаження МХ флуоресцентним зондом Fluo-4 AM.* Навантаження МХ зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило (ммоль/л): HEPES – 10 (рН 7,4; 37 °C), сахароза – 250, бичачий сироватковий альбумін – 0,1% протягом 30 хв при 37 °C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [24].

*Дослідження вмісту іонізованого кальцію в МХ із використанням методу спек-*



трофлуориметрії. Відносні значення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці МХ міомерія, навантажених Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{зб}} = 495 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$ ) досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [24]. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  МХ, мало склад (ммоль/л) [20, 24]: НЕРЕС – 20 (рН 7,4; 37°C), сахароза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (рН 7,4; 37 °C),  $\text{MgCl}_2$  – 3, АТР – 3, сукцинат натрію – 5, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 80 мкмоль/л. Флуоресцентну відповідь наводили у відносних одиницях: значення базального рівня флуоресценції ( $F_0$ ), зумовленого наявністю в МХ ендогенного  $\text{Ca}^{2+}$ , віднімали від значення флуоресцентної відповіді, зумовленої акумуляцією  $\text{Ca}^{2+}$  МХ (F). Співвідношення  $(F - F_0)/F_0$  відповідає загальноприйнятим відносним одиницям флуоресценції, які зазначені на вісі ординат рисунків.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили із використанням пакету стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [26] і критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку досліджень нами показано, що використані в роботі ефектори, а саме нітропрусид натрію, нітрит натрію, циклоспорин та СССР (від англ. carbonil cyanide m-chlorphenil hydrasone) не впливають на флуоресценцію Fluo-4 AM; лише RuR (рутенієвий червоний) викликає її незначне зниження.

Встановлено, що транзитне додавання до МХ, транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в яких за наявності в середовищі  $\text{Mg-ATP}^{2-}$  та сукцинату досяг стану рівноваги, 100 мкмоль/л нітропрусиду або нітриту натрію не супроводжувалося суттєвими змінами рівня акумуляції катіона (рис. 1). Протягом кількох хвилин після внесення досліджуваних сполук спостерігалось лише незначне посилення транспорту іонів Ca у МХ. Одержаний результат вказує на неефективність впливу

оксида азоту на МХ за відносно короткотривалої експозиції. Вочевидь, хімічна модифікація функціонально-важливих тіольних груп кальційтранспортних структур або гемо-вмісних протеїнів МХ потребує певного часу.

Для перевірки цього припущення нами були проведені експерименти із передінкубацією суспензії МХ з нітропрусидом або нітритом натрію. В усіх дослідах концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі його акумуляції МХ становила 80 мкмоль/л. Це пов'язано із тим, що уявна константа активації процесу накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  становить  $53,9 \pm 6,9$  мкмоль/л [24]. Таке відповідає фізіологічній концентрації катіона в клітині поблизу МХ. Водночас використання надто високих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  здатне викликати порушення функціональної активності МХ [14].

Встановлено, що попередня інкубація МХ із нітропрусидом і нітритом натрію протягом

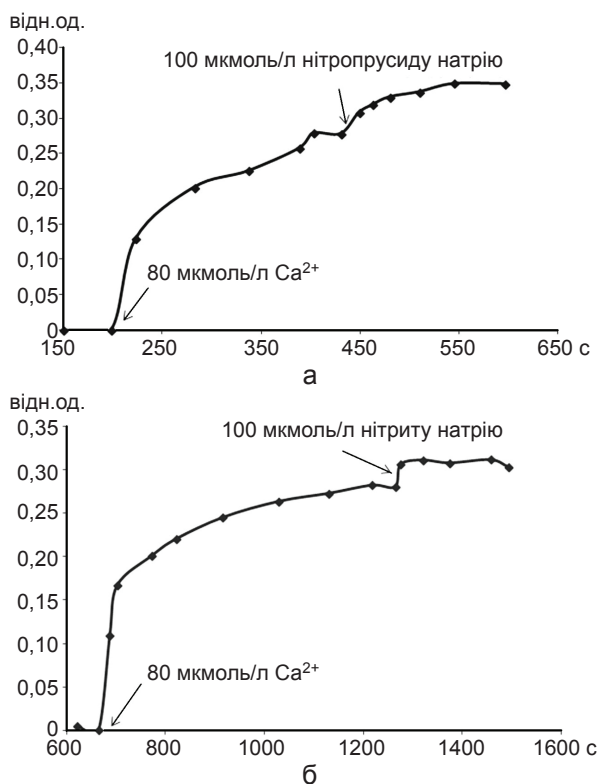


Рис. 1. Акумуляція іонів Ca мітохондріями (тут і далі вміст білка становив 50 мкг/мл) за наявності  $\text{Mg-ATP}^{2-}$  в умовах транзитного додавання нітропрусиду натрію (а) або нітриту натрію (б)



15 хв призводила до суттєвого зростання акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  органелами (рис. 2). Зокрема, нітропрусид натрію посилював транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  приблизно в 1,6 раза. Ефект нітриту натрію виявився дещо меншим, але статистично значущим. Подібні дані були одержані іншими авторами при дослідженні короткотривалого впливу нітрогліцерину *in vivo* в аорті, міокарді та печінці щурів. Одночасно зареєстровано зниження мембранного потенціалу органел на 28-30 % [21]. В наших попередніх дослідженнях *in vitro* на ізольованих МХ міомерія щурів демонструвалося помірне зменшення поляризації їхньої внутрішньої мембрани на 24–27 % під впливом нітропрусиду натрію (за результатами конфокальної мікроскопії та протокової цитофлуориметрії), водночас ефект нітриту натрію майже не спостерігався [27]. Ми припускаємо, що зростання ємності МХ щодо  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом оксиду азоту як *in vivo*, так і *in vitro* в різних тканинах може бути пов'язане із активацією кальцієвого уніпортеру і не залежить від змін мембранного потенціалу у фізіологічних межах.

У попередніх дослідженнях із використанням флуоресцентних зондів Fluo-3 АМ, Fluo-4 АМ та радіоізотопної техніки ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) був ідентифікований кальцієвий уніпортер МХ міомерія і вивчено його окремі властивості [18, 20, 24]. За такими характеристиками, як чутливість до інгібіторної дії RuR та азиду натрію, катіонною і субстратною спе-

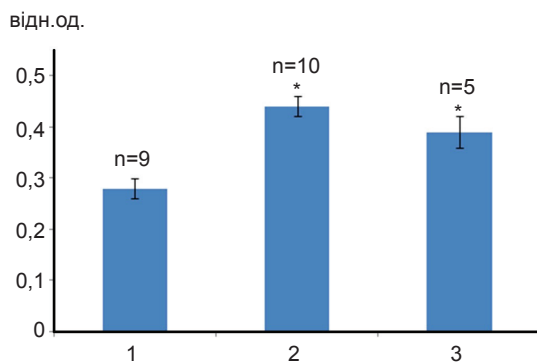


Рис. 2. Вплив донора та попередника NO на енергозалежний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольовані мітохондрії міомерія: 1 – контроль, 2 – нітропрусид натрію, 3 – нітрит натрію \* зміни достовірні відносно контролю,  $P < 0,05$

цифічністю, кінетичними та каталітичними характеристиками, блокувальним ефектом катіонів двовалентних металів, активуючою дією поліамінів, АТФ-залежне накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  МХ міомерія подібне до того, яке притаманне тканинам інших типів.

Для підтвердження припущення про роль уніпортеру у стимуляції NO енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  МХ нами були використані протонатор CCCP та класичний інгібітор електрофоретичного шляху накопичення іонів Ca органелами RuR. Встановлено, що 10 мкмоль/л CCCP і RuR ефективно пригнічували акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  МХ за наявності нітропрусиду натрію (рис. 3). Інгібування транспортного процесу сягло значень нижчих від контрольні без додавання нітропрусиду натрію, оскільки RuR блокує кальцієвий уніпортер, а CCCP усуває рушійну силу транспорту катіона через дисипацію градієнта протонів на внутрішній мітохондріальній мембрані.

Специфічний інгібітор мітохондріальної пори (МП) перехідної провідності циклоспорин (5 мкмоль/л) майже не впливав на активоване нітропрусидом натрію енергозалежне накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  МХ (див. рис. 3), хоча і спостерігалася тенденція до зростання акумуляції катіона за цих умов. У паралельно проведених дослідженнях з'ясувалося, що за наявності циклоспорину акумуляція іонів Ca МХ дещо зростала. Це вказує на певне значення МП в процесі обміну катіона в ізольованих МХ, водночас роль пори не є визначальною, можливо, через наявність в середовищі акумуляції Mg-АТФ<sup>2-</sup> та сукцинату, які стабілізують роботу електронно-транспортного ланцюга протягом експерименту і забезпечують достатню енергізацію МХ.

Разом з тим в експериментах, проведених на аорті та міокарді щурів в умовах введення тваринам нітрогліцерину, показано, що підвищення кальцієвої ємності МХ зумовлене саме інгібуванням МП оксидом азоту [22, 23]. Тими самими авторами в дослідках на ізольованих МХ, на відміну від експериментів *in vivo*, показано зниження кальцієвої

ємності органел за дії нітрогліцерину, яке пояснюється активацією вивільнення катіона через уніпортер, спричинене деполяризацією МХ. Різниця між результатами, одержаними в наших дослідженнях і даними інших авторів, може полягати у тканинспецифічності впливу та різниці хімічної структури використаних донорів NO. Слід зазначити, що біохімічні механізми дії NO на міометрій можуть суттєво відрізнятися від тих, які притаманні іншим м'язовим тканинам [2, 4].

Отже, нами показано, що під впливом донора і попередника NO (нітропрусиду та нітриту натрію) спостерігається посилення енергозалежної

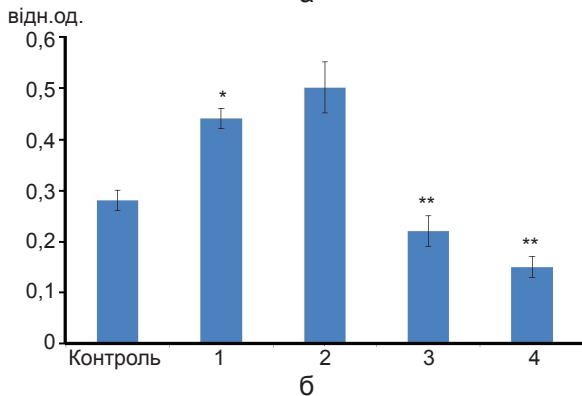
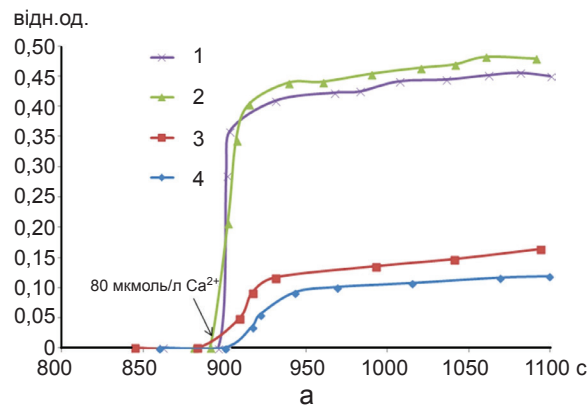


Рис. 3. Вплив модифікаторів трансмембранного обміну  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міометрії на енергозалежний транспорт катіона в умовах активуючого впливу нітропрусиду натрію: (а) – результати типового експерименту, (б) – статистичний аналіз одержаних результатів. 1 – 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію, 2, 3 і 4 – 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію і 5 мкмоль/л циклоспорину, 10 мкмоль/л RuR, 10 мкмоль/л СССР. \* зміни достовірні відносно контролю ( $n=9-10$ ,  $P \leq 0,05$ ), \*\* відносно дії 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію ( $n=5-10$ ,  $P \leq 0,05$ )

аккумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих МХ міометрії, не пов'язане зі зміною їхнього мембранного потенціалу. Стимулювальний ефект може більшою мірою опосередковуватися активацією кальцієвого уніпортеру, ніж залежати від функціонування пори перехідної провідності.

**Ю.В. Данилович, О.В. Коломиєц,  
Г.В. Данилович, С.А. Костерин**

### ОКСИД АЗОТА КАК ОДИН ИЗ РЕГУЛЯТОРОВ ЭНЕРГОЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА $\text{Ca}^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИИ

Исследовано влияние донора и предшественника NO, а именно 100 мкмоль/л нитропруссид натрия и нитрита натрия на энергозависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в изолированные митохондрии миометрия крыс. Изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе митохондрий оценивали с помощью метода спектрофлуориметрии и кальцийчувствительного зонда Fluo-4 AM.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-зависимая аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями в присутствии сукцината существенно стимулируется оксидом азота, в частности, нитропруссид натрия усиливал транспорт в 1,6 раза относительно его контрольных значений. Эффект NO становился значимым лишь при условии инкубации митохондрий с исследуемыми соединениями. Поскольку аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии нитропруссид натрия эффективно подавлялась протонофором СССР и рутениевом красным (10 мкмоль/л), сделан вывод о стимуляции кальциевого уніпортера внутренней митохондриальной мембраны оксидом азота. Аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями в присутствии нитропруссид натрия оказалось не чувствительной к действию специфического ингибитора поры переходной проводимости циклоспорина (5 мкмоль/л). Это указывает на то, что роль поры переходной проводимости менее существенна, чем кальциевого уніпортера, в процессах транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями в условиях действия на них оксида азота. Итак, оксид азота стимулирует энергозависимую аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями миометрия, опосредованную функционированием кальциевого уніпортера их внутренней мембраны. Ключевые слова: митохондрии, оксид азота, кальций, кальциевый уніпортер, миометрий.

**Danylovych Yu.V., Kolomiets O.V.,  
Danylovych G.V., Kosterin S.O.**

### NITRIC OXIDE AS A POSSIBLE REGULATOR OF ENERGO-DEPENDENT $\text{CA}^{2+}$ TRANSPORT IN MITOCHONDRIA OF UTERINE SMOOTH MUSCLE

The influence of the donor and the precursor of NO, namely 100 mM sodium nitroprusside and sodium nitrite on the energo-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in isolated mitochondria from rat

myometrium was investigated. Changes in the mitochondrial matrix  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration was evaluated by spectrofluorimetry using  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive probe Fluo-4 AM.  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation on mitochondria in the presence of succinate significantly stimulated by nitric oxide, in particular, 100  $\mu\text{M}$  sodium nitroprusside amplified the transport by 1.6 times relative to its control values. NO effect becomes significant only when the incubation of mitochondria with the compounds was performed.  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation in the presence of sodium nitroprusside effectively suppressed by protonophore (CCCP) and ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ). It was concluded that inner mitochondrial membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter stimulated by nitrogen oxide.  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation in mitochondria in the presence of sodium nitroprusside was not sensitive to the action of a specific permeability transition pore inhibitor cyclosporine (5  $\mu\text{M}$ ). This data indicates that the role of permeability transition pore is less significant than  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter in the processes of  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in mitochondria under the nitric oxide action. Thus, nitric oxide stimulates the ergo-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation by myometrium mitochondria mediated their inner membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter functioning.

Keywords: mitochondria, nitric oxide, calcium, calcium uniporter, myometrium.

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

## REFERENCES

- Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009 Jan 1;14:1-18.
- Bernal AL. The regulation of uterine relaxation. *Semin Cell Dev Biol* 2007 Jun;18(3):340-7.
- Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical application. *Cardiology* 2012;122(1):55-68.
- Sladek MS, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272(2):441-63.
- Pucovsky DV, Gordienko TB, Bolton V. Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on  $\text{Ca}^{2+}$  release sites and global intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J Physiol* 2002;539(1):25-39.
- Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourdeuil D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid Redox Signal* 2010 Mar 1;12(5):657-74.
- Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 2006 Jul 15;71(2):310-21.
- Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 1;71(1):10-21.
- Guilivi C, Kato K, Cooper CE. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Dec;291(6):C1225-31.
- Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide* 2010 Feb 15;22(2):64-74.
- Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol* 2013;1(1):40-44.
- Tota B, Quintieri AM, Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr Med Chem* 2010;17(18):1915-25.
- Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005 Apr;26(4):190-5.
- Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010. (In Ukrainian)
- Pan S, Ryu S-Y, Sheu S-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanisms. *Sci China Life Sci* 2011 Aug;54(8):763-9.
- Santo-Domingo J, Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12.
- Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004 Feb;53 Suppl 1:S96-102.
- Kosterin SA, Burdyga ThV, Fomin VP, Grover AK. Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in myometrium. From: Control of Uterine Contractility. Eds. Garfield RE, Tabb TN. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 1994.
- Crosdas G, Varnai P, Golenar T. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Apr 28;353(1-2):109-13.
- Kandaurova NV.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced changes of membrane potential of myometrium mitochondria: Dissertation for a scientific degree of the PhD of biological sciences. Kyiv: O. V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; 2011.
- Akopova OV, Sahach VF. The influence of nitric oxide donors on  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in rat heart and liver mitochondria. *Ukr Biokhim Zh* 2005 Mar-Apr;77(2):82-7. (In Russian)
- Akopova OV, Kotsiuruba AV, Kharlamova OM, Sahach VF. The role of mitochondria in NO-dependent regulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the rat aorta. *Fiziol Zh* 2010;56(4):76-85. (In Ukrainian)
- Akopova OV, Korkach IuP, Kotsiuruba AV, Kolchyn'ska AV, Sahach VF. Reactive nitrogen and oxygen species metabolism in rat heart mitochondria upon administration of NO donor in vivo. *Fiziol Zh*. 2012;58(2):3-15. (In Ukrainian)
- Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biokhim Zh* 2013 Jul-Aug;85(4):30-9. (In Ukrainian)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-54.
- Bailay NTJ. Statistical methods in biology. *Great Britain*: Cambridge University Press; 1995.
- Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kolomiets OV, Kosterin SO, Karakhim SO, Chunikhin OJu. Investigation of nitrosative compounds influence on polarization of the mitochondrial inner membrane in the rat uterus myocytes using potential sensitive fluorescent probe DiOC<sub>6</sub>(3). *Ukr Biokhim Zh* 2014 Jul-Aug;86(1):42-55. (In Ukrainian).

*Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ  
E-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 05.11.2013*

В.Ю. Гарбузова, О.В. Полоніков, Д.О. Строй, О.І. Матлай, Ю.О. Атаман,  
В.А. Сухарева, О.В. Атаман

## Аналіз впливу поліморфізму $C^{677}T$ гена $N^5, N^{10}$ -метилентетрагідрофолатредуктази на розвиток ішемічного інсульту у людей з різними факторами його ризику

*Наведено результати визначення поліморфізму  $C^{677}T$  (rs1801133) гена MTHFR у 170 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) і 124 здорових людей (контрольна група). Встановлено, що у хворих з ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (CC), гетерозигот (CT) і гомозигот за мінорним алелем (TT) становить 52,4, 35,9 і 11,8 % (у контролі – 46,0, 48,4, 5,6 %,  $P=0,044$  за  $\chi^2$ -критерієм). Гомозиготи TT мають більшу ймовірність розвитку ІАТІ, ніж носії основного C-алеля (CT+CC) (OR=2,3, CI=0,911-5,449,  $P=0,049$ ). У представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфізмом  $C^{677}T$  гена MTHFR і ризиком ІАТІ. Цей зв'язок проявляється у пацієнтів чоловічої статі, в осіб з нормальним артеріальним тиском і в людей, що не мають звички куріння. Стать пацієнтів, індекс маси тіла, значення артеріального тиску і куріння впливають на рівень асоціації вивченого поліморфізму з інсультом.*

*Ключові слова: метилентетрагідрофолатредуктаза, поліморфізм генів, ішемічний інсульт.*

### ВСТУП

Серед сучасних концепцій патогенезу серцево-судинних хвороб одне з чільних місць посідає гомоцистеїнова теорія атеросклерозу, відповідно до якої появі типових інфільтративно-проліферативних змін в інтимі артерій і розвиткові ускладнень атеросклеротичних бляшок передуює ураження ендотелію судин, зумовлене підвищенням вмістом амінокислоти гомоцистеїну у плазмі крові [1–3]. Ендотеліальна дисфункція, що є наслідком гіпергомоцистеїнемії, започатковує цілу низку подій, що призводить до гострих порушень коронарного і мозкового кровообігу, крайніми проявами яких є інфаркт міокарда та ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) [4, 5].

Одна з основних причин сталого підвищення вмісту гомоцистеїну в крові – пору-

шення реакцій його реметилювання з утворенням вкрай важливої для організму амінокислоти метіоніну. Зазначений біохімічний процес відбувається за умови достатньої кількості у тканинах донатора метильних груп, яким є біологічно активна форма фолієвої кислоти –  $N^5$ -метилтетрагідрофолат (метил- $FH_4$ ). Останній утворюється з  $N^5, N^{10}$ -метилентетрагідрофолату (метилентетрагідрофолат) за участю ферменту  $N^5, N^{10}$ -метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) [6, 7], зменшення активності якої може бути причиною дефіциту метил- $FH_4$ , а отже, і недостатнього реметилювання гомоцистеїну з розвитком гіпергомоцистеїнемії [1, 8].

Починаючи з 90-х років минулого століття, описано велику кількість мутацій гена MTHFR і однонуклеотидних його поліморфізмів (SNP), які впливають на активність відповідного ферменту і можуть зумовлювати підвищення вмісту гомоцистеїну в крові.

© В.Ю. Гарбузова, О.В. Полоніков, Д.О. Строй, О.І. Матлай, Ю.О. Атаман, В.А. Сухарева, О.В. Атаман



Одним з таких є SNP C<sup>677</sup>T (rs1801133), локалізований у 4-му екзоні гена, і який виявляє себе заміною 222-ї амінокислоти аланіну на валін у молекулі білка [9, 10].

Проведені в багатьох країнах світу дослідження зв'язку поліморфізмів гена MTHFR з розвитком патологічних процесів і хвороб людини виявили асоціацію C677T варіанта SNP з різними формами гострого коронарного синдрому [8, 11–13] і порушеннями мозкового кровообігу [14–16]. Проте даних про вплив зазначеного SNP на розвиток поширених серцево-судинних недуг стосовно української популяції досі немає. У зв'язку з цим мета нашої роботи – встановити частоту генотипів за поліморфізмом C<sup>677</sup>T гена MTHFR у хворих на ІАТІ, беручи до уваги низку факторів ризику, що мають стосунок до розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено із використанням венозної крові 170 хворих на ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік – 64,7 ± 0,73 роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу, клінічної картини хвороби, МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [17], на підставі анамнезу і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, електрокардіограми (ЕКГ).

Контрольна група складалася зі 124 пацієнтів, у яких відсутність порушень мозкового і коронарного кровообігу підтверджували збиранням анамнестичних даних, зняттям ЕКГ, проведенням загальноприйнятих неврологічних досліджень. Контрольна група і група хворих на ІАТІ (дослідна) не відріз-

нялися за співвідношенням осіб різної статі (P=0,294 за  $\chi^2$ -критерієм), проте середній вік першої (76,7±0,93 роки) був істотно вищим, ніж другої (P < 0,001).

Обстежених обох груп залежно від наявності факторів ризику було поділено на підгрупи за статтю, за індексом маси тіла (ІМТ) (< 25 і ≥25 кг/м<sup>2</sup>), за рівнем артеріального тиску (АТ) (нормальний і підвищений: систолічний АТ > 140 мм рт. ст., діастолічний АТ > 90 мм рт. ст.), (г) за наявністю звички куріння.

Поліморфізм C<sup>677</sup>T (rs1801133) гена MTHFR визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх за допомогою електрофорезу в 2,5%-му агарозному гелі.

Методику забору венозної крові, її зберігання, виділення ДНК, ампліфікації ділянок гена та електрофорезу рестрикційних фрагментів докладно описано в одній з попередніх наших праць [18].

Для ампліфікування ділянки 4-го екзону гена MTHFR, у якій міститься C<sup>677</sup>T-поліморфізм, використовували пару специфічних праймерів: прямий – 5' GTCATCCC TATTGGCAGGTTAC3' і зворотний – 5' CTGAGAGGAGATCTGGGAAGAA3'. Праймери було синтезовано фірмою “Metabion” (Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратної ПЛР буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента гена складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 20 год з 3 ОД рестриктази HinfI («Thermo Scientific», США) у буфері R такого складу: 10 ммоль/л Cl (рН 8,5), 10

ммоль/л  $MgCl_2$ , 100 ммоль/л  $KCl$ , 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 9783 позиції гена  $MTHFR$  цитозину перешкоджає рестрикції, а при його заміні на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 334 пари азотистих основ) на два фрагменти – 241 і 93 пари основ (рисунок). Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200 В) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей у розподілі генотипів визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Відношення шансів розраховували методом логістичної регресії, застосовуючи уніваріантну (OR) і мультіваріантну ( $OR_a$ ) моделі. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

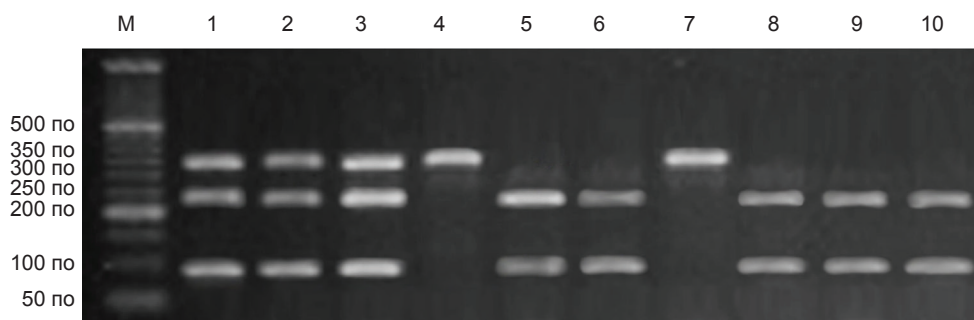
Генотипування хворих на ІАТІ та пацієнтів контрольної групи за поліморфізмом  $C^{677}T$  гена  $MTHFR$  дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються певні його варіанти, а також порівняти їх між групами загалом і відповідними підгрупами, утвореними за наявністю і відсутністю відомих факторів ризику інсульту.

У таблиці наведено частоту трьох алельних варіантів вивченого SNP у групах па-

цієнтів, що були об'єктом порівняння. Так, встановлено, що розподіл пацієнтів за генотипами  $C^{677}T$  істотно відрізняється у хворих на інсульт і в контролі. У перших відсоток гомозигот за мінорним алелем (ТТ) виявився істотно вищим, натомість гетерозигот (СТ) – нижчим, ніж в осіб контрольної групи ( $P = 0,044$ ). Ризик розвитку інсульту був у 2,2 раза вищий у гомозиготного варіанта ТТ, якщо порівнювати з носіями основного алеля (СТ+СС). Проте статистична значимість цього показника зникла, якщо до аналізу долучали сукупність інших факторів ризику інсульту: стать, ІМТ, артеріальну гіпертензію і куріння.

Поділ пацієнтів за статтю показав, що відмінності в розподілі частот алельних варіантів  $C^{677}T$ -поліморфізму між хворими на ІАТІ і пацієнтами контрольної групи характерні тільки для представників чоловічої статі ( $P=0,011$ ). Що стосується ризику розвитку інсульту, то як у жінок, так і чоловіків відносно високі значення OR не були підтверджені відповідним показником статистичної значимості, так само як і в підгрупах, утворених за значенням ІМТ.

Аналіз частоти генотипів за вивченим SNP у пацієнтів з нормальним і підвищеним артеріальним тиском виявив істотні відмінності між хворими на ІАТІ та пацієнтами контрольної групи тільки серед осіб, що не мали артеріальної гіпертензії ( $P=0,039$ ). За повної відсутності осіб з «патологічним» генотипом ТТ визначити показник OR у цій підгрупі не виявилось можливим.



Результати рестрикційного аналізу  $C^{677}T$ -поліморфізму гена  $MTHFR$ . М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 4, 7 відповідають С/С-генотипу; доріжки 1, 2, 3 – С/Т-генотипу; 5, 6, 8, 9, 10 – Т/Т-генотипу



Частота генотипів за поліморфізмом C <sup>677</sup> T гена MTHFR у хворих на ішемічний інсульт залежно від наявності різних факторів його розвитку				
Схема досліджу	Генотип			P
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	
Загалом				
Контроль (n=124)	57 (46,0)	60 (48,4)	7 (5,6)	0,044
Інсульт (n=170)	89 (52,4)	61 (35,9)	20 (11,8)	
TT відносно CT+CC	OR = 2,229 (0,911–5,449), P <sub>OR</sub> = 0,049 OR <sub>a</sub> = 2,076 (0,838–5,146), P <sub>OR</sub> = 0,115			
Стать				
Жінки				
Контроль (n=45)	27 (60,0)	16 (35,6)	2 (4,4)	0,482
Інсульт (n=72)	37 (51,4)	28 (38,9)	7 (9,7)	
TT відносно CT+CC	OR = 2,315 (0,459–11,677), P <sub>OR</sub> = 0,309 OR <sub>a</sub> = 2,202 (0,402–12,046), P <sub>OR</sub> = 0,363			
Чоловіки				
Контроль (n=79)	30 (38,0)	44 (55,7)	5 (6,3)	0,011
Інсульт (n=98)	52 (53,1)	33 (33,7)	13 (13,3)	
TT відносно CT+CC	OR = 2,264 (0,771–6,648), P <sub>OR</sub> = 0,137 OR <sub>a</sub> = 2,179 (0,736–6,452), P <sub>OR</sub> = 0,160			
Індекс маси тіла (ІМТ)				
ІМТ < 25кг/м <sup>2</sup>				
Контроль (n=38)	17 (44,7)	19 (50,0)	2 (5,3)	0,276
Інсульт (n=41)	22 (53,7)	14 (34,1)	5 (12,2)	
TT відносно CT+CC	OR = 2,500 (0,455–13,735), P <sub>OR</sub> = 0,292 OR <sub>a</sub> = 2,322 (0,412–13,074), P <sub>OR</sub> = 0,339			
ІМТ ≥ 25кг/м <sup>2</sup>				
Контроль (n=85)	39 (45,9)	41 (48,2)	5 (5,9)	0,141
Інсульт (n=129)	67 (51,9)	47 (36,4)	15 (11,6)	
TT відносно CT+CC	OR = 2,105 (0,735–6,026), P <sub>OR</sub> = 0,165 OR <sub>a</sub> = 2,016 (0,694–5,860), P <sub>OR</sub> = 0,198			
Артеріальний тиск				
Нормальний				
Контроль (n=48)	25 (52,1)	23 (47,9)	0	0,039
Інсульт (n=42)	22 (52,4)	15 (35,7)	5 (11,9)	
Гіпертензія				
Контроль (n=73)	30 (41,1)	36 (49,3)	7 (9,6)	0,178
Інсульт (n=128)	67 (52,3)	46 (35,9)	15 (11,7)	
TT відносно CT+CC	OR = 1,252 (0,485–3,227), P <sub>OR</sub> = 0,642 OR <sub>a</sub> = 1,360 (0,519–3,562), P <sub>OR</sub> = 0,531			
Куріння				
Некурці				
Контроль (n=93)	44 (47,3)	45 (48,4)	4 (4,3)	0,029
Інсульт (n=120)	62 (51,7)	42 (35,0)	16 (13,3)	
TT відносно CT+CC	OR = 3,423 (1,104–10,614), P <sub>OR</sub> = 0,033 OR <sub>a</sub> = 2,996 (0,949–9,452), P <sub>OR</sub> = 0,061			
Курці				
Контроль (n=31)	13 (41,9)	15 (48,4)	3 (9,7)	0,572
Інсульт (n=50)	27 (54,0)	19 (38,0)	4 (8,0)	
TT відносно CT+CC	OR = 0,812 (0,169–3,897), P <sub>OR</sub> = 0,794 OR <sub>a</sub> = 0,868 (0,175–4,299), P <sub>OR</sub> = 0,863			

Примітка. n – кількість пацієнтів, P – вірогідність відмінностей між хворими на інсульт і контрольною групою за  $\chi^2$ -критерієм; OR – відношення шансів; OR<sub>a</sub> – відношення шансів з урахування інших факторів ризику (статі, ІМТ, артеріального тиску, куріння), у дужках – 95%-й довірчий інтервал, P<sub>OR</sub> – статистична значимість для OR

І нарешті, порівняння частоти генотипів C<sup>677</sup>T з урахуванням звички куріння показало, що тільки серед некурців гомозиготний варіант TT буває значно частіше у хворих, ніж у пацієнтів контрольної групи (13,3 щодо 4,3 %). Генотип TT у некурців збільшує ризик інсульту в 3,4 раза, якщо порівнювати з носіями основного алеля. Проте OR втрачає свою статистичну значимість, якщо до аналізу одночасно долучаються інші фактори ризику інсульту (стать, ІМТ, артеріальна гіпертензія).

Одержані результати свідчать про те, що існують істотні відмінності в розподілі генотипів за поліморфізмом C<sup>677</sup>T гена MTHFR між хворими на ІАТІ і пацієнтами контрольної групи. Ці відмінності зокрема є характерними для осіб чоловічої статі, а також пацієнтів з нормальним АТ і тих, що не мають звички куріння.

За майже 15 років у різних країнах світу одержано дані щодо впливу поліморфізмів гена MTHFR на розвиток гострих порушень мозкового кровообігу, узагальнення яких можна знайти в оглядових статтях і проведених мета-аналізах [19–24]. Основний висновок, який випливає з цих досліджень, полягає в тому, що в багатьох країнах світу виявлено зв'язок поліморфізму C<sup>677</sup>T гена MTHFR, зокрема частоти T-алеля і генотипу TT, з ризиком ішемічного інсульту різного генезу. Так, у носіїв T-алеля ризик ішемічного інсульту є високим у таких країнах, як Японія [25], Сінгапур [26], Ірак [27], Туніс [28], Іспанія [29]. Асоціація T-алеля з інсультом виявляє себе як у людей похилого віку (Японія) [30], так і в дітей (Польща) [31]. У Сінгапурі T-варіант поліморфізму гена MTHFR є фактором ризику інсульту переважно в представників жіночої статі [32].

Водночас у цілій низці праць не було доведено прямого впливу C<sup>677</sup>T-поліморфізму на розвиток ішемічних уражень головного мозку. Такі дані, зокрема, одержано в Індії [33], Туреччині [34], Марокко [35].

Зв'язок «патологічного» алеля T з ішемічним інсультом пов'язують з тим, що за-

міна цитозину на тимін у 677-й позиції гена MTHFR призводить до заміни аланіну на валін у позиції 222 поліпептидного ланцюга ферменту. Це у свою чергу стає причиною збільшення термолабільності MTHFR і зменшення внаслідок цього її ферментативної активності. Як результат, перетворення метилен-FH<sub>4</sub> у метил-FH<sub>4</sub> уповільнюється, що спричинює зменшення інтенсивності процесів реметилування гомоцистеїну і, відповідно, накопичення останнього в організмі.

Саме такий механізм впливу генетичного поліморфізму MTHFR на кровоносні судини впливає з даних багатьох праць, у яких показано асоціацію T-алеля і TT-генотипу за поліморфізмом C<sup>677</sup>T з розвитком гіпергомоцистеїнемії [26–30]. Збільшення вмісту гомоцистеїну в плазмі крові стає причиною токсичного ушкодження ендотелію судин, що в свою чергу започатковує процеси атерогенезу, а згодом і тромбоутворення на поверхні фіброзних і атероматозних бляшок. Як наслідок, розвивається інфаркт мозку.

Результати виконаних нами досліджень показують, що у представників української популяції, як і в багатьох інших, існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфізмом C<sup>677</sup>T і розвитком ІАТІ. Цей зв'язок виявляє себе, зокрема, у пацієнтів чоловічої статі, в осіб з нормальним АТ і в людей, що не мають звички куріння. Гомозиготи за мінорним T-алелем мають більшу ймовірність розвитку ІАТІ, ніж носії основного C-алеля. Остаточне доведення останнього положення щодо української популяції вимагає збільшення кількості спостережень до рівня, який би дав можливість одержати статистично значимі результати, і долучення до аналізу таких відомих факторів ризику, як цукровий діабет, порушення ліпопротеїнового складу крові і системи гемостазу.

*Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Визначення ролі поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку склеротичних уражень кровоносних судин», № 91.01.01.11-12.*

**В.Ю. Гарбузова, А.В.Полоников, Д.А.Строй,  
О.И. Матлай, Ю.А. Атаман, В.А. Сухарева,  
А.В. Атаман**

**АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА  
C<sup>677</sup>T ГЕНА N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-МЕТИЛЕНТЕТРАГИ-  
ДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ НА РАЗВИТИЕ  
ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ЛЮДЕЙ  
С РАЗНЫМИ ФАКТОРАМИ ЕГО РИСКА**

Представлены результаты определения полиморфизма C<sup>677</sup>T (rs1801133) гена MTHFR у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 здоровых людей (контрольная группа). Установлено, что у больных соотношение гомозигот по основному аллелю (CC), гетерозигот (CT) и гомозигот по минорному аллелю (TT) составляет 52,4, 35,9 и 11,8% (в контроле – 46,0, 48,4, 5,6 %, P=0,044 по  $\chi^2$ -критерию). Для гомозигот TT характерна более высокая вероятность развития ИАТИ, чем для носителей основного C-аллеля (CT+CC) (OR=2,3, CI=0,911-5,449, P=0,049). У представителей украинской популяции существует связь между частотой генотипов по полиморфизму C<sup>677</sup>T гена MTHFR и риском ИАТИ. Эта связь проявляется у пациентов мужского пола, лиц с нормальным артериальным давлением и у людей, не имеющих привычки курения. Пол пациентов, индекс массы тела, значение артериального давления и курение влияют на уровень ассоциации изученного полиморфизма с инсультом.

Ключевые слова: метилентетрагидрофолатредуктаза, полиморфизм генов, ишемический инсульт

**V.Yu. Garbuzova, A.V. Polonikov, D.A. Stroy,  
O.I. Matlaj, Y.A. Ataman, V.A. Sukhareva,  
A.V. Ataman**

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-  
METHYLENETETRAHYDROFOLATE  
REDUCTASE GENE C<sup>677</sup>T POLYMORPHISM  
ON THE ISCHEMIC STROKE  
DEVELOPMENT IN PERSONS WITH  
VARIOUS RISK FACTORS**

The results of MTHFR gene C<sup>677</sup>T (rs1801133) polymorphism determined in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke (IATS) and 124 healthy subjects (control group) are presented in the paper. It has been shown that in patients with IATS, the frequencies of main homozygotes (CC), heterozygotes (CT) and minor homozygotes (TT) are 52.4, 35.9, 11.8% (in control – 46.0, 48.4, 5.6%, P=0.044 by  $\chi^2$ -test). TT homozygotes have a greater chance of developing IATS than carriers of main C-allele (CT + CC) (OR = 2.3, CI = 0.911-5.449, P = 0.049). In the representatives of the Ukrainian population there is a relationship between the frequency of MTHFR gene C<sup>677</sup>T polymorphism genotypes and the risk of IATS. This connection is manifested in male patients, in

persons with normal blood pressure, and in people who do not have the habit of smoking. The sex of the patients, body mass index, blood pressure and smoking affect the level of the studied polymorphism association with stroke.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase, genes polymorphism, ischemic stroke.

*Sumy University, Sumy, Ukraine;*

*Kursk Medical University, Russia;*

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine*

**REFERENCES**

1. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2005;**43**(10):980–6.
2. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Herberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? *Pathol Biol (Paris).* 2003;**51**(2):101-10.
3. Tayal D, Goswami B, Koner BC, Mallika V. Role of Homocysteine and Lipoprotein (A) in atherosclerosis: An Update *Biomed Res.* 2011;**22**(4):391-05.
4. Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T, Caldwell RW. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J Physiol Pharmacol.* 2007;**58**(2):191-06.
5. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;**39**(3):219-32.
6. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 2000;**13**(1):20-33.
7. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P., Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998;**9**(8):652-6.
8. Varga EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Homocysteine and MTHFR mutations: relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation.* 2005;**111**:e289-e93.
9. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/>.*
10. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics.* 2001;**1**(3):189-01.
11. Chu N-F. Plasma hyperhomocysteinemia, MTHFR polymorphism and thromboembolic disease: an example of gene-nutrition interactions in chronic disease. *J Chin Med Assoc.* 2005;**68**(12):557-9.
12. Brustolin S, Giugliani R, Felix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010;**43**(1):1-7.
13. Trifonova EA, Spiridonova MG, Gabidulina TV, Urnov FD, Puzyrev VP, Stepanov VA. Analysis of the MTHFR

- gene linkage disequilibrium structure and association of polymorphic gene variants with coronary atherosclerosis. *Rus J Gen.* 2012;**48**(10):1035-47.
14. Kumar A, Sagar R, Kumar P, Sahu JK, Grover A, Srivastava AK, et al. Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design. *BMC Neurology.* 2013;**13**:136-43.
  15. Alluri RV, Mohan V, Komandur S, Chawda K, Chaudhuri R, Hasan Q. MTHFR C677T gene mutation as a risk factor for arterial stroke: a hospital based study. *Eur J Neurol.* 2005;**12**(1):40-4.
  16. Sanchez-Marin B, Grasa JM. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in ischemic vascular disease. *Rev Neurol.* 2006;**43**(10):630-6.
  17. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;**24**:35-41.
  18. Garbuzova VYu, Gurianova VL, Parkhomenko AN, Dosenko VE, Ataman AV. The frequency of allelic polymorphism of matrix Gla-protein gene in acute coronary syndrome patients. *Fiziol Zh.* 2011;**57**:16-24. Ukraine.
  19. Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveira S, Plomaritoglou A, et al. Homocysteine, MTHFR 677C>T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology.* 2002;**59**(4):529-36.
  20. Cronin S., Furie K.L., Kelly P.J. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke: evidence from a cumulative meta-analysis. *Stroke.* 2005;**36**(7):1581-7.
  21. Nakamizo T, Nagayama M. Stroke and the genetics of hyperhomocysteinemia. *Brain Nerve.* 2008;**60**(11):1295-306.
  22. Yu HH, Zhang WL, Shi JP. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and susceptibility of ischemic stroke: a meta-analysis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011;**91**(29):2060-4.
  23. Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Pienckz-Reclawowicz K, Reclawowicz D, Emich-Widera E, Pilarska E. The TT genotype of methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism increases the susceptibility to pediatric ischemic stroke: meta-analysis of the 822 cases and 1,552 controls. *Mol Biol Rep.* 2012;**39**(8):7957-63.
  24. Li P, Qin C. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and susceptibility to ischemic stroke: A meta-analysis. *Gene.* 2013. Oct 16. pii: S0378-1119(13)01286-9. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.066. [Epub ahead of print].
  25. Kawamoto R, Kohara K, Oka Y, Tomita H, Tabara Y, Miki T. An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2005;**14**(2):67-4.
  26. Moe KT, Woon FP, De Silva DA, Wong P, Koh TH, Kingwell B, et al. Association of acute ischemic stroke with the MTHFR C677T polymorphism but not with NOS3 gene polymorphisms in a Singapore population. *Eur J Neurol.* 2008;**15**(12):1309-14.
  27. Al-Allawi NA, Avo AS., Jubrael JM. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in Iraqi patients with ischemic stroke. *Neurol. India.* 2009;**57**(5):631-5.
  28. Fekih-Mrissa N, Mrad M, Klai S, Mansour M, Nsiri B, Gritli N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (C677T and A1298C) polymorphisms, hyperhomocysteinemia, and ischemic stroke in Tunisian patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013;**22**(4):465-9.
  29. Sanchez-Marin B, Grasa JM. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in ischemic vascular disease. *Rev Neurol.* 2006;**43**(10):630-6.
  30. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, Sugiyama T, Hamada C, Kurihara Y, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vas. Biol.* 1998;**18**(9):1465-9.
  31. Zak I, Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Emich-Widera E, Marszal E, Wendorff J, et al. The T allele of the 677C>T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an increased risk of ischemic stroke in Polish children. *J Child Neurol.* 2009;**24**(10):1262-7.
  32. Baum L, Wong KS, Ng HK, Tomlinson B, Rainer TH, Chan DK, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A222V polymorphism and risk of ischemic stroke. *Clin Chem Lab Med.* 2004;**42**(12):1370-6.
  33. Kalita J, Srivastava R, Bansal V, Agarwal S, Misra UK. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Indian stroke patients. *Neurol India.* 2006;**54**(3):260-3.
  34. Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpinar G, Kara I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Res Bull.* 2006;**71**(1-3):45-50.
  35. They-They TP, Battas O, Nadifi S. Synergistic effect of MTHFR C677T and F2 G20210A polymorphisms on ischemic stroke. *Neurosci Bull.* 2013. Oct 16. [Epub ahead of print].

Сум. ун-т, Суми;  
Кур. мед. ун-т, Росія;  
Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: vikgarbuzova@yandex.ru

Матеріал надійшов до  
редакції 16.12.2013

І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

## Активність інтерферонзалежної 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах тимуса щурів при сумісній дії етанолу та препарату оцтовокислого цинку

*Вивчено вплив 28-добового комплексного введення етанолу та препарату оцтовокислого цинку на активність інтерфероніндукованого ферменту 2',5'-олігоаденілатсинтетази (2',5'-ОА-синтетази) у лімфоцитах тимуса щурів. На ранніх термінах дії етанолу (14-та доба) 2',5'-ОА-синтетазна активність знижувалася найбільше (відносно контролю), на пізніших термінах зміни були менш вираженими. Стимуляція активності ферменту у відповідь на дію індуктора інтерферону (циклоферону) in vitro найбільш виражена на пізніх термінах дії етанолу. Введення оцтовокислого цинку сумісно з етанолом збільшує 2',5'-ОА-синтетазну активність відносно групи тварин, що споживала лише етанол, на 81 % на 21-шу добу і на 30 % на 28-му добу (тенденція до нормалізації цього показника). Препарат посилював індуквану циклофероном стимуляцію активності ферменту, що було максимальним при тривалій дії етанолу (на 28-му добу). Імовірно, при дії етанолу пригнічується синтез інтерферону або порушується індукований ним каскад 2',5'-олігоаденілату; оцтовокислий цинк посилює синтез інтерферону.*

*Ключові слова:* алкогольна інтоксикація, інтерферон, 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, тимоцити, циклоферон.

### ВСТУП

Велику кількість робіт присвячено вивченню біохімічних механізмів дії алкоголю на організм, зокрема, особливу увагу приділено функціонуванню імунної системи [1]. Показано, що при хронічній дії етанолу в організмі пригнічується природжений імунітет: порушується дозрівання Т-клітин, зменшується активність натуральних кілерів, розвивається запальний процес і знижується стійкість організму до інфекційних захворювань [2, 3].

Припускають, що одним з механізмів, за яким етанол пригнічує природжений імунітет, є порушення клітинних сигнальних каскадів, залучених у його реалізації. Встановлено зміни продукції цитокінів лімфоцитами не тільки печінки, а й лімфоїдних органів [4], зокрема, співвідношення проти- і прозапальних цитокінів IL-6/IL-10 [5].

Значних змін зазнає секреція інтерферону (ІФН) лімфоцитами тварин і людини, які підлягали дії етанолу [4, 6]. Сигнальний каскад 2',5'-олігоаденілату (2',5'-ОА) індукується ІФН I типу й опосередковує його антивірусні, антипроліферативні та імунорегуляторні властивості [7]. 2',5'-олігоаденілатсинтетаза (2',5'-ОА-синтетаза) – ключовий фермент цього каскаду, який каталізує синтез 2',5'-олігоаденілатів з АТФ [8].

Показано, що при дії етанолу in vitro зазнає змін експресія гена ІФН-індукованого ферменту 2',5'-ОА-синтетази [6]. Найбільш докладно вивчено вплив етанолу на сигналізацію в ІФН-індукованих системах у печінці, відомості щодо ролі ІФН у реакції лімфоїдних органів на хронічне вживання алкоголю є суперечливими та потребують уточнення.

Одним з біохімічних наслідків алкоголізму та алкогольної хвороби печінки (АХП) є

© І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко



дефіцит цинку, причому особливо чутливою до нього є імунна система [9]. У попередніх дослідженнях встановлено зниження вмісту цинку в гепатоцитах, мозку та сироватці крові щурів у динаміці розвитку хронічної алкогольної інтоксикації [10]. Зниження вмісту цинку в організмі пригнічує продукцію цитокінів Th1-лімфоцитами, зокрема ІФН- $\alpha$ , викликає зміни антитілозалежної імунної відповіді, атрофію тимуса, лімфопенію, що знижує стійкість до інфекційних захворювань та алергічних реакцій [11].

Препарати цинку використовуються для усунення порушень на тлі алкоголізму, причому одним з найменш токсичним серед них є оцтовокислий цинк [12]. Актуально вивчити ефект цинку при тривалій дії етанолу на функціонування в лімфоцитах каскадів, що індукуються цитокінами.

Мета роботи – оцінити активність ІФН-індукованого ферменту 2',5'-ОА-синтетази у лімфоцитах селезінки і тимуса щурів при сумісному введенні етанолу та препарату оцтовокислого цинку упродовж 28 діб, а також вивчити вплив на цей показник індуктора ІФН (циклоферону) *in vitro*.

## МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до 2 міс, масою 180–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з принципами “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей” (Страстбург, 1986) і Ухвали першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Тварин було розділено на 3 групи по 10 тварин у кожній: 1-ша група – інтактні тварини (контроль); 2-га група – щури, яким вводили 40%-й етанол («Біофарма» Україна) упродовж 28 діб натщесерце зондом з медичної сталі з розрахунку 2 мл/100 г раз на добу за стандартною методикою Халілова

та Закірходжаєва [13]; 3-тя група – щури, яким вводили оцтовокислий цинк (“Sigma”, США) *per os*, починаючи з 14-ї доби розвитку введення етанолу (препарат розчиняли у воді та вводили окремо від етанолу у дозі 20 мг/1 кг, що було значно менше за середньолетальну дозу для білих щурів ( $LD_{50} = 278 \pm 49$  мг/кг) [14, 15]. Смертність серед дослідних тварин не спостерігалась. Проби тканин для аналізу відбирали на 14-ту, 21-ту та 28-му добу експерименту. Евтаназію тварин здійснювали дислокацією шийних хребців через добу після останнього введення препарату, видаляли тимус і отримували суспензію клітин, використовуючи середовище 199 (модифікований NEPEES, солі Ерла, L-глутамін і 25 ммоль/л NEPEES, без бікарбонату натрія, “Sigma”, США). Тимоцити виділяли за методом Морозова та Хавінсона [16], центрифугуючи суспензію клітин тимуса за швидкості 1500 г упродовж 10 хв. Кількість загиблих клітин визначали фарбуванням 0,2%-м трипановим синім у камері Горяєва, життєздатні клітини в усіх експериментах становили не менше 92 %.

Тимоцити інкубували *in vitro* з циклофероном у концентрації 100 мкг / мл на  $5 \cdot 10^6$  клітин / мл. Тимоцити інкубували в пробірках з циклофероном («Полісан» Росія) у середовищі 199 (“Sigma”, США) при 37°C упродовж 17 год. Циклоферон індукує в лімфоцитах синтез ІФН- $\alpha$  й ІФН- $\gamma$  та ефективно використовується для лікування вірусних захворювань [17]. Клітини руйнували методом швидкого заморожування–розморожування в рідкому азоті та центрифугували за швидкості 10 000 г упродовж 15 хв [18], отриманий супернатант очищали на колонці DEAE-cellulose з елюцією 0,15 моль/л KCl згідно з літературними даними [19, 20] з модифікаціями. 2',5'-ОА-синтетазну активність визначали спектрофотометричним методом за кількістю відновленого НАДФ, який був еквімолярним до неорганічного пірофосфату ( $PP_n$ ), що утворювався в реакції синтезу 2',5'-ОА під дією 2',5'-ОА-синте-



тази [20]. Використані реагенти були фірми «Sigma», США. Активність ферменту виражали в наномольах  $PP_n / (1 \text{ хв} \cdot 1 \text{ мг білка})$ . Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [21].

Статистичну обробку результатів досліджень і оцінку їх достовірності здійснювали за допомогою програми Statistica 7.0 з використанням критерію t Стьюдента. Відмінності вважали достовірними при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було вивчено сумісний вплив етанолу та оцтовокислого цинку на активність ключового ферменту ІФН-індукованої системи 2',5'-ОА - 2',5'-ОА-синтетази у клітинах лімфоїдних тимуса щурів без стимуляції, а також при дії *in vitro* індуктора ІФН-циклоферону.

Аналіз отриманих результатів показав, що 2',5'-ОА-синтетазна активність у тимоцитах щурів знижується при споживанні ними етанолу протягом 28 діб, причому зниження є максимальним (на 75 % відносно контролю) на ранніх етапах експерименту (14-та доба; рис. 1). На пізніх термінах (21-ша і 28-ма доба) цей показник зменшувався на 57 і 31 % відповідно. Індукована циклофероном *in vitro* активність ферменту в ізольованих лімфоцитах тимуса щурів контрольної групи

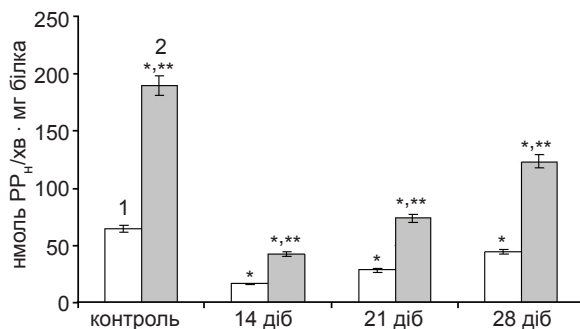


Рис. 1. 2',5'-Олігоаденілатсинтетазна активність у лімфоцитах тимуса щурів при введенні етанолу упродовж 28 діб при дії циклоферону *in vitro*: 1 – без індуктора, 2 – інкубація клітин з циклофероном. \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем; \*\* $P \leq 0,05$  відносно клітин, які не інкубувалися з циклофероном

підвищувалася на 192 % відносно нестимульованих клітин тварин відповідної групи, а на 14-ту, 21-шу і 28-му добу введення етанолу вона збільшувалася на 157, 162 і 175 % відносно нестимульованих клітин відповідно. Це свідчить про те, що при дії етанолу пригнічується стимуляція 2',5'-ОА-синтетази у відповідь на дію індукторів ІФН. При збільшенні терміну впливу етанолу індукована циклофероном активність підвищується, що корелює з результатами щодо активності у нестимульованих лімфоцитах.

Зниження 2',5'-ОА-синтетази активності у тимоцитах алкоголізованих тварин і пригнічення її стимуляції при дії циклоферону *in vitro* дає підстави припустити, що при дії етанолу пригнічується синтез ІФН лімфоцитами тимуса. Це узгоджується з даними про зниження продукції ІФН лейкоцитами крові людей у відповідь на дію *in vitro* таких індукторів, як фітогемаглютинін А та конканавалін А та різке пригнічення секреції ІФН- $\alpha$  і ІФН- $\gamma$  нестимульованими лейкоцитами при алкогольному стеатозі та цирозі печінки [22].

Факт пригнічення 2',5'-ОА-синтетази активності лімфоцитів алкоголізованих тварин у відповідь на стимуляцію клітин циклофероном узгоджується з даними про зниження ефективності терапії інтерфероном вірусних інфекцій, що виникають на тлі алкоголізму [23]. В осіб, хворих на хронічний алкоголізм, знижена фізіологічна відповідь на вплив екзогенно введеного ІФН. Це проявляється, зокрема, в тому, що індукована ним активність 2',5'-ОА-синтетази набагато нижча, ніж у здорових людей [24].

Виявлене нами підвищення ферментативної активності зі збільшенням терміну дії етанолу у нестимульованих та інкубованих з циклофероном тимоцитах, імовірно, є адаптаційною реакцією, при якій здатність цих клітин до продукції ІФН у відповідь на екзогенні стимули частково відновлюється.

Внаслідок впливу етанолу може змінюватися передача сигналу в індукованій ІФН

системі 2',5'-ОА. Доведено, що етанол викликає у клітинах оксидативний стрес [25]. Це порушує експресію білків системи Jak-Stat, яка опосередковує дію ІФН- $\alpha$  на клітини, що проявляється у зниженні його противірусної активності [23].

Слід зазначити, що ефект етанолу на систему ІФН не пов'язаний тільки зі стимуляцією чи інгібуванням, а є результатом взаємних впливів цілої низки процесів, які спостерігаються при взаємодії компонентів багатьох сигнальних шляхів [23]. Реакція на вживання алкоголю залежить від типу дії етанолу (гострої чи хронічної), його дози, а також від того, чи метаболізується він в організмі.

Показано, що оцтовокислий цинк підвищує 2',5'-ОА-синтезну активність у тимоцитах щурів на тлі дії алкоголю на 81 і 30 % на 21-шу і 28-му добу експерименту відповідно відносно тварин, які споживали лише етанол (рис. 2, а, б). На 28-му добу активність наближалася до контрольних значень. На ранніх термінах дослідження (упродовж 11 діб) цей показник статистично достовірно не змінювався. Введення тваринам контрольної групи оцтовокислого цинку упродовж 28 діб не впливало на активність ферменту у нестимульованих індуктором клітинах.

При інкубації тимоцитів алкоголізованих щурів з циклофероном *in vitro* 2',5'-ОА-синтезна активність підвищувалася відносно нестимульованих індуктором клітин на 176 і 180 % відповідно на 21-шу і 28-му добу сумісного введення тваринам етанолу й оцтовокислого цинку (див. рис. 2,а,б). Стимуляція активності ферменту у відповідь на циклоферон була більш інтенсивною порівняно з такою у тварин, що отримували лише етанол. Проте вона була менш вираженою щодо контрольних тварин, яким вводили оцтовокислий цинк (при інкубації лімфоцитів їхнього тимуса з циклофероном активність збільшувалася відносно нестимульованих клітин на 202 і 209 % відповідно, на 21-шу і 28-му добу введення препарату).

Ми припускаємо, що оцтовокислий цинк на тлі дії алкоголю стимулює синтез ІФН тимоцитами, проявом чого є збільшення 2',5'-ОА-синтезної активності. Цей препарат також посилює здатність тимоцитів до продукції ІФН у відповідь на індукцію, що є найбільш вираженим при тривалій дії етанолу. Стимулювальний ефект цинку на секрецію ІФН було описано у Sakman та співавт. [26]: фізіологічні концентрації цього металу відновлювали знижену продукцію цитокіну *in vitro*.

Ймовірно, цинк нормалізує функціонування лімфоцитів тимуса, яке порушується при дії етанолу. Показано, що згаданий катіон регулює гомеостаз Т-лімфоцитів, стимулює їх дозрівання, модулює секрецію цитокінів, змінюючи функціонування багатьох сигнальних систем [11]. Крім цього, цинк необхідний для прояву біологічної активності великої

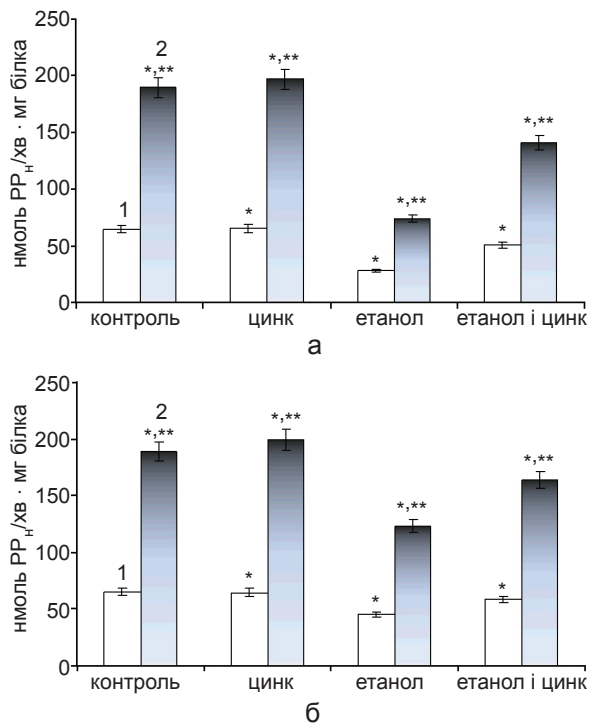


Рис. 2. 2',5'-Олігоаденілатсинтезна активність у лімфоцитах тимуса щурів на 21-шу та 28-му добу сумісного введення етанолу та оцтовокислого цинку при дії циклоферону *in vitro*: 1 – без індуктора, 2 – інкубація клітин з циклофероном. \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем; \*\* $P \leq 0,05$  відносно клітин, які не інкубувалися з циклофероном

кількості білків (цитокінів, факторів росту, транскрипційних факторів) [27]. Тому встановлена нами стимуляція  $Zn^{2+}$ -активності цього ферменту може бути результатом відновлення нормального функціонування ІФН-індукованої системи 2',5'-ОА в лімфоцитах. У попередніх дослідженнях було показано, що цей препарат нормалізує вміст мембранних фосфоліпідів, активність мембранозв'язаних ферментів і ферментів системи антиоксидантного захисту, які змінюються при дії етанолу [28].

Таким чином, сполуки цинку слід розглядати як потенційні препарати, що можна застосовувати для відновлення метаболічних процесів при алкоголізмі. Отримані результати важливі для з'ясування механізмів імунної відповіді на тлі тривалої дії етанолу.

**І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко,  
Д.Н. Гребиник, Л.І. Остапченко**

#### **АКТИВНОСТЬ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМОЙ 2',5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗЫ В ЛИМ- ФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ТИМУСА КРЫС ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И ПРЕПАРАТА УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА**

Изучено влияние 28-суточного комплексного введения этанола совместно с препаратом уксуснокислого цинка на активность интерферониндуцированного фермента 2',5'-олигоаденилатсинтетазы (2',5'-ОА-синтетазы) в лимфоцитах тимуса крыс. На ранних сроках действия этанола (14-е сутки) 2',5'-ОА-синтетазная активность наиболее снижалась (на 75 % относительно контроля), на поздних сроках изменения были наименее выраженными. Стимуляция активности фермента в ответ на действие индуктора интерферона (циклоферона) *in vitro* наиболее выражена на поздних сроках действия этанола. Введение уксуснокислого цинка совместно с этанолом увеличивает 2',5'-ОА-синтетазную активность относительно группы животных, которая употребляла только этанол, на 81 % на 21-е сутки и на 30 % на 28-е сутки (тенденция к нормализации этого показателя). Препарат усиливал индуцированную циклофероном стимуляцию активности фермента, что было максимальным при длительном действии этанола (на 28-е сутки). Вероятно, при действии этанола угнетается синтез интерферона или нарушается индуцированный им каскад 2',5'-олигоаденилата; уксуснокислый цинк усиливает синтез интерферона.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, интерферон, 2',5'-олигоаденилатсинтетаза, тимоциты, циклоферон.

**I.V. Kompanets, I.O. Stepanets, V.V. Voytenko,  
D.M. Grebinyk, L.I. Ostapchenko**

#### **THE ACTIVITY OF INTERFERON-DEPENDENT 2',5'-OLIGOADENYLATESYNTHE- TASE IN RAT THYMUS LYMPHOID CELLS UNDER THE ACTION OF ETHANOL AND ACETIC ZINC ADMINISTRATION**

The activity of interferon-induced 2',5'-oligoadenylatesynthetase (2',5'-OA-synthetase) in thymocytes of rats simultaneously treated with ethanol and acetic zinc preparation was studied. The 2',5'-OA-synthetase activity was decreased by 75% after daily ethanol administration for 14 days. The changes were less pronounced at the late terms of the experiment. *In vitro* stimulation of enzyme activity by inducer cycloferon was more pronounced at the late terms of ethanol action. Combined administration of ethanol and acetic zinc increased the 2',5'-OA-synthetase activity (by 81% at 21<sup>th</sup> day and by 30% at 28<sup>th</sup> day) in comparison to the group of animals that consumed ethanol only. The zinc preparation augmented the stimulation of enzyme activity induced by cycloferon, the effect was most prominent at the late terms of the ethanol action (at 28<sup>th</sup> day). Probably, ethanol depresses the synthesis of interferon or disturbs the functioning of 2',5'-oligoadenylate cascade. The acetic zinc amplifies the interferon synthesis. Key words: alcohol intoxication, interferon, 2',5'-oligoadenylatesynthetase, thymocytes, cycloferon.

*Taras Shevchenko National University, Kyiv*

#### **REFERENCES**

1. Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr.* 2010; 5:141-147.
2. Pan HN, Sun R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30(9):1615-123.
3. Albano E. Role of adaptive immunity in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol.* 2012; 2012:893026.
4. Pan HN, Sun R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(6):1109-1116.
5. Redwine L, Dang J, Hall M, Irwin M. Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity in alcoholics. *Psychosom Med.* 2003; 65(1):75-85.
6. Chelbi-Alix MK, Chousterman S. Ethanol induces 2',5'-oligoadenylate synthetase and antiviral activities through interferon-beta production. *J Biol Chem.* 1992; 267(3): 1741-1745.
7. Forster S. Interferon signatures in immune disorders and disease. *Immunol Cell Biol.* 2012; 90(5):520-527.
8. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011; 1(6):519-525.

9. Zhou Z. Zinc and alcoholic liver disease. *Dig Dis.* 2010; **28**(6):745-750.
10. Kharchenko OI, Bogun LI, Ostapchenko LI. Zinc level in cells of rat different organs at chronic alcohol intoxication and zinc treatment. *Pharmacology and medical toxicology.* 2012; **3**(28):57-60.
11. Rink L, Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J Nutr.* 2000; **130**(5S Suppl):1407S-14011S.
12. Skalniy AV, Kampov-Polevoy AB, Voronin AYe. The influence of zinc on the activity of ethanol-oxidizing enzymes in descendant of alcoholized rats. *Microelements in medicine.* 2000; **2**(2):21-23.
13. Halilov MCh, Zakirchodjaev ShYa. Characteristics of some pathochemical alterations in blood, liver and brain tissue in experimental alcoholic intoxication // *Problems of Alcoholism Clinic: Collected articles, Tashkent, 1983.* - P.38-41.
14. Beregova T.V., Grigorova N.V., Eschenko Yu, V. et al. The effect of acute and chronic alcoholization on zinc content in blood // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry.* - 2008. - Vol. **1**(41). - P.49-53.
15. Morozov VG, Chavinson VH. Immunological Function of Thymus. *Advances of Actual Biology.* 1985; **97**(1):36-49.
16. Romantsov MG, Ershov FI, Kovalenko AL. Cycloferon in treatment on infectious diseases. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2008; **53**(3-4):36-45.
17. Mechti N, Affabris E, Romeo G, Lebleu B, Rossi GB. Role of interferon and 2',5'-oligoadenylate synthetase in erythroid differentiation of Friend leukemia cells. Studies with interferon-sensitive and -resistant variants. *J Biol Chem.* 1984; **259**(5):3261-3265.
18. Rovnak J, Ranu RS. Purification of 2',5'-oligoadenylate synthetase from rabbit reticulocytes. *J Interferon Res.* 198; **7**(2):231-241.
19. Justesen J, Kjeldgaard NO. Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase. *Anal Biochem.* 1992; **207**(1):90-93.
20. Bradford MM. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 1976; **72**:248-254.
21. Daniluk J, Kandefler-Szerszeń M. Interferon production by peripheral blood cells of patients with alcoholic liver disease (ALD). *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994; **42**(3):231-238.
22. Plumlee CR, Lazaro CA, Fausto N, Polyak SJ. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology.* 2005; **2**:89.
23. Ono K, Sata M, Murashima S, Fukuizumi K, Suzuki H, Tanikawa K. Biological responses to administered interferon in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; **20**(9):1560-1563.
24. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol.* 2002; **27**(1):63-68.
25. Cakman I, Kirchner H, Rink L. Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- $\alpha$  by leukocytes from elderly persons. *J Interferon Cytokine Res.* 1997; **17**(8):469-472.
26. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem.* 2011; **16**(7):1123-34.
27. Charchenko OI, Chayka VO, Bogun LI, Kovalova VA, Ostapchenko LI. The influence of acetic zinc on phospholipid composition of plasma membranes of different organs of rats at chronic alcoholic intoxication. *Physics of Alive.* 2009; **17**(2):112-119.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*  
*E-mail: i\_kompanets@mail.ru*

*Матеріал надійшов*  
*до редакції 14.03.2013*

І.А. Владімірова, І.Б. Філіппов, О.Н. Падурару, Є.Я. Шуба, Є.М. Кулієва, Я.М. Шуба

## Зміни нервово-м'язової передачі в гладеньких м'язах сечового міхура щурів з експериментальним цукровим діабетом

*Показано, що у хворих на цукровий діабет нервова регуляція вісцеральних гладеньких м'язів порушується. Ми дослідили внесок холінергічної і пуринергічної нервово-м'язової передачі у скорочення смужок гладеньких м'язів детрузора (ГМД) контрольних щурів і щурів із стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом у відповідь на електричну стимуляцію або прикладання екзогенних агоністів карбахолу (КХ, 1 мкмоль/л) та АТФ (1 ммоль/л). Нам вдалося виявити два типи скорочувальних реакцій ГМД тварин, хворих на діабет. Перший тип, який був у 80 % усіх досліджених смужок хворих тварин, характеризувався відсутністю змін у амплітуді та кінетиці синаптичновикликаних скорочень і скорочень у відповідь на прикладання екзогенного КХ, але посиленням скорочувальної відповіді на прикладання екзогенний АТФ порівняно з контролем. Другий тип реакцій, що спостерігався у решті (20 %) смужок, полягав у подовженні тривалості синаптичновикликаних скорочень внаслідок збільшення внеску в них холінегічного компонента, статистично достовірного посилення відповіді на екзогенний КХ та ще більшому посиленні скорочень на екзогенний АТФ порівняно з контролем. Наші результати деякою мірою пояснюють розбіжності в літературних даних щодо впливу експериментального діабету на нервово-м'язову передачу в ГМД. Встановлення причин виявленої різноманітності синаптичної передачі при діабеті потребує подальших досліджень.*

*Ключові слова:* цукровий діабет, сечовий міхур, гладенькі м'язи, скорочення, нервово-м'язова передача.

### ВСТУП

Вегетативна діабетична нейропатія – є тяжким і частим ускладненням цукрового діабету [1]. Послаблення впливів з боку вегетативної нервової системи на гладенькі м'язи сечового міхура у хворих на цукровий діабет провокує розвиток діабетичних цистопатій, основним симптомом яких є нетримання сечі [2]. Як правило, люди з цукровим діабетом страждають від нетримання сечі через зниження чутливості сечового міхура, збільшення його розмірів і порушення випорожнення, що призводить до суттєвих залишкових об'ємів сечі після сечовипускання. Однак часто симптоми нетримання сечі у хворих на цукровий діабет відрізняються, маючи ознаки гіперактивного сечового міхура і нетримання сечі. Якщо у першому випадку діабетичної цистопатії

сечовий міхур має ознаки гіпоректорності, то нетримання сечі характеризується нестабільністю детрузора при наповненні міхура. Незважаючи на те, що діабетичні цистопатії являють собою значну медичну та соціальну проблему серйозно впливаючи на якість життя, механізми їх виникнення все ще залишаються маловивченими.

Літературні дані щодо впливу цукрового діабету на нервово-м'язову синаптичну передачу у вісцеральних гладеньких м'язах і, зокрема, гладеньких м'язах детрузора (ГМД) сечового міхура є досить суперечливими. Переважаючою є думка, що при діабеті експресія мускаринових М-холінорецепторів і чутливість ГМД до їх агоністів зростають [3–6]. Більше того, антагоністи М-холінорецепторів вважаються ефективними для усунення симптомів гіперактивного сечового міхура

© І.А. Владімірова, І.Б. Філіппов, О.Н. Падурару, Є.Я. Шуба, Є.М. Кулієва, Я.М. Шуба



і нетримання сечі різної етіології, хоч така терапія має досить обмежене застосування через значні побічні ефекти [5, 6]. Водночас на моделі діабету 1-го типу у щурів і кролів було показано послаблення холінергічних впливів на ГМД [7–9].

Суперечливими залишаються також дані щодо впливу діабету на пуринергічну нерво-м'язову передачу, яка також бере участь у синаптичному збудженні ГМД сечового міхура [10, 11]. На наш погляд різнобій результатів попередніх досліджень може свідчити про наявність неконтрольованих факторів, які супроводжують розвиток діабету в модельних експериментах на тваринах, і які можуть впливати на перебіг синаптичних процесів.

Мета нашої роботи – порівняти внесок холінергічного та пуринергічного компонентів синаптичного збудження гладеньких м'язів детрузора сечового міхура щурів у нормі та за умов стрептозотоцин(СТЗ)-викликаного діабету, а також визначити фактори, що його супроводжують.

## МЕТОДИКА

*Експериментальні тварини та індукція діабету.* Досліди проводили на смужках ГМД сечового міхура контрольних та хворих на діабет щурів-самців лінії Вістар масою до індукції діабету 200–250 г. Діабет викликали одним внутрішньоочеревинним введенням 42 мг/кг СТЗ, розведеному у 100 ммоль/л оцтовому буфері при рН 4,5. Через 3 доби після введення СТЗ тварин перевіряли на вміст глюкози в крові, і тих щурів, у яких вона становила 30 ммоль/л і більше, відносили до «діабетичної групи». Хворих тварин використовували в експериментах після 8 тиж з доби введення СТЗ. Контрольним тваринам вводили аналогічний об'єм чистого буфера.

*Підготовка смужок ГМД та вимірювання скорочення.* Тварин анестезували ефіром і декапітували. Сечовий міхур швидко видаляли та поміщали в нагрітий (37° С), розчин Кребса (в ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9,

CaCl<sub>2</sub> – 1,8, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, NaHCO<sub>3</sub> – 15,5, глюкози – 11,5 (рН 7,4). Передню стінку міхура розрізали від основи до купола, очищали від сполучної тканини та уротелію і нарізали поздовжні та кільцеві смужки довжиною 0,7–1,0 см і діаметром 0,2–0,3 см. Смужки поміщали в проточну камеру з одним кінцем зафіксованим нерухомо, а другим – прикріпленим до ємнісного датчика сили з базовим навантаженням 3 мН. Електричну стимуляцію (ЕС) проводили серіями імпульсів із 20 стимулів (тривалість імпульсу 0,5 мс, амплітуда 100 В, частота 10 Гц) раз на 1 хв, що було достатньо для повного відновлення базального тону. Запис синаптичновикликаних скорочень здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер і паралельно на чорнильний самописець.

Всі хімічні речовини, які використовували в дослідженні, були від “Sigma-Aldrich” карбахол (КХ) розчиняли у воді в концентрації 10 ммоль/л, і потрібний об'єм для досягнення кінцевої робочої концентрації (1 мкмоль/л) додавали до розчину Кребса, Na-АТФ розводили в розчині Кребса (робоча концентрація 1 ммоль/л).

*Аналіз результатів і статистика.* У кожен експеримент брали 8–10 смужок ГМД, вимірюючи зміни базального тону, максимальну амплітуду синаптичновикликаних скорочень і їх тривалість на рівні половинної амплітуди у відповідь на прикладання різних речовин. Ми не помітили статистично значущих відмінностей у скоротливих реакціях кільцевих і поздовжніх смужок ГМД ні у відповідь на електричну стимуляцію інтрамуральних нервових закінчень, ні на прикладання екзогенних КХ або АТФ. Результати кожного експерименту усереднювали і наводили у вигляді середнє ± стандартна похибка середнього з позначенням числа смужок «n», на яких вони отримані. Статистичне порівняння контрольних значень і значень під впливом діабету та хімічних речовин проводили за допомогою непарного критерію t Стьюдента. Значущими вважали відмінності при P<0,05.



## РЕЗУЛЬТАТИ

Відомо, що скорочення ГМД у відповідь на ЕС переважно зумовлені вивільненням з інтрамуральних еферентних нервових закінчень двох основних збуджувальних нейро-медіаторів, ацетилхоліну і АТФ, з наступною активацією постсинаптичних мускаринових М-холінорецепторів та іонотропних пуринових P2X-рецепторів на гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора. Оскільки активація скорочення через іонотропні рецептори відбувається швидше, ніж через метаботропні, то скорочувальна реакція у відповідь на ЕС загалом складається з двох компонентів – початкового, транзйентного пуринергічного, і затриманого. Ми вибрали показники ЕС (пачка з 20 імпульсів амплітудою 100 В і тривалістю 0,5 мс при частоті 10 Гц) такими, що дають можливість спостерігати тільки наростаючу фазу скорочення смужки ГМД до субмаксимальної амплітуди (рис. 1,а) з тим, щоб мати можливість оцінити як стимулювальну, так і пригнічувальну дію різних фармакологічних агентів на синаптичну передачу. Така тривалість пачки імпульсів здатна

викликати як пуринергічний, так і холінергічний компоненти скорочення. Збільшення числа імпульсів у пачці вище 20 призводило до незначного підвищення амплітуди скорочувальної реакції, пропорційного зростання її тривалості та появи в ній транзйентного і тонічного компонентів (див. рис. 1,а).

Незважаючи на те, що всіх хворих на діабет щурів використовували в експерименті на 8–10-й тиждень після введення СТЗ, вміст глюкози у їх крові був приблизно однаковий, коливаючись у межах 25–30 ммоль/л, і всі вони мали явні симптоми захворювання (знижена маса, поліурія, помутніння рогівки) за характеристиками скорочувальних реакцій у відповідь на ЕС смужки ГМД виявилися неоднорідними, і їх можна було класифікувати на два основні типи. Більшість досліджених смужок (80 %) хворих на діабет тварин не виявили статистично значущих відмінностей у характеристиках синаптичновикликаних скорочень (амплітуда, тривалість, швидкість релаксації) порівняно із препаратами від контрольних щурів, тоді як решта (20 %) препаратів із видозміненою скорочувальною

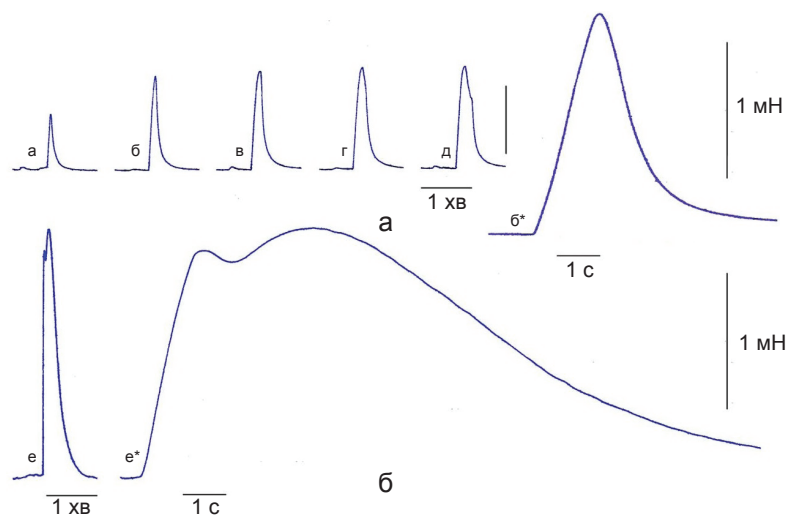


Рис. 1. Скорочення смужок гладеньких м'язів детрузора (ГМД) у відповідь на електричну стимуляцію (ЕС) і зміни їх форми при ускладненні діабету інтерстиціальним цистом: а – типові реєстрації синаптичновикликаних скорочень поздовжніх смужок ГМД сечового міхура контрольних щурів у відповідь на збільшення кількості імпульсів у пачці (від 10 до 50 з приростом 10 для а–д відповідно, частота 10 Гц); е\* – реєстрація б (20 імпульсів) при швидкій розгортці часу; б – типові реєстрації синаптичновикликаних скорочень смужок поздовжніх ГМД сечового міхура щурів, хворих на діабет з ознаками інтерстиціального циститу у відповідь на ЕС (20 імпульсів) при повільній (е) і швидкій розгортці часу (е\*)

реакцією. Найбільш очевидною особливістю цієї реакції порівняно з контролем стало значне уповільнення фази релаксації, яке навіть супроводжувалося транзйентним посиленням скорочення (овершут) після припинення пачки стимулювальних імпульсів (див. рис. 1, б). Ми помітили, що сильно видозмінена фаза релаксації спостерігалася тоді, коли сечовий міхур хворих щурів, з якого готувалися смужки ГМД, виявляв такі зовнішні ознаки запалення (цистити), як набряк, почервоніння, накопичення мастоцитів. Тому цих тварин ми умовно назвали хворими на діабет, ускладнений циститом.

Використання фармакологічних засобів, специфічних для холінергічного та пуринергічного компонентів синаптичної передачі, дали змогу виявити, що суттєва зміна скорочувальної реакції у разі, коли цукровий діабет супроводжується циститом, пов'язана з істотним збільшенням внеску холінергічного компонента в синаптичновикликане скорочення. Дійсно, як показано на рис. 2, овершут скорочення і затяжна релаксація при припиненні ЕС могли бути повністю усунуті антагоністом М-холінорецепторів атропіном (1 мкмоль/л), що вказує на їх холінергічну природу.

Отже, описане в літературі збільшення холінергічних впливів на ГМД при діабеті [3, 4], ймовірно, є наслідком не тільки гіперглікемії, а вимагає також наявності супровідного запального процесу, який є частим ускладненням при цукровому діабеті.

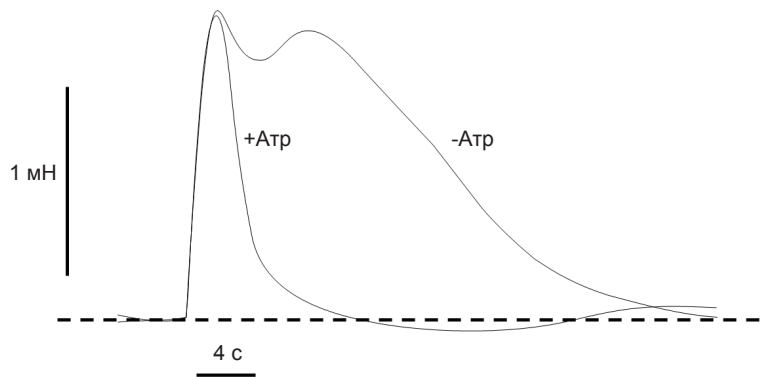


Рис. 2. Наведено типові синаптичновикликані скорочувальні реакції смужок ГМД сечового міхура щурів з діабетом з ознаками інтерстиціального циститу до (-Атр) і після (+Атр) прикладання антагоніста М-холінорецепторів атропіну

*Вплив екзогенних КХ і АТФ на скорочення гладеньких м'язів детрузора контрольних і дослідних щурів.* Екзогенне прикладання КХ викликало потужне підвищення базального тону (скорочення) ГМД контрольних тварин, на тлі якого також спостерігалася збільшення амплітуди скорочень у відповідь на ЕС (рис. 3). При цьому статистично значимих відмінностей як у амплітудах КХ-індукованих скорочувальних реакцій, так і у відносному посиленні синаптичновикликаних скорочень ГМД контрольних і дослідних тварин не спостерігалася. На відміну від КХ, екзогенне прикладання агоніста пуринорецепторів АТФ (1 ммоль/л) значно менше підвищувало базальний тонус порівняно з КХ і призводило не до посилення, а до зменшення амплітуди синаптичновикликаних скорочень ГМД тварин у нормі (рис. 4).

Незважаючи на те, що при діабеті не було помітних змін у реакціях на прикладання екзогенного КХ порівняно з контролем, у ГМД усіх тварин спостерігалися суттєві відмінності в реакції на прикладання екзогенного АТФ. По-перше, амплітуда скорочення у відповідь на пряме прикладання АТФ виявилася приблизно в 2 рази вищою у препаратах ГМД щурів із цукровим діабетом порівняно з контрольними щурами (рис. 4, 5). По-друге, незважаючи на те, що відносно зменшення амплітуди скорочень, викликаних ЕС, у відповідь на перше прикладання екзогенного АТФ практично не відрізнялося у ГМД усіх

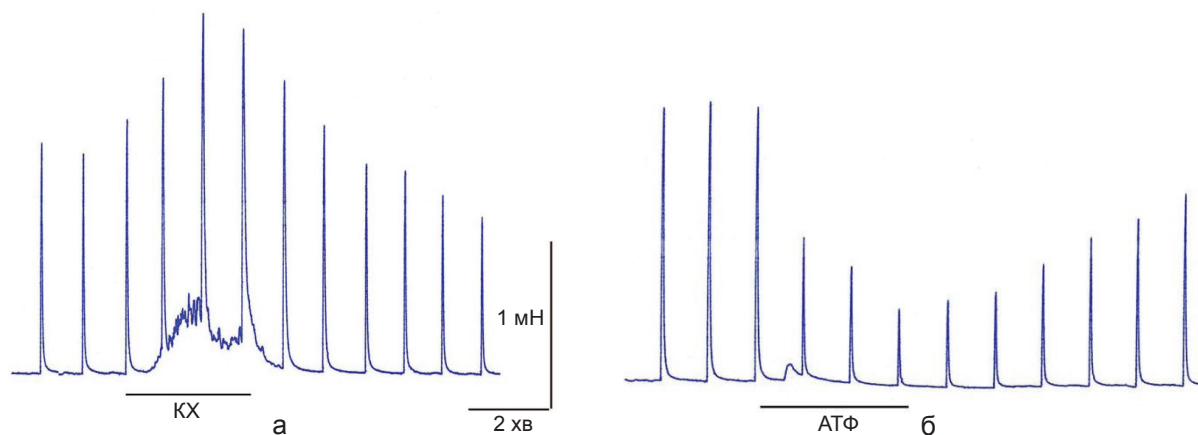


Рис. 3. Ефекти стимуляції М-холінорецепторів і пуринорецепторів екзогенними агоністами на скорочення гладеньких м'язів детрузора (ГМД) сечового міхура: а, б – типові неперервні реєстрації скорочень смужок ГМД сечового міхура контрольних щурів при періодичній електричній стимуляції інтрамуральних нервових закінчень і прикладанні екзогенних агоністів (час прикладання позначений горизонтальними рисками) М-холінорецепторів карбахолу (КХ, а) і пуринорецепторів АТФ (б)

тварин, при повторному його прикладанні пригнічення синаптичновикликаних скорочень у препаратах хворих щурів виявлялося сильнішим, ніж у контролі (див. рис. 4).

У ГМД хворих тварин, сечові міхури яких також мали виражені ознаки запалення,

застосування екзогенного АТФ викликало ще більше скорочення порівняно з хворими на діабет тваринами без запальних ускладнень і набагато більше, ніж у препаратах контрольних щурів (див. рис. 4, 5). У препаратах хворих тварин з ускладненням (циститом),

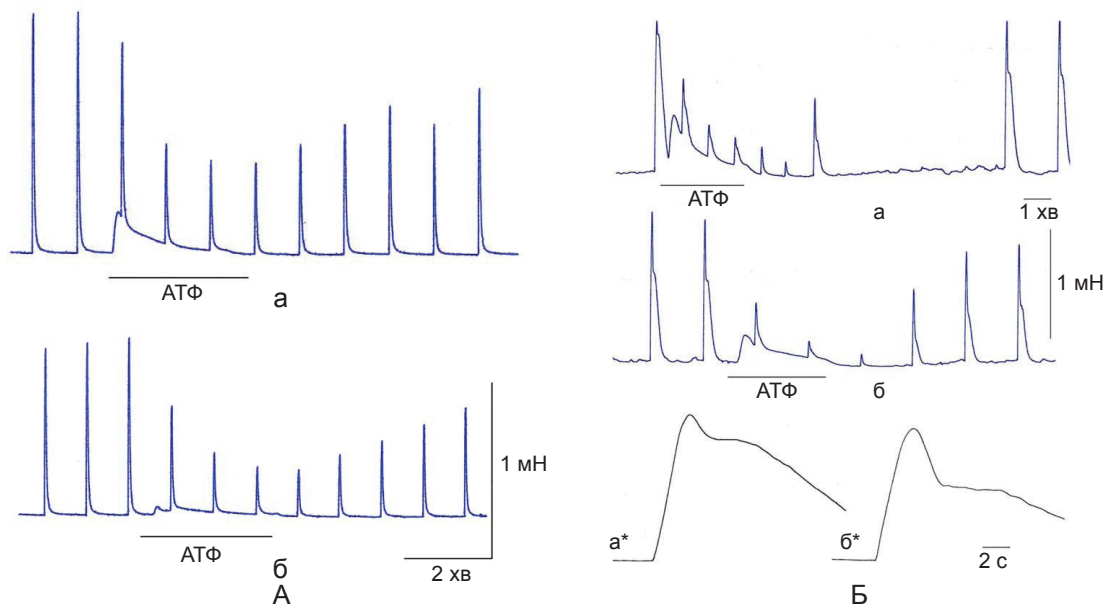


Рис. 4. Ефекти повторного прикладання екзогенного АТФ на скорочення гладеньких м'язів детрузора (ГМД): типові неперервні записи скорочення смужок ГМД сечового міхура контрольних (А) щурів та хворих на діабет щурів з циститом (Б) при періодичній електричній стимуляції (ЕС) і послідовному прикладанні екзогенного АТФ з 10-хвилинним відмиванням між його прикладаннями - а, б (час прикладання АТФ помічено горизонтальними рисками) записи а\* і б\* демонструють скорочувальні реакції у відповідь на ЕС при швидкій розгортці часу до першого прикладання АТФ і після 10-хвилинного відмивання

екзогенне прикладання АТФ пригнічувало амплітуду як початкового пуринергічного, так і холінергічного компонентів синаптично-викликаних скорочень, а після відмивання АТФ амплітуди всіх компонентів значною мірою відновлювалися (див. рис. 4). Повторне прикладання АТФ само по собі викликало менше скорочення, ніж перше і сильніше пригнічення обох компонентів синаптично-викликаних реакцій з подальшим їх поступовим відновленням протягом 10 хв. Оскільки при відмиванні АТФ амплітуда холінергічного компонента синаптично-викликаних скорочень відновлювалася навіть повільніше, ніж початковий пуринергічний компонент (див. рис. 4,б, записи а\* і б\*), зниження амплітуди цих скорочень під дією екзогенного АТФ навряд чи можна пояснити тільки десенситизацією пуринорецепторів.

Вивільнення NO також може робити внесок у скорочувальну реакцію ГМД у відповідь на ЕС [12], і який може відрізнятись у щурів, хворих на цукровий діабет, тим більше, якщо він ускладнюється циститом. Щоб це перевірити ми провели експерименти з інгібітором NO-синтази L-NNA (100 мкмоль/л). Не було виявлено статистично значущих відмінностей між контрольними, хворими та хворими з циститом щурами, ні в амплітуді компонентів синаптично-викликаних скорочень, ні у впливі на них екзогенного АТФ. Крім того, всі

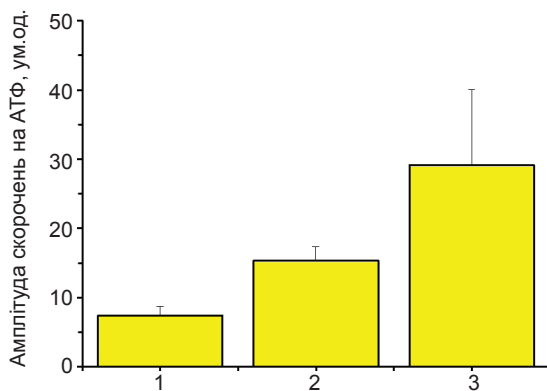


Рис. 5. Підвищення чутливості до екзогенного АТФ гладеньких м'язів детрузора при діабеті та діабеті, ускладненому циститом: 1 – контроль, 2 – діабет, 3 – діабет, ускладнений циститом

відмінності у відповідях, які спостерігалися без L-NNA, збереглися також і за наявності інгібітора. Це означає, що NO не бере участі в описаних ефектах.

Загалом, отримані результати свідчать про істотні порушення нервово-м'язової синаптичної передачі при поєднанні діабетичного і запального ушкодження тканин сечового міхура. Оскільки самого діабету було недостатньо, щоб викликати статистично значущі відмінності в показниках скорочувальних реакцій на ЕС порівняно з контролем, це означає, що фактори, зумовлені діабетом і запаленням, викликають синергетичний ефект.

Ми також виявили, що амплітуда скорочення у відповідь на прикладання екзогенного АТФ є більшою у ГМД щурів з цукровим діабетом порівняно з контрольними тваринами, і вона зростає ще більше, якщо діабет поєднується з інтерстиціальним циститом.

Таким чином, наші результати показують, що ефективність пуринергічної і, особливо, холінергічної нервово-м'язової передачі в ГМД сечового міхура істотно підвищується, якщо цукровий діабет ускладнюється інтерстиціальним циститом, спонукаючи до висновку, що основною причиною змін нервово-м'язової передачі у сечовому міхурі хворих на цукровий діабет, швидше за все є не гіперглікемія сама по собі, а ускладнення, які її супроводжують, зокрема, цистит. Серед запальних медіаторів, які можуть впливати на скорочення гладеньких м'язів є простагландини, лейкотрієни, тромбосани, гістамін, серотонін, брадикінін [13]. Водночас відомо, що при діабеті змінюється активність протеаз, які можуть впливати на стабільність пептидних медіаторів [14–16], а також естераз та гідролаз, які гідролізують низку біоактивних молекул, в тому числі ацетилхолін [7, 17, 18]. Потрібні подальші дослідження для визначення механізмів синергічної дії діабету і запалення на нервово-м'язову передачу в ГМД сечового міхура.

*За підтримки Національної академії наук України і Державного фонду фундаментальних досліджень грант F46.2/001.*

**І.В. Владимірова, І.Б. Філіппов,  
А.Н. Падурару, Є.Я. Шуба, Е.М. Кулієва,  
Я.М. Шуба**

## **ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

Литературные данные показывают, что у больных сахарным диабетом нервная регуляция висцеральных гладких мышц нарушается. Мы исследовали вклад холинергического и пуринаргического компонентов нервно-мышечной передачи в сокращение полосок гладких мышц детрузора (ГМД) контрольных крыс и крыс с стрептозотацин-индуцированным сахарным диабетом в ответ на электрическую стимуляцию, и приложение экзогенных агонистов карбахола (КХ, 1 мкмоль/л) и АТФ (1 ммоль/л). Нам удалось обнаружить два типа сократительных реакций ГМД больных животных. Первый тип, который встречался в 80 % всех исследованных полосок диабетических крыс, характеризовался отсутствием изменений в амплитуде и кинетике синаптически вызванных сокращений и эффектов на приложение КХ, но усилением сократительного ответа на приложение экзогенного АТФ по сравнению с контролем. Второй тип реакций, наблюдавшийся в остальных 20 % препаратах, заключался в увеличении продолжительности синаптически вызванных сокращений за счет большего вклада в них холинергического компонента, статистически достоверного усиления ответа на приложение экзогенного КХ и еще большего усиления сокращений на приложение экзогенного АТФ по сравнению с контролем. Наши результаты в некоторой степени объясняют различия в литературных данных по влиянию экспериментального диабета на нервно-мышечную передачу в ГМД. Установление причин выявленной гетерогенности синаптической передачи при диабете требуют дальнейших исследований. Ключевые слова: сахарный диабет, мочевой пузырь, гладкие мышцы, сокращение, нервно-мышечная передача.

### **REFERENCES**

1. Vinik AI, Freeman R, Erbas T. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin Neurol.* 2003 Dec;23(4):365-72.
2. Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *J Urol.* 2009 Dec;182(6 Suppl):S18-26.
3. Latifpour J, Gousse A, Kondo S, Morita T, Weiss RM. Effects of experimental diabetes on biochemical and functional characteristics of bladder muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989 Jan;248(1):81-8.
4. Lusheshi GN, Zar MA. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cholinergic motor transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 1991 Jul;103(3):1657-62.
5. Hegde SS, Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci.* 1999;64(6-7):419-28.
6. Andersson KE, Yoshida M. Antimuscarinics and the overactive detrusor--which is the main mechanism of action? *Eur Urol.* 2003 Jan;43(1):1-5.
7. Agarwal VR, Rastogi AK, Sahib MK, Sagar P. In vitro insulin effect on acetylcholine esterase of erythrocyte membranes of normal and diabetic rats. *Acta Diabetol Lat.* 1985 Oct-Dec;22(4):359-63.
8. Liu G, Daneshgari F. Alterations in neurogenically mediated contractile responses of urinary bladder in rats with diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jun;288(6):F1220-6.
9. Mumtaz FH, Lau DH, Siddiqui EJ, Morgan RJ, Thompson CS, Mikhailidis DP. Changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in the diabetic rabbit bladder. *In Vivo.* 2006 Jan-Feb;20(1):1-4.
10. de Groat WC, Yoshimura N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:691-721.
11. Ford AP, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, Cockayne DA. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2006 Feb;147 Suppl 2:S132-43.
12. Andersson KE, Persson K. Nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated effects in lower urinary tract smooth muscles. *World J Urol.* 1994;12(5):274-80. Review.
13. Rosamilia A, Dwyer PL. Pathophysiology of interstitial cystitis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2000 Oct;12(5):405-10.
14. Brooks BA, Goll DE, Peng YS, Greweling JA, Hennecke G. Effect of alloxan diabetes on a Ca<sup>2+</sup>-activated proteinase in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1983 Mar;244(3):C175-81.
15. Song RH, Singh AK, Leehey DJ. Decreased glomerular proteinase activity in the streptozotocin diabetic rat. *Am J Nephrol.* 1999;19(3):441-6.
16. Zambotti-Villela L, Yamasaki SC, Villarreal JS, Murena-Nunes C, Silveira PF. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Peptides.* 2007 Aug;28(8):1586-95.
17. Wolinsky H, Goldfischer S, Capron L, Capron F, Coltoff-Schiller B, Kasak L. Hydrolase activities in the rat aorta. I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment. *Circ Res.* 1978 Jun;42(6):821-31.
18. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Booth-Handford RP, Durrington PN. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jul 20;1035(1):113-6.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;  
Державна ключова лабораторія молекуляр. і клітин. фізіології, Київ  
E-mail: yshuba@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 23.05.2013*



I.A. Topol, A.M. Kamyshny, A.V. Abramov, Yu.M. Kolesnik

## Expression of XBP1 in lymphocytes of small intestine rats under chronic social stress and modulation of intestinal microflora composition

*the present study was conducted to investigate of the influence of chronic social stress and modulation of the composition of intestinal microflora on the distribution of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue of ileum of the rats. Structure of population of Xbp1<sup>+</sup>-cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to Xbp1 of rat. Chronic social stress development is accompanied with the reduction of total number of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in lymphoid structures of ileum (31% -3 fold reduction,  $p < 0,05$ ), mostly expressed in lymphoid follicles, and changes the concentration of Xbp1 protein in immunopositive cells. Modulation of the composition of intestinal microflora by antibiotics and probiotics under chronic social stress results in the increase of total number of Xbp1<sup>+</sup> lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue, the degree of it depends on the kind of stress. The discovered alterations of Xbp1 expression under stress may be one of the triggers for development of autoimmune and inflammatory bowel diseases. Thus, increased understanding of the molecular actions and transcriptional networks regulated by XBP1 in immune cells may aid in the development of potential therapeutics targeting immune disorders.*

*Key words: stress, gut-associated lymphoid tissue, transcription factor Xbp1, probiotics, antibiotics.*

### INTRODUCTION

Chronic social stress (CSS) is known to impact health, primarily via interactions among the nervous, endocrine, and immune systems that translate social experiences into physiological responses [1]. Specific stress-reactive pathways, including the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system, facilitate intersystem communication via the release of glucocorticoids (GCs), catecholamines, and cytokines. It is widely accepted that stress affects the immune response, and chronic or repeated exposure to a stressor has been shown to be immunosuppressive. In large measure, suppression of immunity is due to the well-known anti-inflammatory effects of GC hormones. CSS, however, is not always immunosuppressive, particularly, if the stressor induces a state of functional GC resistance [2]. While the common view has been that

stress suppresses immune system activity due to the suppressive effects of stress-induced GC hormones, there are now multiple studies demonstrating that stressor exposure can also enhance the immune response. Exposure to the stressor increases both innate and adaptive components of the immune system [1, 2]. Specific immunological changes that have been observed in mice following of CSS include: splenomegaly; elevated levels of circulating pro-inflammatory cytokines; enhanced expression of TLRs on bone marrow, blood, and splenic monocytes; and the development of functional GC resistance [3]. For example, the production of cytokines (e.g., TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) is increased in LPS-stimulated splenic macrophages from mice exposed to the CSS [2, 3]. In addition, the ability of splenic macrophages to kill target *Escherichia coli* is significantly increased by exposure to the stressor [4]. Chronic social

© I.A. Topol, A.M. Kamyshny, A.V. Abramov, Yu.M. Kolesnik

stress is a risk factor for many affective and somatic disorders, including inflammatory bowel diseases (IBD), type 1 diabetes mellitus.

On the other hand, stress of different etiology may result in disorders of protein folding and induce the development of endoplasmic reticulum stress (ER stress). In eukaryotes, signals emanating from the ER induce a transcriptional program that enables cells to survive ER stress. This highly coordinated response, the Unfolded Protein Response (UPR), facilitates the folding, processing, export and degradation of proteins emanating from the ER during stressed conditions [5]. Three distinct UPR signaling pathways exist in mammalian cells that include ER transmembrane inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$  and  $\beta$  (IRE1 $\alpha$  and  $\beta$ ), protein kinase-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6) [5]. Xbp1, first identified as a key regulator of major histocompatibility complex (MHC) class II gene expression in B cells, represents the most conserved signaling component of UPR and is critical for cell fate determination in response to ER stress. Collectively, reports on Xbp1 in immunity have revealed novel roles for this transcription factor in both innate and adaptive immune responses although interestingly, none are directly related to the function of MHC class II genes [5]. Thus, increased understanding of the molecular actions and transcriptional networks regulated by Xbp1 in immune cells may aid in the development of potential therapeutics targeting immune disorders.

A great number of works having been published on the role of disorders of Xbp1 production with epithelial cells of the intestine in the development of inflammatory and autoimmune diseases [6–9], we know nothing about the character of the given protein expression with gut-associated lymphoid tissue (GALT) [10] lymphocytes under CSS. That is why the aim of this work was to study the peculiarities of Xbp1 expression with lymphocytes of small intestine in Wistar rats under CSS and modulation of intestinal

microflora composition with antibiotics and probiotics.

## METHODS

### Animals and experimental design

We studied 70 female Wistar rats (age 6 months) dividing them into seven experimental groups: control rats were orally given 0,5 ml of physiological salt solution intragastrically per three weeks (group 1); rats, whom CSS1 was modeled via 3 week social isolation and prolonged psychoemotional influence (PEI) implying permanent living of female in «aggressive environment» due to perforated partition in the cage with aggressive male confronting another planted male every day (group 2); rats, whom CSS2 was modeled via maintenance in overpopulated cage (20 rats in a cage) during 3 weeks with every day group change and the female under experiment was every day placed into a new balanced and overpopulated colony (group 3); rats with CSS1 and CSS2 whom the modulation of intestinal microflora composition was performed with daily intragastric administrations of aminoglycoside antibiotics Canamycine (Can) during 7 days beginning with the 3d week of modeling CSS in a dose of 15 mg/kg (group 4 and 5, respectively); rats with CSS1 and CSS2 whom modulation of intestinal microflora composition was performed via daily intragastric administrations of Lactobacterin (Lb, a mixture of live lyophilically dried lactobacteria of *L. plantarum* strain 8P-A3 and *L. fermentum* strain 90T-C4) during 3 weeks in a dose of  $4 \times 10^8$  CFU (group 6 and 7, respectively). The level of emotional-behavioral activity was established in the test «open field» accordingly the expression of experimental activity, the level of depression in animals was established in Porsolt test («forced swimming test», FST). The rats were removed from experiment with the method of decapitation under narcosis.

### Immunofluorescence analysis

Population structure of XBP1<sup>+</sup>-cells GALT was

studied basing on analysis of serial histological sections and findings of their morphometric and densitometric descriptions. To carry out this investigation on with rotary microtome MICROM HR-360 (Microm, Germany), 5-micron serial sections of iliac fixed according to Buen were performed, which were then deparaffined in xylol, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100%, 96%, 70%), washed off in 0,1 M phosphate buffer

(pH = 7,4) and painted with primary rabbit monoclonal antibodies to Xbp1 rat (BioLegend) during 18 hours in a moist chamber in  $t = 4$  C. After washing off the rest of primary antibodies in 0,1 M phosphate buffer, the sections were incubated for 60 minutes ( $T = 37^{\circ}$  C) with secondary antibodies in solution 1:64. As secondary antibodies, goat's ones were used to full molecule IgG of rabbit, conjugated with FITC (SantaCruzBiotechnology, USA). The processed histological sections were studied with the help of computer program ImageJ (NIH, USA). Images obtained on the microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) in ultraviolet spectrum of stimulation 390 nm (FITC) with the help of highly sensitive chamber AxioCam 5c (ZEISS, Germany) and program package for obtaining, archiving and preparation of the images for publication AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Germany) were immediately introduced into computer. At the same time, the areas with statistically significant fluorescence distinctive for lymphoid tissues expressing Xbp1 were determined in automatic regime. The lymphoid follicles (Lf) and subepithelial zone of Peyer's patches (PP) and lymphocyte-filled villi (LFV) were studied.

#### Statistics

The results were statistically processed by means of software Statistica 6.0 (StatSoft, USA) using the Student's t-criterion. The results significantly differed in statistics at  $P < 0,05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The development of CSS was accompanied with the decrease of investigational activity of rats in

test «open field» and increase of immobilization time as much as 50% comparatively the starting level in Porsolt test. It is known that rats under prolonged psycho-emotional impact (PEI) or social isolation developed pathological condition which was characterized with pronounced anxiety, decreasing of investigational and motor activity, as well as decreasing of communicative and pain sensitivity, disorders of estral cycle, sexual/social recognizing, and depression [11]. Besides, all the spectrum of characteristic stress-reaction changes that is the increase of suprarenal gland mass, adrenalin and noradrenalin levels, corticosterone (CS) release and others [11] was observed in those animals.

The study of serial sections of ileum in control Wistar rats first incubated with monoclonal antibodies to antigen Xbp1 showed that the total density of Xbp1<sup>+</sup> of lymphocytes is the highest in lymphoid follicles of Peyer's patches (PP Lf) –  $120 \pm 5$  on  $1 \text{ mm}^2$ , and this is caused by the prevalence of B-lymphocytes and plasmocytes having the most intensive expression of the given transcription factor in the given morphofunctional area, when the least one in LFV (Lymphocyte-filled villi) –  $72 \pm 5$  on  $1 \text{ mm}^2$  (Fig.1). Among Xbp1<sup>+</sup> cells, Xbp1<sup>+</sup>-small lymphocytes were predominant. There were from 60% (in LFV) to 68% (in PP Lf) of the total number of Xbp1<sup>+</sup> lymphocytes.

CSS development was accompanied with one-directed tendency on decreasing of total number of Xbp1<sup>+</sup> lymphocytes in lymphoid structures of ileum, mostly expressed in lymphoid follicles. Thus, total density of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in LFV reduction was 31% (CSS1) – 35% (CSS2) ( $P < 0,05$ ), in subepithelial area of PP reduction was 47% (CSS2) – 58% (CSS1) ( $P < 0,05$ ), in PP Lf – 2,5 (CSS2) – 3 fold (CSS1) in comparison with control (Fig.1). The given reduction of the total number of Xbp1<sup>+</sup>-cells occurred due to reduction of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes of all classes, the density of population and percentage of Xbp-1<sup>+</sup>-lymphoblasts having being decreasing most intensively in every area. The measuring of fluorescence intensity of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes

expressing the concentration of Xbp1 protein in immunopositive cells showed the one-directed reliable reduction of this parameter in Xbp1<sup>+</sup>-lymphoblasts, mostly expressed in CSS2, as well as the increase in Xbp1<sup>+</sup>-medium lymphocytes and reduction in Xbp1<sup>+</sup>-small lymphocytes in PP subepithelial zones in CSS1 (Fig.2).

The administrations of Can into experimental animals produced more pronounced influence on Xbp1 expression with GALT lymphocytes in CSS1. So, its oral intake had no influence on total density of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in LFV, produced the increase of their number in PP subepithelial zones – 41% (P<0,05) only in CSS1 and contributed to intensive increase of their number in PP Lf – 66% (P<0,05) in CSS1 and 42% (P<0,05) in CSS2 (Fig. 1). At the same time, the study of Xbp1 protein concentration in immunopositive cells showed that the injections of Can were accompanied with different-directed changes of the given parameter in Xbp1<sup>+</sup>-medium and small lymphocytes and didn't influence the level of its expression in Xbp1<sup>+</sup>-lymphoblasts (Fig.2).

On the contrary, the administrations of Lb to stressed rats, unlike Can, had the most significant influence on Xbp1 expression with lymphocytes GALT in CSS2. Specifically, the total number of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in animals subjected to CSS1 increased in only PP Lf (97%, P<0,01), while under influence of CSS2 their number increased in all studied morphofunctional zones - 70% in LFV (P<0,05), 63% (P<0,05) in PP subepithelial zone and 2 fold increase (P<0,05) in PP Lf (Fig. 1). Lb administrations produced a reliable increase of Xbp1 protein concentration in Xbp1<sup>+</sup>-lymphoblasts (CSS2) and Xbp1<sup>+</sup>-small lymphocytes (CSS1) and didn't influence the given index in Xbp1<sup>+</sup>-medium lymphocytes (Fig. 2).

It is known that the alteration of Xbp1 expression may be a trigger of inflammatory and autoimmune diseases. The existence of an important link between cell-intrinsic ER stress and organ-specific inflammation has recently been reported within the intestines [7]. Specifically, conditional deletion of Xbp1 in the intestinal epithelium of mice was shown to result

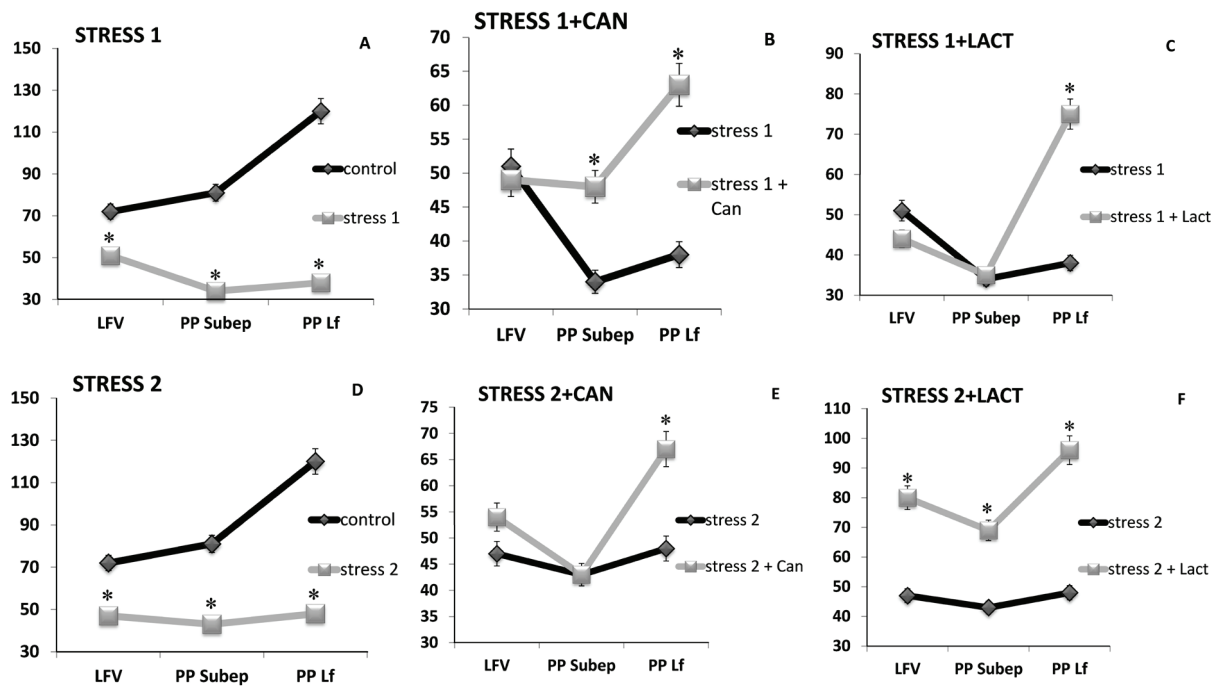


Fig. 1. The number of Xbp1-cells. Note: \*P<0,05

in the spontaneous development of intestinal inflammation in the small intestine that presented with hallmarks of human IBD including crypt abscesses, leukocytic infiltration, and frank ulcerations [9]. Remarkably, even the deletion of one Xbp1 allele was sufficient to induce spontaneous enteritis in a significant portion of the animals [8, 9]. Moreover, hypomorphic Xbp1 with the loss of one allele also led to Paneth cell dysfunction and an increased susceptibility to DSS colitis and deletion of both alleles resulted in apoptotic cell death of Paneth cells [9]. Similar to rodents, studies in humans also suggest that ER stress can both be a primary cause of intestinal inflammation (e.g., as observed in Xbp1<sup>-/-</sup> mice) or a consequence of inflammation (e.g., as observed in IL-10<sup>-/-</sup> mice) [6, 9]. Patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, two forms of IBD, exhibited decreased Xbp1s levels [6]. In addition, several genome-wide linkage studies hinted at an association between IBD and a region of the genome physically close to the Xbp1 gene and the IRE1 $\beta$ . Moreover, deep sequencing identified novel rare single nucleotide polymorphisms in Xbp1 that along with other environmental and genetic risk factors might confer susceptibility to IBD [8].

But in spite of absolute importance of alterations of Xbp1 expression with epithelial cells of the gut in the development of pathology, at present a whole series of works have shown the capacity of the given transcription factor to

regulate the reactions of natural and adaptive immunity [12]. It was shown that TLR signaling activates the IRE1/Xbp1 axis and that this loop is crucial for host defense [13]. TLRs are well-conserved receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns and danger signals. When macrophages were stimulated in vitro with agonists of TLR2 (Pam3CSK4) and TLR4 (LPS), the IRE1/Xbp1 pathway was activated independently of the other UPR branches and in the absence of ER stress [13]. Interestingly, treatment of macrophages with tunicamycin together with LPS caused an inhibition of ER stress triggered by tunicamycin [12]. To dissect the pathway, the authors looked for the events downstream of TLR that led to Xbp1 activation. They found that Xbp1 interacted with the promoter regions of genes IL6 and TNF, leading to sustained production of cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ . Xbp-1 dependence for in vitro and in vivo immunity against *Francisella tularensis*, a bacterium that activates TLR2, further confirmed the relevance of TLR-triggered Xbp1 activation [13]. The function of Xbp1 in innate immunity seemed to be highly conserved as similar observations were made in worms; Xbp1-deficient worms were hypersensitive to pathogen infection [14]. Therefore, Xbp1 plays a critical and protective role in both innate and adaptive immunity. This is not surprising given that the RNase domain of IRE1, both  $\alpha$  and  $\beta$ , shares unique homology with RNase L, a critical component of the antiviral system that cleaves

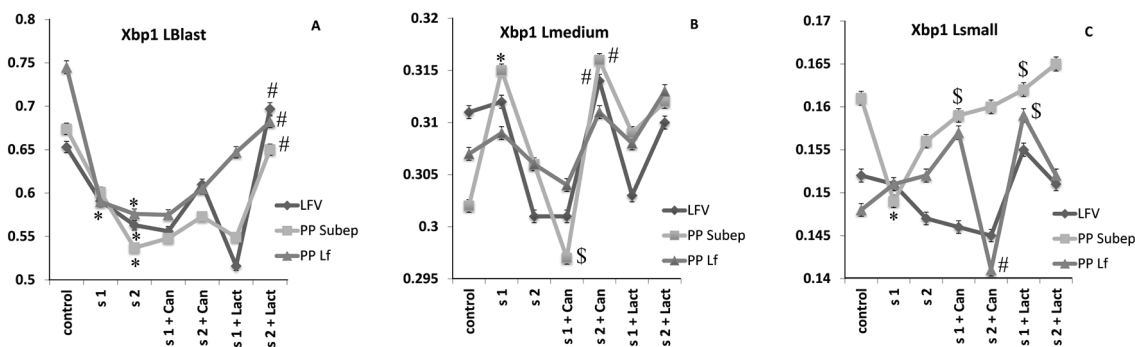


Fig. 2. Concentration of protein in Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes. Note: \*P<0,05 relative to the control, \$P<0,05 relative to the stress 1, #P<0,05 relative to the stress 2



single-stranded RNA [12, 15]. The IRE1 $\alpha$ -Xbp1 signaling pathway of UPR is also critical for the development and survival of another immune population, dendritic cells (DCs), particularly the plasmacytoid compartment (pDCs) [16]. Mice deficient of Xbp1 presented a smaller number of DCs, especially pDCs, and these cells secreted smaller amounts of IFN- $\alpha$ . Absence of Xbp1 also compromised the differentiation and survival of DCs and pDCs. Conversely, forced expression of Xbp1s enhanced DC development [16].

Besides, the discovered alterations of Xbp1 expression in stress may have a significant effect on the processes of differentiation of adaptive immune system cells. Xbp1 is required for plasma cell differentiation, but does not influence memory B cell commitment [17]. Xbp1-deficient B cells exhibited normal proliferation and activation, but expressed decreased levels of J chain, a component required for Ig assembly. Consequently, these animals were more susceptible to infections, but restoration of Xbp1s expression rescued Ig production. Xbp1-mediated ER expansion was required for adoption of a “professional secretory cell” phenotype characteristic of plasma cells [18, 19]. In addition, Xbp1s induced IL-6 expression in splenic B cells, a terminal differentiation factor. Thus, Xbp1 in professional secretory cells may have evolved additional functions allowing these cells to respond to “physiological” UPR. Hence, the timing and mechanism of UPR and Xbp1 activation during plasma cell differentiation remain an interesting and open question. Taking into consideration the importance antibodies play in protection of intestinal mucosa from pathogens, the possible consequences of discovered alterations of Xbp1 expression with lymphocytes of GALT become clear. Besides, these alterations may influence on the final production of autoantibodies by plasmocytes to cell antigens, and this explains a sharp increase in the frequency of autoimmune diseases in people subjected to the effect of social stress as well as to change the production of protective secretory IgA. The endoplasmic

reticulum (ER) stress response is a possible critical event for the initial T-cell differentiation upon antigen recognition. Franco A. et al. studied the relationship between ER and Il-10 transcription in human Treg clones [20]. The induction of ER stress with a canonical stressor, thapsigargin, enhances Il-10 transcription. Salubrinal, a small molecule inhibitor of the eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) dephosphorylation, dramatically inhibits it [20]. Il-10 transcription is also enhanced by exogenous TNF $\alpha$ . These results disclose a role for ER stress in driving T cell plasticity.

## CONCLUSION

1. GALT lymphocytes actively express Xbp1: the greatest number of Xbp1<sup>+</sup> cells is localized in Peyer’s patches lymphoid follicles, the least number – in LFV. Xbp1<sup>+</sup>-small lymphocytes prevail among Xbp1<sup>+</sup>-cells, they share from 60% (in LFV) to 68% (in PP Lf) of the total number of Xbp1<sup>+</sup> cells.

2. CSS development is accompanied with the reduction of total number of Xbp1<sup>+</sup>-lymphocytes in lymphoid structures of ileum (31% – 3fold increase, P<0,05), mostly expressed in lymphoid follicles. It also changes the concentration of Xbp1 protein in immunopositive cells.

3. Modulation of the composition of intestinal microflora by antibiotics and probiotics under CSS results in the increase of total number of Xbp1<sup>+</sup> lymphocytes in GALT and depends on the kind of stress: Can administrations intensively increase their number in CSS1, and Lb administrations – in CSS2.

**И.А. Топол, А.М. Камышный, А.В. Абрамов,  
Ю.М. Колесник**

### **ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХВР1 ЛИМФОЦИТАМИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА И МОДУЛЯ- ЦИИ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ**

Исследовано влияние хронического социального стресса и модуляции состава кишечной микрофлоры на интенсивность экспрессии транскрипционного фактора Xbp1 иммунными клетками кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани у крыс. Установлено, что развитие хронического

соціального стресу супроводжується зниженням загального числа  $Xbp1^+$ -лімфоцитів у лімфоїдних структурах підшлункової кишки (на 31 % – в 3 рази,  $P < 0,05$ ), найбільш вираженому в лімфоїдних фолікулах, а також змінює концентрацію білка  $Xbp1$  в імунопозитивних клітинах. Модуляція складу кишкової мікрофлори антибіотиками та пробіотиками в умовах хронічного соціального стресу призводить до збільшення загального числа  $Xbp1^+$ -лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині, ступінь якого залежить від виду стресу. Виявлені зміни експресії  $Xbp1$  в умовах стресу можуть бути одним з тригерів розвитку аутоімунних і запальних захворювань кишечника.

Ключові слова: стрес, кишково-асоційована лімфоїдна тканина, транскрипційний фактор  $Xbp1$ , пробіотики, антибіотики.

**І.О. Топол, О.М. Камишний, А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник**

### **ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ХВР1 ЛІМФОЦИТАМИ КЛУБОВОЇ КИШКИ ЩУРІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ І МОДУЛЯЦІЇ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ**

Досліджено вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на інтенсивність експресії транскрипційного фактора  $Xbp1$  імунними клітинами кишково-асоційованої лімфоїдної тканини у щурів. Встановлено, що розвиток хронічного соціального стресу супроводжується зниженням загальної кількості  $Xbp1^+$ -лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки (на 31 % – у 3 рази,  $P < 0,05$ ), найбільш вираженим в лімфоїдних фолікулах, а також змінює концентрацію білка  $Xbp1$  в імунопозитивних клітинах. Модуляція складу кишкової мікрофлори антибіотиками та пробіотиками в умовах хронічного соціального стресу призводить до збільшення загального числа  $Xbp1^+$ -лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині, ступінь якого залежить від виду стресу. Виявлені зміни експресії  $Xbp1$  в умовах стресу можуть бути одним з тригерів розвитку аутоімунних і запальних захворювань кишечника.

Ключові слова: стрес, кишково-асоційована лімфоїдна тканина, транскрипційний фактор XBP1, пробіотики, антибіотики.

#### **REFERENCES**

1. Mays J, Bailey M, Hunzeker J. Influenza virus-specific immunological memory is enhanced by repeated social defeat. *J Immunol.* 2010; 184: 2014–2025.
2. Bailey M, Kierstein S, Haczku A. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhib-

- its corticosteroid responsiveness of cytokine production. *J. Immunol.* 2009; 182: 7888–7896.
3. Powell N, Bailey M, Mays J. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav. Immun.* 2009; 23: 225–231.
4. Allen R, Lafuse W, Galley J. The intestinal microbiota are necessary for stressor-induced enhancement of splenic macrophage microbicidal activity. *Brain Behav. Immun.* 2012; 26: 371–382.
5. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13: 89–102.
6. Fritz T, Niederreiter L, Adolph T. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut.* 2011; 60: 1580–1588.
7. Kaser A, Blumberg R. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunology.* 2010; 3: 11–16.
8. Kaser A, Blumberg R. Survive an innate immune response through XBP1. *Cell Research.* 2010; 20: 506–507.
9. Kaser A, Flak M, Blumberg R. The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. *Exp. Cell Res.* 2011; 15: 2772–2779.
10. Brown E, Sadarangani M, Finlay B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology.* 2013; 14: 660–667.
11. Avgustinovich D, Kovalenko I. Gender-related characteristics of responding to prolonged psychoemotional stress in mice. *Neurosc. Behav. Physiol.* 2009; 40 (3): 858–867.
12. Costa C, Rosa S, Camargo M. The Unfolded Protein Response: How Protein Folding Became a Restrictive Aspect for Innate Immunity and B Lymphocytes. *Scand. Journal of Immunology.* 2011; 73: 436–448.
13. Martinon F, Chen X, Glimcher L. Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 411–418.
14. Richardson C, Kooistra T, Kim D. An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*. *Nature.* 2010; 463: 1092–1095.
15. Martinon F, Glimcher L. Regulation of Innate Immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23: 35–40.
16. Iwakoshi N, Pypaert M, Glimcher L. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 2267–2275.
17. Todd D, McHeyzer-Williams L, Glimcher L. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 2009; 206: 2151–2159.
18. Gass J, Jiang H, Wek R. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.* 2008; 45: 1035–1043.
19. Glimcher L. XBP1: the last two decades. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69: 67–71.
20. Franco A, Almanza G, Burns J. Endoplasmic reticulum stress drives a regulatory phenotype in human T-cell clones. *Cell Immunol.* 2010; 266: 1–6.

Zaporozhye State Medical University  
E-mail: [innatopol@yandex.ua](mailto:innatopol@yandex.ua)

Received 06.08.2013

В.В. Рушак, М.О. Чашин

## Зміни вмісту інсуліну в підшлунковій залозі морських свинок при метаболічному синдромі

*Одним з інтегральних показників стану організму при моделюванні метаболічного синдрому у морських свинок є рівень продукції інсуліну. Порівняння цього показника з концентрацією глюкози в крові може характеризувати ступінь резистентності клітин до інсуліну. В цій роботі визначали вміст інсуліну в клітинах підшлункової залози морських свинок у нормі та при метаболічному синдромі. Результати порівнювали з показниками вмісту глюкози в крові дослідних тварин. Використано методи гістохімічного та імуногістохімічного аналізу продукції інсуліну. Було встановлено, що розвиток метаболічного синдрому у морських свинок супроводжується порушеннями синтезу інсуліну, дистрофічними змінами в тканині підшлункової залози та збільшенням концентрації глюкози в крові. Отримані результати дають змогу говорити про наявність у дослідних тварин інсулінорезистентності, яка є основним патогенетичним механізмом у розвитку метаболічного синдрому.*

*Ключові слова: імуногістохімія, підшлункова залоза, морські свинки, інсулін, метаболічний синдром.*

### ВСТУП

Метаболічний синдром – комплекс метаболічних і гормональних порушень, які розвиваються внаслідок інсулінорезистентності та компенсаторної гіперінсулінемії [1]. Згідно з даними літератури, до появи інсулінорезистентності у більшості випадків призводить ожиріння. Надлишок жирової тканини в абдомінальній зоні та супутні цьому нейрогормональні порушення відіграють важливу роль у розвитку інсулінорезистентності та пов'язаних з нею метаболічних розладів. Збільшення об'єму жирових клітин супроводжується зменшенням щільності інсулінових рецепторів на їх поверхні та зниженням їх чутливості до інсуліну [2]. Це в свою чергу призводить до активного ліполізу, що викликає накопичення вільних жирних кислот і гліцерину, які через кров у великих кількостях надходять у печінку та скелетні м'язи. Локальне накопичення метаболітів вільних жирних кислот (таких, як церамід, диаліцерол, ацил КоА) та посилений синтез адипоцитами протизапальних цитокінів (се-

ред яких фактор некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) та інтерлейкін (ІЛ-6)) порушують передачу інсулінового сигналу знижуючи активність тирозинкінази інсулінового рецептора [3, 4]. Подальше зменшення зв'язування клітинами інсуліну та розвиток гіперінсулінемії порушує вуглеводний обмін, що в свою чергу сприяє розвитку периферичної інсулінорезистентності та гіперглікемії [5, 6].

Здатність  $\beta$ -клітин підшлункової залози реагувати на підвищений вміст глюкози у крові посиленою секрецією інсуліну допомагає нормалізувати концентрацію глюкози. Однак постійна стимуляція  $\beta$ -клітин високим вмістом глюкози та їх чутливість до підвищеної концентрації вільних жирних кислот (феномен ліпотоксичності) сприяють виснаженню  $\beta$ -клітин і розвитку їх секреторної дисфункції. При цьому кількість функціонально активних  $\beta$ -клітин знижується, що компенсується посиленням синтезом в них інсуліну. Це призводить до виснаження та деструкції  $\beta$ -клітин, а з часом – до розвитку цукрового діабету 2-го типу та супутніх йому ускладнень [7].

© В.В. Рушак, М.О. Чашин

Морські свинки (*Cavia porcellus*) є одним із модельних об'єктів, ця експериментальна модель є зручною для вивчення патологічних процесів, пов'язаних з вільнорадикальним ураженням, зокрема метаболічного синдрому та цукрового діабету і дає змогу отримати результати з найбільшою ймовірністю екстраполювати на людський організм.

Проте дослідження метаболічного синдрому з використанням морських свинок ускладнюються конститутивно низьким вмістом інсуліну у молодих тварин (в 5 разів менше, ніж у дорослих) [8]. Визначення цього білка в сироватці крові за допомогою імуноферментного аналізу потребує специфічних для цього виду тварин антитіл, оскільки інсулін морських свинок суттєво відрізняється від інсуліну інших видів [9–11].

Метою нашої роботи було вивчення патологічних процесів у підшлунковій залозі морських свинок під час моделювання у них метаболічного синдрому.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 10 чотиримісячних самцях морських свинок із середньою масою 370 г, які були поділені на дві групи – контрольну та експериментальну. Контрольних тварин утримували за стандартних умов 12-годинного світлового режиму та вільного доступу до води і їжі. Розвиток метаболічного синдрому викликали внутрішньом'язовим введенням 15 мг/кг протаміну сульфату двічі на добу впродовж 5 тиж, з наступним утриманням тварин за нормальних умов протягом 2 тиж [12]. На 49-ту добу тварин декапітували. Всі експерименти на тваринах проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Забір крові проводили за допомогою проколу вени вушної раковини. Вміст глюкози вимірювали за допомогою глюкометра Акку-Чек Актив (“Акку-Чек”®, Німеччина).

В нашій роботі досліджували вміст інсуліну в підшлунковій залозі тварин за допомогою гістохімічного та імуногістохімічного методів.

Вміст інсуліну визначали в парафінових зрізах тканин підшлункової залози морських свинок, які виготовляли згідно зі стандартним методом [13]. Парафінові зрізи товщиною 4–6 мкм фіксували на скельцях з адгезивними властивостями (“SuperFrostPlus”, Німеччина) або на скельцях, вкритих полі-L-лізином. У першому випадку зрізи залишали на 30 хв при 56°C, в другому – на добу при 37°C.

Забарвлення альдегід-фуксином здійснювали за методом Гоморі [13]. Препарати витримували у 0,5%-му розчині йоду та знебарвлювали 0,5%-м розчином гідросульфату натрію. Після промивання у воді зрізи зневоднювали у 70%-му спирті. Після цього препарати забарвлювали альдегід-фуксином, промивали у декількох об'ємах 70%-го спирту та дофарбовували гематоксиліном ядра для візуалізації клітин.

Імуногістохімічний аналіз проводили згідно зі стандартним протоколом [14]. У день проведення реакції зрізи депарафінували та гідратували. Для оптимального імуногістохімічного визначення вмісту інсуліну антиген демаскували обробкою зрізів в мікрохвильовій печі в розчині цитратного буфера (рН 6,0). Скельця зі зрізами охолоджували протягом 20 хв при кімнатній температурі і промивали у розчині PBS (від англ. Phosphate buffered saline), після чого інкубували у 3%-му розчині пероксидази хрину впродовж 10 хв. Після відмивання препаратів для зменшення неспецифічного забарвлення на зрізи наносили 1%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Інкубацію зрізів з первинними моноклональними мишачими антитілами проти інсуліну (CE9H9, “Millipore”, США) проводили протягом однієї години в оптимальному розведенні (1:300), після чого зрізи тричі відмивали від незв'язаних первинних антитіл у PBS. Далі скельця зі зрізами інкубували 45 хв з вторинними



антитілами системи PolyVueHRP Detection System (“DiagnosticBioSystems”, США) та тричі відмивали у PBS. Для візуалізації пероксидази проводили кольорову реакцію з використанням хромоген-3-діамінобензидину тетраклориду (DAB; “DakoCytomation”, Данія). Зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра та фіксували канадським бальзамом або середовищем VectaMount TM Mounting (“Vector Laboratories”, Inc., США).

Як позитивний контроль було використано препарати інсуліноми підшлункової залози людини, яка характеризується безконтрольним синтезом і викидом у кров’яне русло великих кількостей інсуліну. В негативному контролі реакцію проводили на препаратах інсуліноми без використання первинних антитіл.

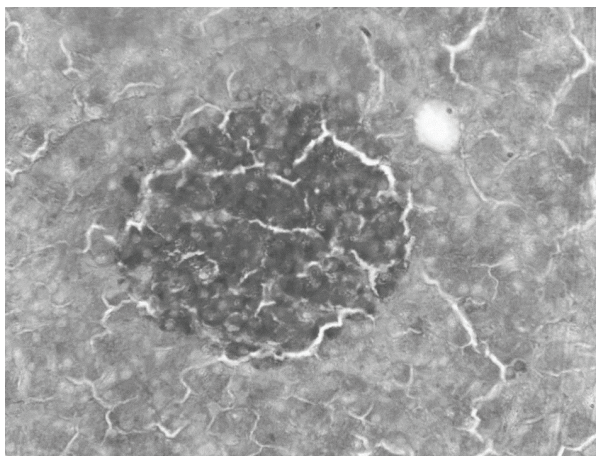
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для візуалізації  $\beta$ -клітин підшлункової залози морських свинок використовували альдегід-фуксин, який забарвлює базofilні гранули інсуліну всередині клітини в темно-червоний колір. Як видно з рис. 1, а, в нормі центральна частина острівців Лангерганса заповнена  $\beta$ -клітинами, в цитоплазмі яких спостерігаються інтенсивно зафарбовані невеликі

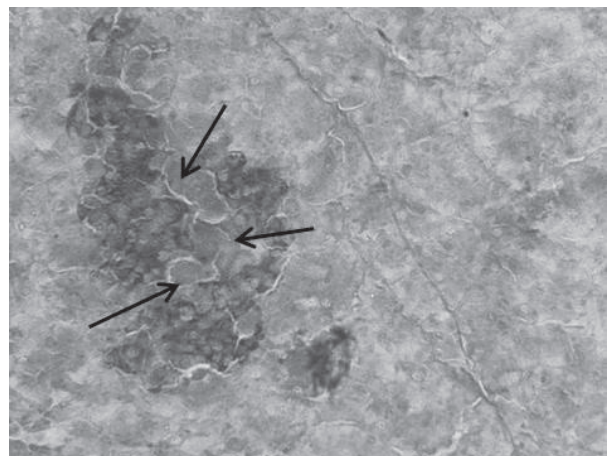
гранули. Це вказує на нормальну продукцію інсуліну всередині клітин. Зменшення інтенсивності забарвлення (див. рис. 1, б) свідчить про дистрофію  $\beta$ -клітин і розвиток метаболічного синдрому. Застосування цього методу дає змогу визначати відносний рівень вмісту клітин в острівках Лангерганса, в яких відбувається синтез інсуліну, таким чином оцінюючи функціональний стан  $\beta$ -клітин.

Слід відмітити, що в препаратах підшлункової залози морських свинок в нормі спостерігається рівномірне забарвлення клітин острівців Лангерганса, що свідчить про нормальну продукцію інсуліну (рис. 2, а). Розвиток метаболічного синдрому та гіперінсулінемії призводить до виснаження частини  $\beta$ -клітин та припинення синтезу ними інсуліну (див. рис. 2, б). На рисунку такі клітини в острівцях майже не забарвлені. Решта  $\beta$ -клітин, компенсуючи інсуліновий дефіцит, синтезують інсулін у кількостях, що значно перевищують норму (більш темне забарвлення). Отримані результати свідчать про те, що застосування цього методу дає змогу визначати відносний рівень інсуліну в  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса.

Для імуногістохімічного аналізу був проведений позитивний та негативний контроль. Як видно з рис. 3, а, в позитивному контролі  $\beta$ -клітини інтенсивно зафарбовані, що свід-



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування альдегід-фуксином): а – контрольні тварини, б – тварини з метаболічним синдромом, 49-та доба. Стрілками вказані дистрофічні зміни острівця Лангерганса. Leica DM 1000, x290



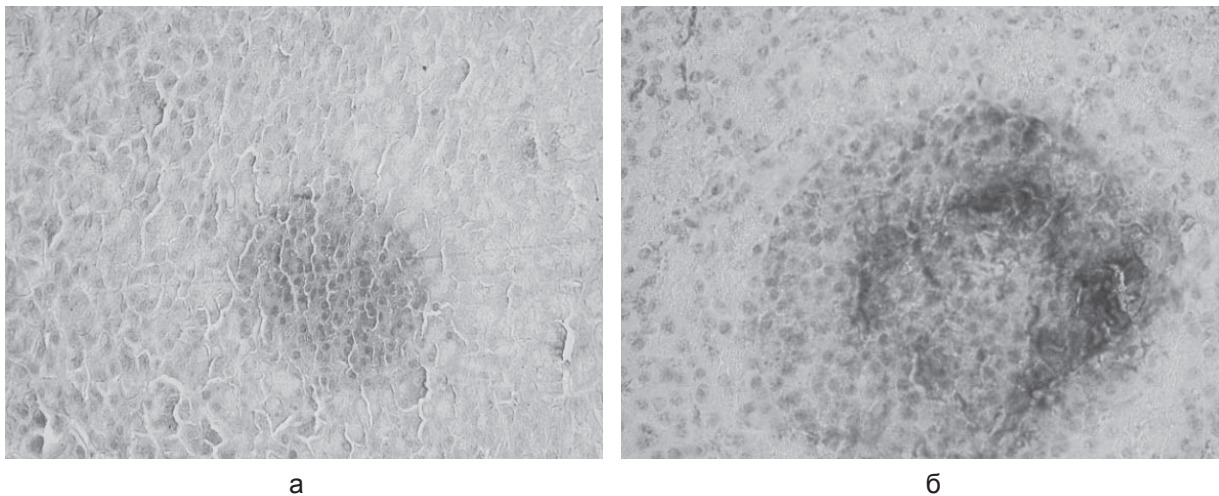


Рис. 2. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування з допомогою первинних моноклональних антитіл Millipore CE9H9 та системи DAB): а – контрольні тварини, б – тварини з метаболічним синдромом, 49-та доба. Leica DM 1000, x290

чить про високий вміст в них інсуліну. В негативному контролі первинні антитіла не використовувались. У зразках негативного контролю імунопозитивна реакція була відсутня, що свідчить про специфічність імуногістохімічної реакції (див. рис. 3,б)

Отримані результати щодо продукції інсуліну порівнювались з показниками вмісту глюкози в крові дослідних тварин для оцінки біологічної ефективності інсуліну. Як показано на рис. 4, розвиток метаболічного синдрому супроводжується підвищенням

концентрації глюкози в крові дослідних тварин впродовж моделювання захворювання. Достовірна різниця між показниками контрольної та експериментальної групи була відмічена на 28-му добу. На 49-ту добу моделювання вміст глюкози у крові дослідних тварин становив 10,05 ммоль/л, що на 70 % вище від контролю.

Таким чином, нами показано, що при моделюванні метаболічного синдрому спостерігаються патологічні процеси, характерні для цього захворювання, а саме: порушення

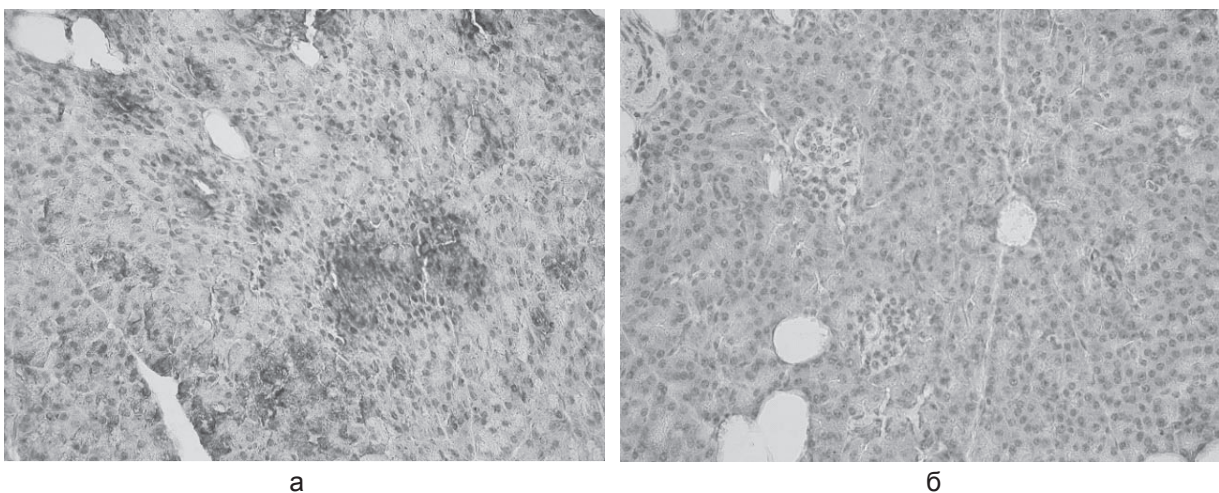


Рис. 3. Мікрофотографії препаратів інсуліноми підшлункової залози людини (аналіз за допомогою первинних моноклональних антитіл Millipore CE9H9 та системи DAB): а – позитивний контроль, б – негативний контроль. Leica DM 1000, x290

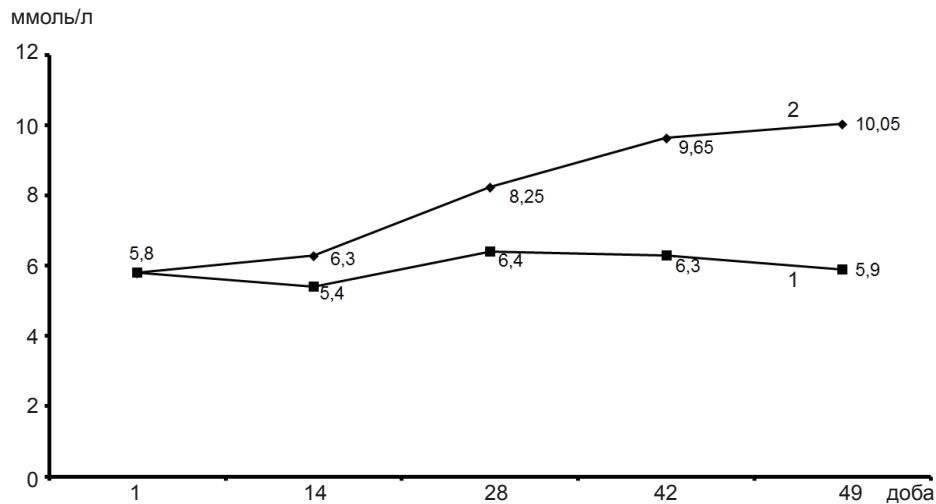


Рис. 4. Динаміка вмісту глюкози в крові контрольних (1) та дослідних (2) тварин

секреції інсуліну, дистрофічні зміни в острівцях Лангерганса та зростання концентрації глюкози в крові дослідних тварин. Посилення секреції інсуліну одночасно з постійно високим вмістом глюкози в крові може свідчити про зниження біологічної ефективності інсуліну, що є ознакою інсулінорезистентності. Описані методи визначення інсуліну разом з їх порівнянням з вмістом глюкози можуть бути використані для оцінки інсулінорезистентності у тих випадках, коли проведення аналізу інсуліну в сироватці крові є неможливим.

*Автори висловлюють щире подяку за допомогу в роботі та критичні зауваження співробітникам Інституту молекулярної біології та генетики Максимчук О.В., Хорунженко А.І., Заєць В.М.*

**В.В. Рушак, М.О. Чашин**

### ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ИНСУЛИНА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Одним из интегральных показателей состояния организма при моделировании метаболического синдрома у животных является уровень продукции инсулина. Сравнение этого показателя с содержанием глюкозы в крови может характеризовать степень резистентности клеток к инсулину. В данной работе проведено определение

содержания инсулина в клетках поджелудочной железы морских свинок в норме и при метаболическом синдроме. Полученные результаты сопоставлены со значениями содержания глюкозы в крови подопытных животных. В работе использовались методы гистохимического и иммуногистохимического анализа продукции инсулина. Было установлено, что воспроизведение метаболического синдрома у морских свинок сопровождается нарушениями синтеза инсулина, дистрофическими изменениями в ткани поджелудочной железы и ростом содержания глюкозы в крови. Полученные результаты позволяют говорить о наличии у подопытных животных инсулинорезистентности, которая является основным патогенетическим механизмом в развитии метаболического синдрома.

Ключевые слова: иммуногистохимия, поджелудочная железа, морские свинки, инсулин, метаболический синдром.

**V.V. Ruschak, M.O. Chashchyn**

### INSULIN DETERMINATION IN PANCREAS OF GUINEA PIGS WITH METABOLIC SYNDROME

The level of insulin production is one of the integral parameters during the modeling of metabolic syndrome in animals. Comparison of this parameter with blood glucose level can characterize the degree of insulin resistance of cells. In this work we determined the level of insulin in pancreatic cells of guinea pigs under normal conditions and during metabolic syndrome. The obtained results were compared with the blood glucose level of experimental animals. In this work we used the methods of histochemical and immunohistochemical analysis of insulin production. It was found that in guinea pigs metabolic syndrome modeling is accompanied by impaired insulin synthesis, degenerative changes in pancreatic tissue and increased blood glucose level. The data obtained suggest

that the experimental animals have insulin resistance, which is the main pathogenetic mechanism in the development of metabolic syndrome.

Key words: immunohistochemistry, pancreas, guinea pigs, insulin, metabolic syndrome.

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

## REFERENCES

1. Kravets E., Samoilov Y. et al. Metabolic syndrome in a total medicine practice. Bulletin of Siberian medicine. 2008: № 1: 80-87
2. Ambrosova T.N., O.N. Kovalyova, T.V. Ascheulova. Role of carbohydrates metabolism disorders and proinflammatory cytokines activity in development of obesity-associated hypertens. Ukr. Cardiol Journ.: 5: 2009.
3. Danilova, L. Insulin resistance phenomenon in clinical practice. Lechebnoe delo. 2009: 2 (6): 29–40.
4. Bouzakri K., Zierath J. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. J Biol Chem. 2007: 282(11):7783-9
5. Chazova I., Mychka V. Metabolic syndrome. Russian Medical Journal. 2004: 163.
6. Adiels M., Olofsson S.O., Taskinen M.R. et al. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008: 28 (7): 1225-1236.
7. Gordon C. Weirand, Susan Bonner-Weir. Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. Diabetes. 2004: 53 (3): 16-21
8. Haist R., Davidson J. A study of the levels of extractable insulin of guinea pig pancreas. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1964: 42(3): 315-317
9. Smith, Leslie F. Amino Acid Sequences of Insulins. Diabetes. 1972: 21 (2): 457-460
10. Neubauer, H., Schune, H. The Immunogenicity of Different Insulins in Several Animal Species. Diabetes. 1978: 27 (1): 8-15
11. Conlon J.M. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. Peptides. 2001: 22(7):1183-93.
12. Rushchak V., Kovalenko V. et al. Optimization of animal model for investigation of pathogenesis of metabolic syndrome. Fiziologichnyj Zhurnal. 2012: 58 (6): 29-35
13. Sarkisov D., Perov J., editors. Microscopically technique. Moscow: Medicine: 1996.
14. Kumar G., Rudbeck L., editors. Immunohistochemical staining methods. Fifth Edition. Carpinteria, California: Dako North America: 2009.

*Ин-т молекуляр. біології та генетики НАН України, Київ*  
*E-mail: v.v.rushchak@gmail.com*

*Матеріал надійшов до редакції 12.11.2013*

І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук, Л.П. Білецька, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів

## Показники NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу та пригнічення циклооксигенази

*У дослідях на щурах з модельованим водно-імобілізаційним стресом вивчено вплив нестероїдних протизапальних препаратів різного генезу на морфологічний стан слизової оболонки шлунка та зміни показників NO-синтазної (NOS) системи. Показано, що введення неселективного інгібітора циклооксигенази – напроксену на тлі стресу у щурів потенціувало розвиток структурно-геморагічних уражень слизової оболонки шлунка, при цьому активність обидвох ізоформ NOS (індуцибельної та конститутивної) знижувалась, а процеси ліпопероксидації залишалися на рівні показників при водно-імобілізаційному стресі. Показано переваги використання  $H_2S$ -зв'язаного нестероїдного протизапального препарату АТВ-346, він за умов стресу демонстрував знижену гастротоксичність. Проте показники NO-синтазної системи за умов його дії доводять домінуючий вплив базової молекули (напроксену) у регуляції функціонування NOS. Введення інгібітора подвійної дії ЦОГ/ЛОГ, сполуки 2A5DHT, зменшувало структурно-геморагічні ушкодження порівняно з впливом напроксену; при цьому активність індуктибельної NOS залишалася значно вищою.*

*Ключові слова: нестероїдні протизапальні препарати, стрес, оксид азоту, слизова оболонка шлунка.*

### ВСТУП

Виразкова хвороба шлунка виникає внаслідок дисбалансу чинників агресії та захисних механізмів. Серед перших чільне місце посідають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), гострий і хронічний стрес.

Механізм дії усіх НПЗП полягає у інгібуванні циклооксигенази (ЦОГ), відповідальної за синтез простагландинів [2]. Саме з інгібуванням синтезу останніх пов'язують підвищену гастротоксичність НПЗП, адже простагландини у фізіологічних концентраціях мають гастропротективну дію. НПЗП реалізують свій вплив, взаємодіючи з двома ізоформами ЦОГ: ЦОГ-1 – ензимом, що конститутивно експресується у більшості тканин та ЦОГ-2, експресія якого значно зростає при запаленні. Більшість існуючих НПЗП (аспірин, диклофенак, напроксен тощо) неселективно пригнічують обидві ізоформи ензиму, внаслідок чого фізіологічні ефекти

простагландинів, що продукуються ЦОГ-1, нівелюються і, як наслідок, розвивається виразка шлунка [6].

Одним із напрямків пошуку нових НПЗП – створення засобів, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ та ліпооксигеназу (ЛОГ). Найперспективнішим є створення НПЗП зі зв'язаним сульфідом водню ( $H_2S$ ). Найкраще описаним із існуючих нині  $H_2S$ -зв'язаних НПЗП є АТВ-346, що у попередньо проведених дослідженнях на тваринах виявив протизапальні властивості, притаманні напроксену й не чинив побічних ефектів, які мають НПЗП [15].

Стрес – ще один із факторів ульцерогенезу слизової оболонки шлунка (СОШ), що пояснюється впливом комбінації чинників, серед яких провідним є катехоламіни. За таких умов зростає експресія як NO-синтаз (NOS), так і ЦОГ-2. Часто пацієнти з больовими синдромами, що приймають НПЗП,

© І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук, Л.П. Білецька, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів



потрапляють у стресову ситуацію, внаслідок чого поєднуються дії двох чинників ульцерогенезу й ризик розвитку виразкової хвороби, ускладненої кровотечами та перфораціями, значно зростає [8].

Мета нашої роботи – дослідити вплив різних за механізмом дії НПЗП: неселективного ЦОГ – інгібітора напроксену,  $H_2S$ -зв'язаного НПЗП АТВ-346 та інгібітора подвійної ЦОГ-2/5-ЛОГ активності, сполуки 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензилден)-тіазол-4-один (2A5DHT), яка за своєю структурою ідентична селективному блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону, на процеси ліпопероксидації та стан NOS-системи у СОШ за умов водно-імобілізаційного стресу (ВІС) у щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження виконано на 42 щурах згідно з міжнародними умовами проведення експериментів з лабораторними тваринами. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. Для проведення досліду їх не годували, забезпечували безперешкодний доступ до води.

Тварин було розподілено на 5 груп. До I групи ввійшли інтактні щури, до II – щури, яким модельованим ВІС (імобілізація тварин у пластиковому контейнері, після чого останній занурювали вертикально у воду при  $23\pm 0,5^\circ C$  до рівня мечоподібного відростка упродовж 5 год) [14]. Тваринам III, IV і V груп на тлі ВІС вводили напроксен, АТВ-346 і 2A5DHT відповідно в дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу. Забір матеріалу для досліджень проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг).

У гомогенатах СОШ визначали активність NOS [3], аргінази [7], у плазмі крові – L-аргініну [1]. Процеси ліпопероксидації аналізували за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [4].

Оцінку площі та ступеня структурно-геморагічних змін СОШ проводили методом планіметрії [13]. Диференційно макроско-

пічно ураження СОШ оцінювали в балах: 1) наявність гіперемії – 2 бали; 2) наявність нальоту і дрібних крововиливів – 4 бали; 3) наявність нальоту та поверхневої ерозії – 6 балів; 4) глибока ерозія або кілька ерозій – 8 балів; 5) наявність виразки – 10 балів; 6) наявність виразки, ерозій, крововиливів – 12 балів.

Результати оброблено з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під дією ВІС у тварин розвивалися гострі структурно-геморагічні ураження (СГУ) СОШ, представлені глибокими ерозіями, виразками, крововиливами. Середня площа СГУ поверхні СОШ становила  $31,5\pm 7,1$  мм<sup>2</sup>, індекс деструктивних ушкоджень –  $5,2\pm 0,6$  бала (рис.1). Введення напроксену за 30 хв до моделювання ВІС потенціювало розвиток СГУ, площа ушкоджень зростала у 2,5 раза ( $P<0,01$ ). У разі введення АТВ-346 цей показник був суттєво нижчим (на 27 %) порівняно з дією напроксену, проте на 82 % вищим, ніж за умов ВІС. При подвійному інгібуванні ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT площа ушкодження становила  $36,5\pm 6,2$  мм<sup>2</sup>, а індекс –  $4,8\pm 0,6$  бала, тобто ці показники були практично на рівні значень ВІС.

У контрольних тварин активність загальної NOS становила  $5,7\pm 2,3$ , iNOS –  $1,58\pm 0,73$  та cNOS –  $4,13\pm 1,48$  нмоль/хв·г, активність аргінази –  $0,35\pm 0,07$  мкмоль/хв·г, а концентрація L-аргініну в плазмі крові –  $39,7\pm 4,8$  мкмоль/мл, що узгоджується з даними літератури про домінуючу регульовальну роль cNOS/NO за фізіологічних умов [13].

При дії ВІС різко зростала активність NOS порівняно з контрольними значеннями: загальна зростала майже вдвічі ( $P<0,05$ ), cNOS змінювалася незначно, водночас активність iNOS підвищувалася майже у 5 разів ( $P<0,05$ ). При цьому знижувалась активність аргінази у 2,7 раза ( $P<0,05$ ), а концентрація



L-аргініну на 23 % ( $P < 0,05$ ; табл. 1). Водночас вміст ТБК-активних продуктів збільшився на 33 % ( $P < 0,01$ ), вказуючи на активування процесів ліпопероксидації.

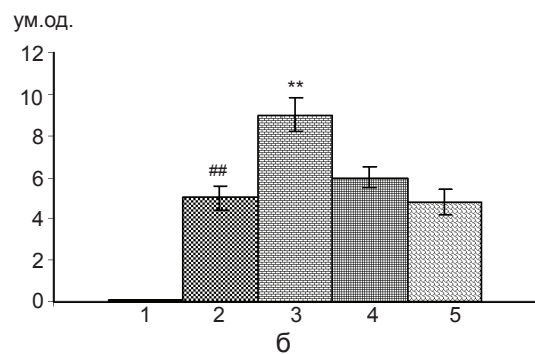
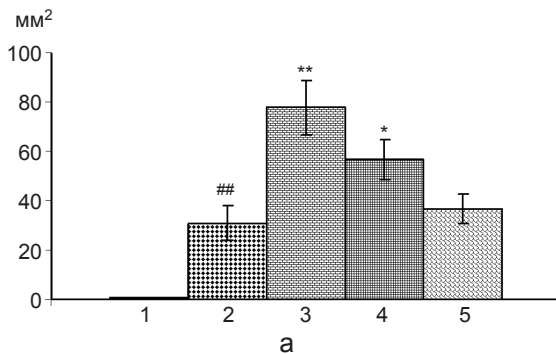
Напроксен спричинював зниження активності NOS у 2,1 раза ( $P < 0,05$ ) порівняно зі значеннями при ВІС, при цьому знижувалась активність обидвох ізоформ ферменту (iNOS у 1,9 раза;  $P < 0,05$ ; cNOS у 2,2 раза;  $P < 0,05$ ). Активність аргінази залишалась значно нижчою, ніж у інтактних тварин. Показники системи NOS при введенні АТВ-346 на тлі ВІС змінювались подібно до дії напроксену, що свідчить про домінуючий вплив напроксенового ядра молекули АТВ-346 на активність NOS, тоді як ефект  $H_2S$  істотно не проявлявся.

Подвійне інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ змінювало активність NOS не суттєво, порівняно з ВІС. Проте слід зазначити, що активність аргінази дещо зростала. Вміст ТБК-активних продуктів проявляв тенденцію до зниження, оскільки 2A5DHT, імовірно, має антиоксидантні властивості.

Аналізуючи отримані результати, варто відзначити, що ульцерогенна дія стресу має комплексний характер – у механізми її розвитку залучені різні чинники, які здійснюють регуляцію функціонування організму на рівні ЦНС, системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз, а також на клітинному та молекулярному рівнях [5]. Так, вплив стресу супроводжується стимуляцією паравентри-

кулярного ядра гіпоталамуса, що впливає на продукцію слизу, об'єм шлункового соку, його кислотність. Зростає продукція стрес-гормонів (катехоламінів, глюкокортикоїдів). Катехоламіни чинять вазоконстрикторну дію, зумовлюючи порушення кровотоку, ішемію слизової оболонки гастродуоденальної зони та, як наслідок, розвиток оксидативного стресу [8]. При цьому адреналін опосередковано підвищує секрецію гідрохлоридної кислоти, стимулюючи вивільнення гастрину. Глюкокортикоїди, в свою чергу, посилюють біосинтез гістаміну, впливають на секрецію пепсину та гідрохлоридної кислоти. Водночас вони інгібують фосфоліпазу  $A_2$ , що відповідає за вивільнення арахідонової кислоти, яка є субстратом для синтезу простагландинів.

Оксид азоту, що синтезується конститутивними ізоформами NOS (cNOS), за умов "стресової" виразки здійснює такі захисті ефекти, як підтримання відповідного рівня кровотоку (зниження вазоконстрикції, спричиненої катехоламінами), регуляція моторики, активування синтезу протективних білків HSP70 [9]. Проте гіпоксія при стресі призводить до різкого підвищення експресії iNOS, що відповідає за продукцію NO, який за умов оксидативного стресу взаємодіє з активними радикалами кисню і стає джерелом таких радикалів, як нітроксил ( $NO^{\cdot}$ ), пероксинітрит ( $ONOO^{\cdot}$ ) тощо, котрі посилюють ушкодження клітини.



Площа та індекс структурно-геморагічних ушкоджень слизової оболонки шлунка шурів: 1 – контроль (інтактні тварини); 2 – водно-імобілізаційний стрес; 3 – напроксен і водно-імобілізаційний стрес; 4 – АТВ-346 і водно-імобілізаційний стрес; 5 – 2A5DHT і водно-імобілізаційний стрес. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  порівняно з показниками при водно-імобілізаційному стресі; # $P < 0,05$ , ### $P < 0,01$  порівняно з показниками інтактних тварин

У наших дослідженнях показано, що при ВІС активується iNOS, унаслідок чого метаболізм L-аргініну змістився в бік оксидативного шляху. Водночас активуються процеси ліпопероксидації, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-активних продуктів.

Використання НПЗП за умов стресу призводить до сумування ульцерогенних ефектів цих двох чинників деструктивних ушкоджень СОШ. Механізм гастротоксичної дії традиційних НПЗП, до яких належить напроксен, полягає у інгібуванні синтезу простагландинів.

У наших дослідженнях застосування напроксену на тлі ВІС супроводжувалося зростанням площі СГУ СОШ. При цьому слід відмітити зниження активності iNOS, що свідчить про тісний взаємозв'язок NOS і циклооксигеназної системи. Раніше було показано, що простагландини є активаторами NOS [12]. Таким чином, однією з причин зниження активності iNOS є інгібування синтезу простагландинів.

Створення H<sub>2</sub>S-зв'язаних НПЗП – актуальний напрямок пошуку нових засобів, позбавлених гастротоксичності. Нещодавно було показано цитопротективні властивості H<sub>2</sub>S, який у фізіологічних концентраціях

бере активну участь у механізмах захисту СОШ від факторів агресії, діючи як вазодилататор, нейромодулятор [16]. Окрім цього, H<sub>2</sub>S властива антиоксидантна, антиапоптична та протизапальна дія у органах травного тракту [10]. Виявлено, що введення НПЗП, як неселективних, так і інгібіторів ЦОГ-2 у переважній більшості випадків супроводжується інгібуванням цистатіонін β-синтази та цистатіонін γ-ліази, ферментів, відповідальних за синтез H<sub>2</sub>S. Таким чином, фізіологічні цитопротективні ефекти останнього суттєво знижуються, що може бути однією з причин розвитку гастропатій при вживанні НПЗП. Найкраще описаним із існуючих нині H<sub>2</sub>S-зв'язаних НПЗП є АТВ-346, який створено на основі напроксену.

У дослідах на моделі ВІС нами було показано знижену гастротоксичність АТВ-346, що полягала у зменшенні площі та індексу СГУ. Проте показники NOS-системи були на рівні таких при дії напроксену. Це свідчить про домінуючий вплив базової молекули НПЗП у регуляції функціонування NOS. Разом з тим рівень процесів ліпопероксидації у СОШ за умов дії АТВ-346 залишався достатньо високим. Імовірно досліджувана доза препарату забезпечувала вивільнення

**Зміни активності NO-синтаз (NOS), аргінази та ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці шлунка за умов впливу нестероїдних протизапальних препаратів на тлі водно-імобілізаційного стресу**

Схема досліджу	ТБК-активні продукти, нмоль/хв · г	NOS, нмоль/хв · г		Аргіназа, мкмоль/хв · г	L-Аргінін, мкг/мл
		індуцибельна	конститутивна		
Контроль (інтактні тварини)	209,8±8,9	0,158±0,073	0,413±1,048	0,35±0,07	39,7±4,8
Водно-імобілізаційний стрес	277,9±5,6 <sup>#</sup>	0,761±0,204 <sup>#</sup>	0,372±0,119	0,13±0,04 <sup>#</sup>	30,7±2,35 <sup>#</sup>
Напроксен і водно-імобілізаційний стрес	281,0±6,0	0,391±0,18 <sup>**</sup>	0,165±0,104 <sup>**</sup>	0,14±0,05	34,4±9,0
АТВ-346 і водно-імобілізаційний стрес	273,3±1,8 <sup>**</sup>	0,306±0,122 <sup>**</sup>	0,24±0,083	0,26±0,09 <sup>**</sup>	28,3±3,5
2A5DHT і водно-імобілізаційний стрес	273,0±6,55	0,762±0,166	0,735±0,113	0,24±0,04	32,1±4,2

\* P<0,05, \*\* P<0,01 порівняно з показниками при водно-імобілізаційному стресі; <sup>#</sup>P<0,05, <sup>##</sup>P<0,01 порівняно з інтактними тваринами.

H<sub>2</sub>S, що використовувався на здійснення цитопротекторних ефектів, наприклад інгібуванням адгезії лейкоцитів або підвищенням виділенням факторів росту.

Іншим перспективним напрямком досліджень є вивчення нових НПЗП, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ і ЛОГ. Теоретично за умов інгібування циклооксигеназного шляху обміну арахідонової кислоти НПЗП її метаболізм зміщується в бік ліпооксигеназного шляху. Таким чином, інгібування синтезу простагландинів, спричинює посилення синтезу лейкотрієнів, які, в свою чергу, можуть брати участь в ушкодженні СОШ, індукуючи мікросудинні порушення, вазоконстрикцію судин, посилюючи руйнування слизового бар'єра та стимулюючи секрецію гідрохлоридної кислоти, а також продукування прозапальних цитокінів. Препарати, що спроможні одночасно блокувати ЦОГ і ЛОГ можуть мати численні переваги над ЦОГ-інгібіторами, оскільки маючи більший спектр протизапальної активності, вони, ймовірно не мають побічних ефектів, притаманних НПЗП. Окремі представники цього класу НПЗП (лінкофелон, тепоксалін) вже нині добре зарекомендували себе у клінічних дослідженнях [11].

Ми використали структурний аналог дарбуфелону, сполуку 2A5DHT, що добре зарекомендувала себе як протизапальний засіб, позбавлений побічних ефектів. У дослідженнях на моделі ВІС у СОШ щурів нами показано зниження площі та індексу СГУ за умов дії 2A5DHT порівняно з напроксеном, проте вищими, ніж при впливі лише ВІС. При цьому активність iNOS залишалася високою (на рівні значень при ВІС), а активність аргінази зростала.

## ВИСНОВКИ

1. Введення неселективного інгібітора ЦОГ напроксену на тлі ВІС у щурів потенціувало розвиток структурно-геморагічних уражень СОШ, що проявлялося у збільшенні площі та індексу ушкоджень. При цьому активність

обох ізоформ NOS знижувалась, а показники процесів ліпопероксидації залишалися на рівні таких у разі стресу.

2. H<sub>2</sub>S-зв'язаний НПЗП АТВ-346 демонстрував знижену гастротоксичність, що полягала у зменшенні площі та індексу структурно-геморагічних уражень. Проте спостерігався домінуючий вплив базової молекули НПЗП у регуляції функціонування NOS.

3. Введення інгібітора подвійної дії ЦОГ/ЛОГ, сполуки 2A5DHT, спричинювало зменшення структурно-геморагічних ушкоджень порівняно зі впливом напроксену. При цьому активність iNOS залишалася значно вищою, ніж за умов впливу напроксену (на рівні значень при ВІС).

**И.С. Фоменко, Т.И. Бондарчук, Л.П. Билецкая, Н.Б. Панасюк, А.Я. Склярів**

## ПОКАЗАТЕЛИ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССА И УГНЕТЕНИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ

В опытах на крысах с моделированным водно-иммобилизационным стрессом, изучено влияние нестероидных противовоспалительных препаратов разного генеза на морфологическое состояние слизистой оболочки желудка и показатели NO-синтазной (NOS) системы. Показано, что введение крысам неселективного ингибитора циклооксигеназы – напроксена на фоне стресса потенцирует развитие структурно-геморрагических повреждений слизистой оболочки желудка и снижает активность обеих изоформ (индуцибельной – iNOS и конститутивной) NOS. При этом показатели процессов липопероксидации оставались на уровне таковых при водно-иммобилизационном стрессе. В работе обоснованы преимущества использования H<sub>2</sub>S-связанного нестероидного противовоспалительного препарата АТВ-346, так как в условиях стресса он продемонстрировал низкую гастротоксичность. Тем не менее в условиях его действия доминирующее влияние было базовой молекулы (напроксена) в регуляции функционирования NOS. Введение ингибитора двойного действия ЦОГ/ЛОГ – соединения 2A5DHT вызывало уменьшение структурно-геморрагических изменений и значительное повышение активности iNOS в сравнении с влиянием напроксена.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные препараты, стресс, оксид азота, слизистая оболочка желудка.

**I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk, L.P. Biletska,  
N.B. Panasyuk, A.Ya. Sklyarov**

### **PARAMETERS OF NO SYNTHASE SYSTEM OF GASTRIC MUCOSA IN RATS UNDER STRESS CONDITIONS AND INHIBITION OF CYCLOOXYGENASE**

In experiments on rats with modeled water-restrained stress, the influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of different genesis on morphological status of gastric mucosa and changes of NO-synthase system parameters have been studied. Administration of nonselective cyclooxygenase inhibitor naproxen in the water-restrained stress model in rats potentiated the increase of severity of damage of gastric mucosa. At the same time, the activity of both inducible and constitutive isoforms of NO-synthase decreased. The parameters of lipoperoxidation remained at the level observed during water-restrained stress. It was shown the advantages of the use of H<sub>2</sub>S-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug ATB-346, which are associated with its cytoprotective effect of the drug manifested by a decreased total area of gastric damage. However, parameters of lipoperoxidation and NO-synthase system did not differ substantially from those in the group treated with naproxen, indicating the prevalence of parent molecule (naproxen) in regulation of function of NO-system. Administration of dual COX/LOX inhibitor, the compound 2A5DHT, caused a decrease of gastric damage as compared to the effect of naproxen. The activity of iNOS remained much higher than under condition of the naproxen action.

Key words: NSAIDs, stress, nitric oxide, gastric mucosa.

*D. Halytskyi National Medical University, Lviv, Ukraine*

### **REFERENCES**

1. Alejnikova TL, Rubtsova GV, Pavlova NA. Manuals for practical lessons in biochemistry. Moscow: Medicine; 1988:239 p.
2. Sklyarov AYa, Fomenko IS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, mechanisms of their action, peculiarities of use. Practical medicine. 2007; **14**(3): 123-132.
3. Sumbajev VV, Jasinskaja IM. The influence of DDT on the activity of nitric oxide synthase in liver, lungs and brain of rats. Modern problems of toxicology. 2000; **3**: 3-7.
4. Timirbulatov RA, Seleznev EI. Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing components of the blood and its diagnostic significance. Lab. Delo. 1981; **4**: 209-117.
5. Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. Journal of gastroenterology and hepatology. 2005; **20**: 332-339.
6. Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. ACTA BIOMED. 2007; **78**: 96-110.
7. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal. Biochem. 1971; **39**(2): 412-417.
8. Kwiecien S, Konturek PC, Sliwowski Z, Mitis-Musiol M, Pawlik MW, Brzozowski B, et al. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress. J. Physiol. Pharmacol. 2012; **63**(2): 143-151.
9. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. Arthritis Research & Therapy. 2008; **10** (2): 4.
10. Liu L, Cui J, Song Ch-J, Bian J-S, Sparatore A, Del Soldato P, Wang X-Yu, Yan Ch-D. H<sub>2</sub>S-Releasing Aspirin Protects against Aspirin-Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress. PLOS ONE. 2012; **7**(9): 46301.
11. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. Ann Rheum Dis. 2003; **62**: 501-509.
12. Mollace V, Muscoli C, Masini E et al. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. Pharmacol. Rev. 2005; **57**: 217-252.
13. Nasadyuk C, Sklyarov A. Thymohexin exhibits cytoprotective effect in experimental gastric lesions in rats both through the inhibition of inducible nitric oxide synthase and reduction of oxidative mucosal damage. Regulatory Peptides. 2013; **180**: 50-57.
14. Takagi KY, Kayuya Y, Watanabe K. Studies on drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcers in rats. Chem Pharm Bull. 1964; **12**: 465-472.
15. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). British Journal of pharmacology. 2010; **159**: 1236-1246.
16. Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GM. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. The FASEB Journal. 2007; **21**: 4070-4076.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького  
E-mail: biochemistry@meta.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 08.08.2013*

О.М. Олещук

## Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на біохімічні показники функціонального стану печінки щурів

*У досліджах на білих щурах-самцях показано, що повторне введення прекурсорів оксиду азоту L-аргініну, L-аргініну L-глутамату не змінює активності ферментів цитолізу, призводить до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелює з показниками системи антиоксидантного захисту, підвищення активності ферментів мітохондрій та зменшення ендотоксикозу. Блокування активності NO-синтази L-NAME спричиняє посилення ендотоксикозу, пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ферментів електронно-транспортної системи мітохондрій, активації процесів перекиснення мембранних ліпідів і зменшення резервів захисної антиоксидантної системи на тлі зниженого вмісту  $\text{NO}_2^-$  в крові та печінці.*

*Ключові слова: оксид азоту, печінка, L-аргінін, L-аргініну L-глутамат, L-NAME.*

### ВСТУП

Нині сформувалася наукова думка про оксид азоту як один із найважливіших медіаторів і регуляторів, що беруть участь у розвитку як фізіологічних, так і патологічних процесів в організмі людини [1]. Відомо, що ця біологічно активна молекула синтезується з амінокислоти L-аргініну за участю ферменту NO-синтази (NOS). За допомогою імуноферментної методики було показано, що обидві ізоформи ферменту, як  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна (ендотеліальна – eNOS), так і  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежна (індуцибельна – iNOS), наявні в печінці у фізіологічних умовах [2]. Гепатоцити були одними з перших типів клітин, для культури яких було виявлено здатність до синтезу NO в нормі [3, 4]. Тепер відомо, що майже всі типи клітин печінки, зокрема гепатоцити, купферівські, зіркоподібні й ендотеліальні клітини мають здатність його синтезувати [5]. У печінці NO бере участь у процесах мікроциркуляції, вазодилатації, апоптозу, проявляє антимікробну дію тощо [2, 4, 5]. Перетворюється NO з фізіологічного регулятора на токсичного агента в результаті його взаємодії з радикалом супероксид-аніона та утворен-

ні пероксинітриду, який, розпадаючись у процесі дифузії від місця утворення на OH і  $\text{NO}_2^-$ , буквально руйнує на своєму шляху різні біомолекули та біомембрани [2]. Тобто, з огляду на вищезазначене, можна зробити висновок, що NO проявляє як цитопротекторну, так і цитотоксичну дію. Незважаючи на велику кількість проведених досліджень, залишається не до кінця з'ясованою його значення в функціонуванні печінки. Одним із методів вивчення ролі системи L-аргінін – NO є застосування модуляторів його синтезу.

Метою нашого дослідження було вивчення біохімічних показників функціонального стану печінки на фоні введення прекурсорів та інгібітора синтезу оксиду азоту.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведено на базі лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів «ДВНЗ Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського». В експерименті використано 24 білих щурів-самців лінії Вістар масою 180–260 г. Тварини перебували у віварії з контрольованим темпе-



ратурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води. Роботу зі щурами виконували згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [6]. Як попередники синтезу ми використали L-аргінін (“Sigma”, США), який вводили по 25 мг/кг у вигляді 2,5%-го водного розчину [7], фармакопейний 4%-й розчин L-аргініну L-глутамату (L-A-L-Г; глутаргін, фармацевтична компанія “Здоров’я”, м. Харків) – по 45 мг/кг в еквімолярній дозі у перерахунку на L-аргінін [8]. N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME; “Oldrich. Chem. Co.”, Англія) вводили по 10 мг/кг у вигляді 1%-го водного розчину [7]. Для вивчення впливу модуляторів синтезу NO на функціональний стан печінки у здорових тварин досліджували речовини вводили інтраперитонеально раз на добу щоденно протягом 7 діб. Дослідження проводили на 8-му добу експерименту. Тварини контрольної групи отримували ідентичний об’єм ізотонічного розчину. В гомогенатах печінки визначали вміст ТБК-активних продуктів [9], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [10], вміст відновленого глутатіону (G-SH) [11], активність супероксиддисмутази (СОД) [12, 13], каталази [14], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [15], цитохромоксидази (ЦХО) [16], N-деме-

тилазну і р-гідроксилазну активність мікросом [15,17]. У сироватці крові – активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспаргатамінотрансферази (АсАТ) (за допомогою стандартних наборів реактивів „Фелісіт”), каталази [13], вміст ТБК-активних продуктів [8], церулоплазміну [17], стабільних метаболітів NO – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [18], сечовини (за допомогою стандартного набору реактивів „Фелісіт”), вміст молекул середньої маси (МСМ) [18]. Для розрахунків використовували комп’ютерну програму Microsoft Excel XP (США). Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Originpro 7.5.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після повторного 7-добового введення речовин із групи попередників синтезу NO – L-аргініну і L-A-L-Г ми не зафіксували зміни активності маркерних ферментів цитолізу гепатоцитів АлАТ та АсАТ (табл. 1).

Разом з тим при введенні досліджуваних речовин відмічено тенденцію до зростання вмісту сечовини в сироватці крові, що можна пояснити збільшенням кількості субстрату для аргіназного перетворення L-аргініну

Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові за умов введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)

Показник	Серія дослідів			
	Контроль	L-аргінін	L-A-L-Г	L-NAME
Аланінамінотрансфераза, ммоль/(л·год)	0,51±0,04	0,53±0,03	0,56±0,04	0,70±0,04*
Аспаргатамінотрансфераза, ммоль/(л·год)	1,80±0,19	1,77±0,17	1,98±0,16	2,35±0,19
Сечовина, ммоль/л	3,70±0,28	4,29±0,21	4,39±0,32	5,73±0,19*
Церулоплазмін, мг/л	238,44±3,44	261,04±9,40	265,42±12,54	274,17±8,81*
Молекули середньої маси, ум. од./л				
при λ=254 нм	0,27±0,01	0,25±0,01*	0,24±0,01*	0,33±0,01*
при λ=280 нм	0,42±0,01	0,38±0,02*р	0,37±0,02*	0,50±0,01*

Примітка. У цій і наступних таблицях \* достовірність відмінностей при P<0,05.

[20, 21], однак слід зазначити, що ці зміни не були достовірними і не виходили за межі фізіологічної норми для тварин [22].

Встановлено, що після введення L-аргініну та L-A-L-Г знижувався вміст у печінці ТБК-активних продуктів на 12,2 (P<0,05) і 12,6 % (P<0,05) та ГПЛ на 8,9 (P<0,05) і 14,5 % (P<0,05), зростала активність каталази на 24,8 (P<0,01) і 16,3 % (P<0,01) відповідно. Активність одного з антиоксидантних ферментів СОД підвищувалася на 19,6 % (P<0,05) при застосуванні L-аргініну та вірогідно не змінювалася при введенні L-A-L-Г. У сироватці крові знижувався вміст ТБК-активних продуктів на 12,7 та 11,8 % (P<0,05) за умов введення обох коригувальних агентів відповідно, каталазна активність крові дослідних тварин достовірно не змінювалася, проявляючи тенденцію до зростання. Вміст G-SH у печінці при введенні L-аргініну вірогідно не змінювався, а під впливом L-A-L-Г збільшувався на 8,8 % (P<0,05; табл. 2).

Встановлено, що при повторному введенні попередника NO – L-аргініну зростала активність ЦХО на 16,6 %, а активність СДГ мала лише тенденцію до підвищення. L-A-L-Г викликав вірогідне підвищення цього показника: СДГ на 16,3 % (P<0,01), ЦХО на 13,9 % (P<0,05; табл. 3). Повторне введення досліджуваних агентів вірогідно не змінювало активності цитохрому P450 2E1 та цхP450 3A, на що вказує відсутність змін N-демети-

лазної та р-гідроксилазної активності мікросом печінки (див. табл. 3).

Вивчали вплив прекурсорів оксиду азоту на вміст кінцевих метаболітів амінокислоти L-аргініну  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  при її оксидазному перетворенні [23]. Слід відмітити підвищення вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці на 19,7 % (P<0,01) та тенденцію до підвищення  $\text{NO}_3^-$ . Вміст нітрит- та нітрат-аніонів у печінці під впливом L-A-L-Г зростав на 17,8 % (P<0,01) та 31,0 % (P<0,05) відповідно, а у сироватці крові ці показники вірогідно не змінювалися (табл. 4).

Про зменшення проявів ендотоксикозу за умов введення досліджуваних речовин свідчить зниження вмісту МСМ<sub>1</sub> на 10,6 % (P<0,05) та 13,7 % (P<0,01), МСМ<sub>2</sub> на 9,0 % (P<0,05) та 11,6 % (P<0,05) відповідно при застосуванні L-аргініну та L-A-L-Г у порівнянні з контрольною групою тварин (див. табл. 1).

Таким чином, повторне введення прекурсорів оксиду азоту L-аргініну та L-A-L-Г спричиняло незначне збільшення вмісту кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту у печінці та стабільній відносно контролю концентрації цього показника в сироватці крові, не змінювало активності ферментів цитолізу, призводило до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелювало з показниками системи антиоксидантного захисту, зростання активності ферментів мітохондрій та не впливало на активність цитохрому P450 2E1 та P450 3A.

**Таблиця 2. Зміни показників ліпопероксидації та антиоксидантної системи за введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)**

Показник	Контроль	L-аргінін	L-A-L-Г	L-NAME
Гідроперекиси ліпідів, ум. од./кг	1,95±0,04	1,78±0,01*	1,63±0,08 *	2,43±0,10*
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг				
печінка	3,14±0,09	2,76±0,11*	2,74±0,07*	3,97±0,07 *
кров	2,18±0,09	1,90±0,04*	1,92±0,04*	2,92±0,07*
Каталаза				
печінка, кат/кг	4,25±0,10	5,31±0,16*	4,95±0,11 *	4,66±0,14
кров, кат/л	14,71±0,46	15,28±0,58	16,03±0,62	17,93±0,60*
Супероксиддисмутаза, ум. од./кг	4,73±0,17	5,65±0,31*	5,04±0,11	3,96±0,10*
Відновлений глутатіон, ммоль/кг	4,01±0,09	4,13±0,04*	4,36±0,05*	3,38±0,06*

**Таблиця 3. Показники системи мітохондріального транспорту електронів та детоксикаційної функції печінки за умов введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)**

Серія дослідів	Мітохондріальна фракція		Мікросомальна фракція	
	Сукцинат дегідрогеназа, ммоль/кг·хв	Цитохромоксидаза, ммоль/кг·хв	N-деметилазна активність, ммоль/кг·хв	p-гідроксилазна активність, ммоль/кг·хв
Контроль	8,54±0,15	5,91±0,18	8,25±0,23	0,77±0,02
L-аргінін	8,99±0,28	6,89±0,13*	8,69±0,16	0,76±0,02
L-A-L-Г	9,93±0,23 *	6,74±0,18*	8,47±0,18	0,79±0,01
L-NAME	6,96±0,21*	5,29±0,17 *	5,57±0,27 *	0,45±0,03 *

Вивчення функціонального стану печінки на тлі зміненої активності системи оксиду азоту показало важливе значення цієї молекули. Застосування блокатора синтезу NO в здорових щурів викликало негативний вплив на стан гепатоцитів та їх функції.

Так, при використанні L-NAME активність АлАТ, яку зазвичай розглядають як показник ступеня токсичного ураження печінки та пошкодження плазматичної мембрани, підвищувалася в плазмі крові на 37,7 % (P<0,05) порівняно з контрольною групою тварин. Активність іншого ферменту цитолізу – АсАТ проявляла лише тенденцію до підвищення. Значно збільшувався в сироватці крові вміст сечовини (на 55,1 %, P<0,001), що можна розцінювати і як результат активації пуринового обміну, і як активацію аргіназного шляху метаболізму L-аргініну на тлі повного блокування його оксидазного перетворення (див. табл. 1).

Застосування L-NAME призводить до підвищення активності процесів ліпопероксидації та змін у ферментній і неферментній ланках антиоксидантної системи. Встановлено, що

за умов введення препарату вміст церулоплазміну підвищувався на 15,0 % (P<0,01). Вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у печінці збільшувався: ГПЛ – на 24,8 % (P<0,01), ТБК-активних продуктів – на 26,5 % (P<0,001); у сироватці крові вміст ТБК-активних продуктів збільшився у 4,3 раза. Активність СОД у печінці знижувалася на 16,1 % (P<0,01), каталази у сироватці крові – на 21,9 % (P<0,01). Вміст G-SH був меншим на 15,8 % (P<0,001) порівняно з контрольною групою тварин (див. табл. 2).

На порушення процесу перенесення електронів у мітохондріях печінки за умов введення неселективного блокатора NOS вказувало зниження активності ферментів СДГ та ЦХО на 18,4 % (P<0,001) і 10,5 % (P<0,05; див. табл. 3). Погіршувалася детоксикаційна функція печінки, про що свідчить зменшення N-деметилазної та p-гідроксилазної активності мікросом на 32,4 та 41,6 % відповідно (P<0,001; див. табл. 3) та посилення явищ ендотоксикозу, на що вказує підвищення вмісту МСМ<sub>1</sub> та МСМ<sub>2</sub> на 21,6 і 19,5 % (P<0,001) відповідно (див. табл. 1). Вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> як у

**Таблиця 4. Вміст нітрит- та нітрат-аніона у сироватці крові та печінці тварин за введення попередників синтезу NO (M±m)**

Серія дослідів	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	кров, мкмоль/л		печінка, мкмоль/кг	
Контроль	3,68±0,13	7,89±0,50	1,75±0,04	8,42±0,88
L-аргінін	3,41±0,11	9,42±0,48	2,10±0,08*	10,63±0,32
L-A-L-Г	3,57±0,08	10,00±0,84	2,07±0,07*	11,03±0,40*
L-NAME	2,78±0,10*	6,26±0,58	1,37±0,04*	7,42±0,09

гомогенатах печінки, так і в сироватці крові знижувався на 24,5 % ( $P < 0,01$ ) та 21,8 % ( $P < 0,001$ ). Вміст  $\text{NO}_3^-$  в обох досліджуваних середовищах вірогідно не змінювався, хоча спостерігалася очевидна тенденція до його зниження (див. табл. 4).

Посилення ендотоксикозу, зниження активності цитохрому P450 3A та 2E1, що вказує на пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ЦХО та СДГ, яке можна розцінювати як часткову блокаду кінцевої ланки переносу електронів по дихальному ланцюгу, виснаження захисної антиокиснювальної системи глутатіону та активація процесів переокиснення мембранних ліпідів на тлі зниженого вмісту  $\text{NO}_2^-$  ймовірно свідчать про значні порушення метаболічних процесів у печінці внаслідок обмеження ефектів оксиду азоту через введення неселективного блокатора NOS.

## ВИСНОВКИ

1. Повторне введення прекурсорів NO спричинює зростання вмісту кінцевих продуктів метаболізму цього оксиду у печінці, не змінює активності ферментів цитолізу, призводить до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелює з показниками системи антиоксидантного захисту, зростання активності ферментів мітохондрій та вірогідно не змінює активність процесів детоксикації та зменшує прояви ендотоксикозу.

2. Блокування активності eNOS та iNOS за допомогою L-NAME призводить до посилення ендотоксикозу, пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ферментів електронно-транспортної системи мітохондрій, активації процесів переокиснення мембранних ліпідів і зниження резервів захисної антиокиснювальної системи на тлі зниженого вмісту  $\text{NO}_2^-$  в крові та печінці. Результати наших досліджень свідчать про протективну роль оксиду азоту у функціонуванні печінки.

**А.М. Олещук**

## ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

В опытах на белых крысах-самцах показано, что повторное введение прекурсоров оксида азота L-аргинина, L-аргинина L-глутамат не изменяет активности ферментов цитоллиза, приводит к снижению содержания продуктов липопероксидации, что коррелирует с показателями системы антиоксидантной защиты, повышению активности ферментов митохондрий и уменьшению эндотоксикоза. Блокирование активности NO-синтазы L-NAME является причиной усиления явлений эндотоксикоза, угнетения процессов детоксикации в печени, снижения активности ферментов электронно-транспортной системы митохондрий, активации процессов переокисления мембранных липидов и уменьшения резервов защитной антиокислительной системы на фоне пониженного содержания  $\text{NO}_2^-$  в крови и печени.

Ключевые слова: оксид азота, печень, L-аргинин, L-аргинина L-глутамат, L-NAME.

**O.M. Oleshchuk**

## THE IMPACT OF MODULATORS OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS ON BIOCHEMICAL INDICES OF LIVER IN RATS

In experiments on white male rats it was shown that repeated administrations of nitric oxide precursors L-arginine and L-arginine L-glutamate do not alter the activity of cytolysis enzymes, reduce lipid peroxidation that correlates with indices of antioxidant protection, increase enzymatic activity in mitochondria and reduce endotoxemia. NO-synthase blockade by L-NAME increases endotoxemia, inhibits detoxification process in the liver, reduces the activity of electron transport enzymes in mitochondria, activation of lipids peroxidation reducing protective reserves of antioxidant system that is accompanied by low levels of  $\text{NO}_2^-$  in blood and liver.

Key words: nitric oxide, liver, L-arginine, L-arginine L-glutamate, L-NAME.

*Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine*

## REFERENCES

1. Kolisnyk M, Kolisnyk V, Nidzulka Ye, Vlizlo V. Oxygen active forms and their role in cell metabolism. *Animal Biology*. 2009; **9**(1–2):59–70.
2. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; **Jan**; **87**(1):315–424.
3. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine

- in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med.* 1989 Nov 1; **170**(5):1769–74.
4. Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; **12**(4):588–94.
  5. Bondzyk O, Yanchuk P. Aminoacid L-arginine metabolism and its influence on liver. *Visnyk Cherkaskoho Universitetu, series – biological science.* 2011;204:8–11.
  6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Council of Europe, ETS No. 123, 1986 – conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm
  7. Oleshchuk O, Shevchuk O, Nikolaeva V. Influence of Nitric oxide synthesis modulators on the detoxication processes in liver. *Visnyk naukovykh doslidzen'.* 2012; **68**(3):94–7.
  8. Merculova U. Pharmacological investigation of l-arginine l-glutamate (glutargine) as hypoammoniumemic and hepatoprotective agent / PhD Thesis. Odessa, 2002.
  9. Andreeva L, Kozemyakin L, Kyshkun A. Modification of lipid peroxidation determination in test with TBA. *Lab. Delo.* 1988;11:41–3.
  10. Havrylov V, Mishkorudnaya M. Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides content in blood plasma. *Lab. Delo.* 1983;3:33–5.
  11. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82:70–7.
  12. Yeshchenko N, Volsky H. Determination of succinic acid and succinate dehydrogenase activity Methods of biochemical investigations. Leningrad; 1982.
  13. Chevare C, Chaba I, Sekeye I. Role of superoxide dismutase in cell oxidative processes and method of its determinations in biological substances. *Lab. Delo.* 1985;11:678–84.
  14. Koroluk M, Ivanova L, Mayorova I, Tokarev V. Method of catalase activity determination. *Lab. Delo.* 1988;1:16–9.
  15. Orekhovich V. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicina, 1977.
  16. Karusina I, Archakov A. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicina, 1977.
  17. Kolb V, Kamyshnikov V. Manual on clinical chemistry. Minsk: Belarus, 1982.
  18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131–38.
  19. Lifshic R, Valdman B, Volchehorsky I, Luzevyy A. The role of middle molecules in the development of blood kardiodepressii in thermal burns // *Bul. experim. biol. i med.* 1986; **101**( 3):280–82.
  20. Reutov V. Cycle nitric oxide in the body of mammals and cyclic principle. *Biochimia.* 2002; **67**(3):353–76.
  21. Morris S. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* 2009; **157**:922–30.
  22. Ananich I, Dercho M, Koncevaya S. Biochemical characteristics of the blood of rats. *Veterinarnaya klinika.* 2008; **77**(10):18–20.
  23. Magner S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* – 2006. – **10**(1): 208. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1550838/>.

*ДВНЗ «Терноп. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського  
МОЗ України»  
E-mail oleksandrao@ukr.net*

*Матеріал надійшов  
до редакції 09.12.2013*



О.А. Савченко, О.В. Вірченко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, Л.П. Бабенко,  
Л.М. Лазаренко, М.Я. Співак

## Розвиток експериментального ожиріння у щурів, викликаного дією глутамату натрію, на тлі введення пробіотиків

*Вивчали вплив суміші пробіотичних штамів (2:1:1 Lactobacillus casei IMVB-7280, Bifidobacterium animalis VKL, Bifidobacterium animalis VKB) на розвиток експериментального ожиріння у щурів, викликаного введенням глутамату натрію. Встановлено, що у чотиримісячних щурів, яким після народження вводили глутамат натрію (4 мг/г) на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя, було зафіксоване абдомінальне ожиріння та метаболічний синдром. Періодичне введення пробіотичної суміші щурам, що отримували глутамат натрію, попереджало розвиток ожиріння. В групі щурів, що отримували пробіотики, антропометричні показники (маса і довжина тіла, індекс Лі, індекс маси тіла) не відрізнялися від значень інтактних щурів. Маса вісцерального жиру при профілактиці пробіотиками зменшувалася на 38,5 % ( $P < 0,05$ ) порівняно зі щурами, яким вводили воду. Пробіотики покращували ліпідний обмін: зменшували вміст ліпопротеїдів дуже низької щільності на 32,2 % ( $P < 0,05$ ), ліпопротеїдів високої щільності – на 30,6 % ( $P < 0,05$ ), підвищували – ліпопротеїдів низької щільності на 25,7 % ( $P < 0,05$ ) щодо контрольних щурів з ожирінням. Пробіотичні штами відновлювали секрецію адипоцитарних гормонів (лептину та адипонектину) до значень інтактних тварин. Отримані результати свідчать про ефективність пробіотикотерапії для попередження ожиріння.*  
*Ключові слова:* ожиріння, глутамат натрію, пробіотики.

### ВСТУП

Обмін речовин є одним з найважливіших процесів для підтримання життєдіяльності і гомеостазу організму. Захворювання, пов'язані з порушенням обміну речовин, а саме: гіперліпідемія, діабет та ожиріння. Метаболічні розлади при ожирінні призводять до виникнення низки хвороб серцево-судинної системи, інсулінозалежного цукрового діабету, захворювань опорно-рухового апарату, хвороб гепатобіліарної системи, пухлин різних локалізацій, зокрема рак легенів, рак молочної залози, рак тіла матки і яєчника, передчасної смерті. Ожиріння зменшує тривалість життя на 3–5, а інколи при тяжких формах на 15 років [1, 2].

Нині ожиріння набуває характеру епідемії: близько 1,7 млрд. осіб на планеті мають

надмірну масу тіла. ВООЗ визнала ожиріння глобальною епідемією і взяла його під свій контроль. Тому пошук нових нетоксичних засобів профілактики розвитку ожиріння є найважливішим завданням сучасної науки. У науковій літературі активно дискутується питання впливу пробіотиків на жировий обмін та ожиріння [3–5]. Піонерами в дослідженні ролі мікрофлори товстої кишки у регуляції обміну речовин є Backhed зі співавт. [6]. Подальшими дослідженнями було показано, що мікрофлора кишечника змінюється у людей з надмірною масою тіла, і що мікробіоценоз кишки можна вважати екологічним чинником, який модулює розвиток ожиріння.

Встановлено, що тривале перебування на дієті з високим вмістом жирів істотно змінювало склад мікрофлори товстої кишки у мишей зі зниженням вмісту *Bifidobacte-*

*rium* і *Lactobacillus*, які, справляють багато фізіологічно позитивних ефектів, у тому числі поліпшують бар'єрну функцію слизової оболонки кишки, та збільшенням вмісту Firmicutes і Proteobacteria, продуктами метаболізму яких є багато токсичних речовин [7, 8]. Автори встановили, що додавання пребіотика олігофруктози до дієти з високим вмістом жирів призводило до відновлення вмісту біфідобактерій, усувало ендотоксемію та зменшувало розвиток ожиріння. Ці дані дають змогу припустити, що підвищення вмісту біфідобактерій може зменшити проникність кишечника та знизити рівень циркулюючого ендотоксину. Крім того, при зростанні кількості біфідобактерій збільшується чутливість до глюкози, посилюється секреція інсуліну, знижується приріст маси тіла і продукція прозапальних медіаторів [9–11]. Також у працях останніх років були встановлені позитивні ефекти пробіотичних бактерій на розвиток ожиріння. Так, застосування *Lactobacillus gasseri* SBT<sub>2055</sub> та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 попереджало розвиток дієтіндукованого ожиріння [10, 12]. Надмірне вживання жирів, хоча є і важливою причиною ожиріння, проте останнім часом вчені вважають, що безконтрольне використання харчових добавок, а саме посилювача смаку глутамату натрію (E621), теж є причиною надмірної маси [13].

Метою нашої роботи було дослідити вплив пробіотикотерапії на розвиток експериментального ожиріння у щурів, викликаного дією глутамату натрію.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 45 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Прилади, що використовувалися під час наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Новонароджені щури були розділені на 3 групи по 15 тварин в кожній. Тваринам

І контрольної групи вводили 8 мкл/г фізіологічного розчину. Щурам II та III груп підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили глутамат натрію (4 мг/г) на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя [14]. Впродовж 4 міс після народження щури знаходилися на звичайному харчовому раціоні. Тварини III групи отримували 2,5 мл/кг водного розчину суміші пробіотиків (2:1:1 *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB) у дозі  $5 \cdot 10^9$  КУО/кг (50 мг/кг; внутрішньошлунково). Щури II групи отримували внутрішньошлунково 2,5 мл/кг води. Введення починали через 4 тиж після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тиж. Впродовж 4 міс у щурів всіх груп було проведено аналіз змін маси тіла. Тварин декапітували, збирали кров у пробірки, видаляли та зважували вісцеральний жир. Вимірювали довжину тіла, розраховували індекс маси тіла (ІМТ) відношення маси тіла у грамах до квадрату довжини тіла у сантиметрах квадратних та індекс Лі (відношення кубічного кореня маси тіла у грамах до довжини тіла у сантиметрах).

Кров відстоювали не менше ніж 30 хв при 38°C і центрифугували 10 хв при 1000 g, після чого здійснювали відбір сироватки крові. В сироватці крові щурів визначали концентрацію адипонектину, а в жировій тканині – лептину методом імуноферментного аналізу. Жирову тканину розчиняли у буфері з розрахунку 4 мл буферу на 1 г жиру. Вміст холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), білірубину, активність аланін- та аспартатамінотрансферази у сироватці крові визначали за стандартними біохімічними методиками.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета програм Statistica 8. Для аналізу виду розподілу результатів був використаний W критерій Шапіро–Уїлка, а оскільки вони виявилися нормально розподіленими, то був застосований критерій

Левана, для оцінки рівності дисперсій, і критерій t Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M) і стандартне квадратичне відхилення (SD). Значущими вважали відмінності при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення глутамату натрію в неонатальному періоді призводило до розвитку ожиріння у 4-місячних щурів. В табл. 1 представлені антропометричні параметри в трьох групах щурів. Було встановлено, що через 4 міс у тварин, яким вводили глутамат натрію, маса тіла була виражено більшою порівняно з контрольними тваринами на 7,9 % ( $P < 0,05$ ). При цьому зменшувалася довжина тіла в групі щурів з експериментальним ожирінням на 5,4 % ( $P < 0,05$ ). Визначення ІМТ тіла та індексу Лі свідчать про розвиток ожиріння в цій групі тварин. Підтвердженням є значне збільшення маси вісцерального жиру у тварин, яким вводили глутамат натрію (в 6,83 раза;  $P < 0,001$ ). Отримані результати підтверджують дані інших дослідників, які встановили, що введення новонародженим гризунам глутамату натрію індукує розвиток вісцерального ожиріння у дорослих тварин та є моделлю ожиріння у гризунів [14].

При глутаматіндукованому ожирінні не спостерігалось функціональних змін печінки, що підтверджувалося визначенням концентрації в сироватці крові білірубину, альбуміну, активності аланін- та аспартатамінотранс-

ферази (табл. 2). Проте в крові тварин, яким вводили при народженні глутамат натрію, спостерігалися зміни ліпідного обміну, характерні для метаболічного синдрому. В групі тварин, яким вводили воду, реєструвати суттєве зростання концентрації загального холестерину в 1,55 раза ( $P < 0,001$ ), тригліцеридів – в 3,1 раза ( $P < 0,001$ ), ЛПДНЩ – в 3,1 раза ( $P < 0,001$ ), ЛПНЩ – в 1,83 раза ( $P < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою (табл. 3). Під впливом глутамату в крові знижувалася концентрація ЛПВЩ на 33,1 % ( $P < 0,001$ ).

Беручи до уваги літературні дані, що жирова тканина є активним секреторним органом і може моделювати розвиток ожиріння, нами було досліджено вміст адипоцитарних гормонів у щурів всіх груп. Аналіз секреторної функції жирової тканини показав їх зміну у щурів з експериментальним ожирінням, викликаним глутаматом натрію. Так, вміст адипонектину в сироватці крові щурів з глутаматіндукованим ожирінням зменшився в 2,43 раза ( $P < 0,01$ ). Отримані результати підтверджуються даними літератури, в яких показано, що цей показник знижений у людей з ожирінням та інсулінорезистентністю. Дослідження на макаках-резус, у яких моделювали ожиріння та цукровий діабет 2-го типу, підтвердило це твердження і продемонструвало, що вміст адипонектину знижується паралельно з прогресуванням таких патологічних станів [15, 16]. Scherer [17] вивів лінію трансгенних мишей з 3-кратним збільшенням вмісту адипонектину в сироватці крові. Для

**Таблиця 1. Антропометричні показники щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння та корекції пробіотиками (M±SD, n = 45)**

Показники	Інтактні щури	Щури з ожирінням	
		введення води	введення пробіотичної суміші
Маса, г	241,9±25,5	261±17,8*	256,7±27,7
Довжина тіла, см	21,4±0,9	20,3±1,6*	21,5±0,6##
Індекс маси тіла	0,53±0,05	0,64±0,08**	0,56±0,07
Індекс Лі	0,29±0,01	0,32±0,02*	0,30±0,01
Маса вісцерального жиру, г	2,53±0,78	17,31±5,69***	10,65±3,89***, ##

Примітка. Тут і в табл. 3 \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  порівняно з інтактними щурами; #, ##  $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$  порівняно зі щурами, яким вводили воду.

**Таблиця 2. Біохімічні показники печінки в сироватці крові щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння та корекції пробіотиками (M±SD, n = 45)**

Показники	Інтактні щури	Щури з ожирінням	
		введення води	введення пробіотичної суміші
Аланінамінотрансфераза, мккат/л	0,228±0,033	0,211±0,031	0,221±0,034
Аспартаттрансаміназа, мккат/л	0,389±0,034	0,377±0,041	0,392±0,044
Загальний альбумін, мкмоль/л	12,4±2,09	12,7±1,53	12,3±1,98
Білірубін, мкмоль/л			
непрямий	7,9±1,7	8,1±1,06	7,7±1,4
прямий	4,4±0,91	4,6±0,91	4,6±0,97

цієї моделі гіперадипонектинемії характерне підвищення чутливості периферичних тканин до інсуліну внаслідок покращення вуглеводного та ліпідного метаболізму, пов'язаного з активацією 5' АМФ-активованої протеїнкінази (АМПК) у печінці і експресії рецепторів, що активуються пероксисомним проліфератором  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) у вісцеральній жировій тканині. Ці тварини стійкі до розвитку інсулінорезистентності, індукованої прийомом дієти з високим вмістом жирів [17].

Лікування рекомбінантним адипонектином тварин з ожирінням призводить до зниження рівня гіперглікемії, вільних жирних кислот (ВЖК) у плазмі крові та покращує чутливість до інсуліну [18]. Активація PPAR $\gamma$  *in vivo* призводить до підвищення вмісту адипонектину в крові [19]. У мишей, нокаутних за геном адипонектину, спостерігається печінкова інсулінорезистентність паралельно зі зниженням терапевтичної відповіді на агоністи PPAR $\gamma$ . Це вказує на те, що адипонектин є важливим фактором, який забезпечує

PPAR $\gamma$ -опосередковане покращення чутливості до інсуліну [20].

Фізіологічна функція лептину полягає в попередженні розвитку ожиріння в умовах надлишкового надходження їжі в організм. Зниження його секреції при голодуванні є свого роду сигналом для підвищення поглинання енергії. При надмірному надходженні їжі в організм посилюється виділення тепла активуванням утворення енергії в бурому жирі. Цей процес регулюється генами, відповідальними за синтез мітохондріальних білків 1, 2 і 3-го типу. Ці білки роз'єднують окисне фосфорилування та регулюють швидкість термогенезу в організмі [21]. Аналіз концентрації лептину в жировій тканині у щурів, яким в неонатальному періоді вводили глутамат натрію, показав його збільшення на 74,7 % (P<0,01) порівняно з інтактними тваринами (рис. 1). При ожирінні підвищення вмісту лептину у сироватці крові спричинено резистентністю гіпоталамуса до центральної дії ліпоцитокіну за механізмами від'ємного

**Таблиця 3. Біохімічні показники ліпідного обміну в сироватці крові щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння та корекції пробіотиками (M±SD, n = 45)**

Показники	Інтактні щури	Щури з ожирінням	
		введення води	введення пробіотичної суміші
Тригліцериди, ммоль/л	1,15±0,27	3,53±0,57	2,91±0,72*
Загальний холестерин, ммоль/л	4,53±0,34	7,04±0,26**	4,72±0,37##
Ліпопротеїди, ммоль/л			
дуже низької щільності	0,51±0,12	1,58±0,26**	1,07±0,41*.,#
високої щільності	1,63±0,14	1,09±0,19**	1,37±0,11*.,#
низької щільності	2,37±0,22	4,35±0,29**	3,02±0,49*.,#

зворотного зв'язку чи дефектів транспортування через гематоенцефалічний бар'єр. Проте дія лептину на периферичні тканини зберігається, тому можна запідозрити наявність селективної лептинорезистентності. Резистентність тканин до лептину розвивається поступово, активуючи ріст жирової тканини [21]. Було доведено, що введення глутамату натрію викликає ураження в дугоподібному та вентромедіальному ядрах гіпоталамуса, викликаючи нечутливість до лептину та інсуліну, в результаті чого розвивається гіперлептинемія та гіперінсулінемія [22].

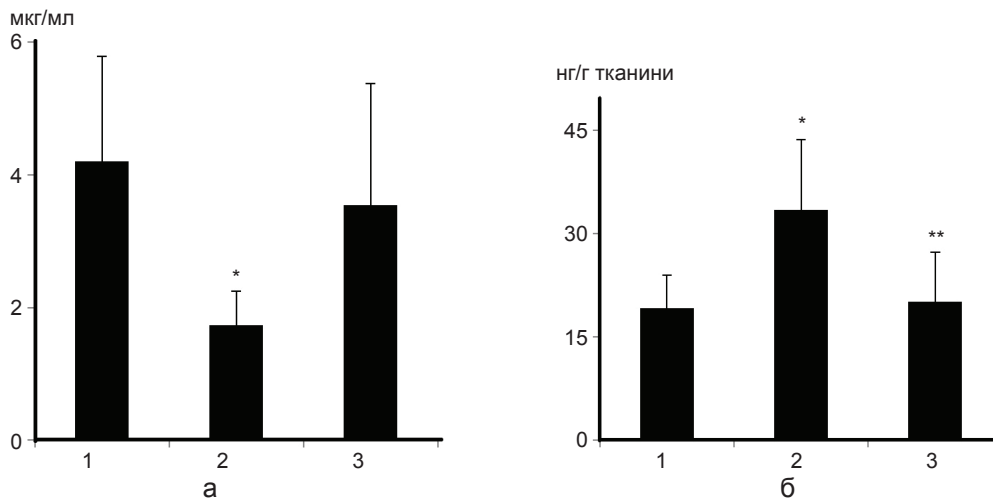
Пробіотикотерапія тварин, що отримували глутамат натрію (4 мг/г) на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя, попередила розвиток ожиріння у щурів. Так, у тварин, яким вводили пробіотичну суміш, збільшувалася довжина тіла на 6,1 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з тваринами, яким вводили воду, і не відрізнялася від групи контролю. Підтвердженням зменшення ожиріння було значне зменшення індексу Лі та маси вісцерального жиру.

Пробіотична суміш відновлювала ліпідний обмін у щурів. Особливо це впливало на вміст холестерину, який був відновлений до рівня інтактних щурів. У тварин, яким вводили пробіотичні штами, концентрація

ЛПДНЩ зменшувалася на 32,3 % ( $P < 0,05$ ), ЛПНЩ – на 30,6 % ( $P < 0,05$ ), а ЛПВЩ підвищувалася на 25,7 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з групою щурів, яким вводили воду. Ці показники не сягали рівня інтактного контролю (табл. 2).

Пробіотики сприяли нормалізації гормональної активності жирової тканини. Так, концентрація адипонектину та лептину не відрізнялася від значень інтактних щурів (див. рис. 1).

Таким чином, періодичне введення пробіотиків призводило до підвищення вмісту адипонектину в крові, зниження концентрації лептину в жировій тканині та відновлення антропометричних показників і показників ліпідного обміну у тварин, яким у неонатальному періоді вводили глутамат натрію. Отримані результати свідчать про ефективність пробіотикотерапії для попередження ожиріння, що узгоджуються з даними інших досліджень про гіпохолестеринемічну активність пробіотичних штамів молочнокислих бактерій родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, а саме *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKB та *B. animalis* VKL в дослідках *in vivo* на моделі експериментальної гіперхолестеринемії у мишей [23, 24].



Концентрація адипоцитарних гормонів (а – адипонектину у сироватці крові, б – лептину в жировій тканині) щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння та корекції пробіотиками: 1 – інтактні щури; 2 – щури з ожирінням, яким вводили воду; 3 – щури з ожирінням, яким вводили пробіотичну суміш. \* $P < 0,01$  порівняно з інтактними щурами; \*\* $P < 0,01$  порівняно зі щурами, яким вводили воду



## ВИСНОВКИ

1. За умов неонатального введення глутамату натрію у 4-місячних щурів розвивалося абдомінальне ожиріння та метаболічний синдром, що підтверджує небезпечність вживання цієї харчової добавки, особливо в дитячому віці.

2. Періодичне введення пробіотичної суміші щурам, що отримували глутамат натрію в неонатальному періоді, попереджало розвиток ожиріння, що свідчить про ефективність пробіотикотерапії для профілактики ожиріння.

**А.А. Савченко, А.В. Вирченко, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, Л.П.Бабенко, Л.М. Лазаренко, Н.Я. Спивак**

## РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ У КРЫС, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ГЛУТАМАТА НАТРИЯ, НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ

Изучали влияние смеси пробиотических штаммов (2:1:1 *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB) на развитие экспериментального ожирения у крыс, вызванного введением глутамата натрия. Установлено, что у четырехмесячных крыс, которым после рождения вводили глутамат натрия (4 мг/г) на 2, 4, 6, 8, 10-е сутки жизни, было зафиксировано абдоминальное ожирение и метаболіческий синдром. Периодическое введение пробиотической смеси крысам, получавшим глутамат натрия, предотвращало развитие ожирения. В группе крыс, получавших пробиотик, антропометрические показатели (масса и длина тела, индекс Ли, индекс массы тела) не отличались от уровня интактных крыс. Масса висцерального жира при профилактике пробиотиками уменьшалась на 38,5 % ( $P<0,05$ ) по сравнению с крысами, которым вводили воду. Пробиотики улучшали липидный обмен: уменьшали содержание ЛПОНП на 32,2 % ( $P<0,05$ ), ЛПНП – на 30,6 % ( $P<0,05$ ), повышали уровень ЛПВП на 25,7 % ( $P<0,05$ ) относительно контрольных крыс с ожирением. Пробиотические штаммы восстанавливали секрецию адипоцитарных гормонов (лептина и адипонектина) к показателям интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности пробиотикотерапии для предупреждения ожирения.

Ключевые слова: ожирение, глутамат натрия, пробиотики.

**O.A. Savchenyuk, O.V. Virchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, L.P. Babenko, L.M. Lazarenko, M.Ya. Spivak**

## THE EFFECT OF PROBIOTIC THERAPY ON DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL OBESITY IN RATS CAUSED BY MONOSODIUM GLUTAMATE

The effect of a mixture of probiotic strains (2:1:1 *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB) on the development of experimental obesity in rats induced by neonatal administration of monosodium glutamate has been studied. It was shown that in rats of 4 months age, the injection of monosodium glutamate (4 mg/g) at 2, 4, 6, 8, 10 days after birth elicited abdominal obesity and metabolic syndrome. An intermittent administration of a probiotic mixture to rats treated with monosodium prevented the development of obesity. In the group of rats treated with probiotics, anthropometric parameters (weight and body length, Lee index, body mass index) did not differ from the level of intact rats. Visceral fat mass was decreased by probiotics by 38,5 % ( $P<0,05$ ) compared to rats treated with water. Probiotics improved lipid metabolism: reduced the level of VLDL by 32,2 % ( $P<0,05$ ), the level of LDL by 30,6 % ( $P<0,05$ ), increased HDL by 25,7 % ( $P<0,05$ ) compared to obese control rats. Probiotic strains restored the secretion of adipocytes hormones (leptin and adiponectin) to the normal level of intact animals. The results show the effectiveness of probiotics for the prevention of obesity.

Key words: obesity, MSG, probiotics.

Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ;  
ТОВ «Діапроф»

*Taras Shevchenko National University;  
Zabolotnyi Institute of microbiology and virusology NAS of  
Ukraine, Kyiv.*

## REFERENCES

1. Ginsburg M. [Obesity and metabolic syndrome. Impact on health, prevention and treatment]. Samara: Parus; 2000.
2. Yang W, Kelly T, He J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev.* 2007;**29**:49-61.
3. Angelakis E, Bastelica D, Ben Amara A, El Filali A, Dutour A, Mege JL et al. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microb Pathog.* 2011 Jan;**52**(1):61-8.
4. Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Feb 8;**431**(2):258-63.
5. Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counseling

- during pregnancy on colostrum adiponectin concentration: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Early Hum Dev. Jun*; **88**(6):339-44.
6. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 2*; **101**(44):15718-23.
  7. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology. 2009 Nov*; **137**(5):1716-24 e1-2.
  8. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe. 2008 Apr 17*; **3**(4):213-23.
  9. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia. 2007 Nov*; **50**(11):2374-83.
  10. Fak F, Backhed F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One. 2012*; **7**(10):e46837.
  11. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr. 2010 Jun*; **64**(6):636-43.
  12. Luoto R, Kalliomaki M, Laitinen K, Isolauri E. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *Int J Obes (Lond). 2010 Oct*; **34**(10):1531-7.
  13. Leshchenko IV, Shevchuk VH, Falalieva TM, Bereгова TV. [The influence of long-term monosodium glutamate feeding on the structure of rats pancreas]. *Fiziol Zh. 2012*; **58**(2):59-65.
  14. Oida K, Nakai T, Hayashi T, Miyabo S, Takeda R. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. *Int J Obes. 1984*; **8**(5):385-91.
  15. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes. 2002 Feb*; **51**(2):536-40.
  16. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes. 2001 May*; **50**(5):1126-33.
  17. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology. 2004 Jan*; **145**(1):367-83.
  18. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab. 2002 Mar*; **13**(2):84-9.
  19. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes. 2001 Sep*; **50**(9):2094-9.
  20. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem. 2006 Feb 3*; **281**(5):2654-60.
  21. Dedov I, Balabolkin M, Mamaeva G, Klebanova E. [Insulin resistance and the role of hormones of adipose tissue in development of diabetes mellitus]. *A guide for doctors. 2005.*
  22. Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Exp Anim. 2000 Oct*; **49**(4):239-49.
  23. Starovoitova SA, Babenko LP, Timoshok NA, Shynkarenko LN, Lazarenko LN, Spivak NY. Cholesterol-lowering activity of lactic acid bacteria probiotic strains in vivo. *Mikrobiol Z. May-Jun*; **74**(3):78-85.
  24. Ooi LG, Liang MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci. 11*(6):2499-522.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;  
 Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного  
 НАН України, Київ;  
 ТОВ «Діапроф»  
 E-mail: ovirchenko@mail.ru*

*Матеріал надійшов  
 до редакції 12.08.2013*

В.А. Ковальова, А.Є. Шевченко, Л.І. Остапченко

## Дія природних антиоксидантів аммівіту та сквалену на вміст ліпідів, білків і вуглеводів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментального ульцерогенезу

*Досліджували ефекти природних антиоксидантів на вміст ліпідів, білків і вуглеводів клітин слизової оболонки шлунка щурів при експериментальному етаноліндукованому ульцерогенезі. Встановлено достовірне зниження вмісту нейтральних ліпідів і фосфоліпідів за умов моделі виразки шлунка та його підвищення при введенні антиоксидантних препаратів природного походження (аммівіту та сквалену). Також достовірно знижувався вміст основних вуглеводів глікопротеїнів (фукози втричі, галактози в 1,5 рази) і білкових фракцій з молекулярними масами у діапазоні 11–138 кДа; за умов введення аммівіту окремо та у комплексі зі скваленом значення цих показників нормалізувалися. Ключові слова: етаноліндукована виразка, слизова оболонка шлунка, аммівіт, сквален, галактоза, фукоза.*

### ВСТУП

Виразкова хвороба – найпоширеніше захворювання органів травлення [1, 2]. Лише в Україні загалом нараховується понад 4 млн. пацієнтів з виразковою хворобою шлунка [3]. Зловживання алкогольними напоями сприяє розвитку виразкової хвороби шлунка. Етанол є найзагальнішим ульцерогенним агентом, і коли інтрагастрально вводиться щурам, призводить до серйозних геморагічних ерозій. В основі патогенезу алкоголізму лежать глибокі зміни метаболізму, що спричинює порушення біогенезу, структури та функції клітин різних органів і систем [4].

Хоча в останні роки досягнуто значного прогресу у розвитку сучасної фармакології та створено широкий арсенал препаратів, лікування виразкової хвороби залишається проблемою сучасності. Тому пошук речовин, які були б ефективними при резистентних формах захворювання, проявляли б антиоксидантні та цитопротекторні властивості

при помірній антисекреторній активності є дуже важливим завданням. З урахуванням цього факту, доцільно використовувати у лікуванні такі антиоксидантні препарати [4–7] природного походження, як сквален і аммівіт.

Метою нашої роботи було дослідити дію природних антиоксидантів (аммівіту і сквалену) на вміст ліпідів, білків і вуглеводів слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів за умов експериментального етаноліндукованого ульцерогенезу.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 10 білих нелінійних щурах *Rattus norvegicus* обох статей масою 200 г. Їх утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення дослідів щури мали доступ лише до води [8].

В роботі були використані реактиви: НЕРЕС, додецилсульфат натрію, бичачий сироватковий альбумін (“Sigma”, США), фільтрувальний папір FN 23 (“Filtrak”, Ні-

меччина), етанол, інші реактиви та органічні розчинники (“Хімлаборреактив”, Україна).

Виразки моделювали введенням 1 мл етанолу у концентрації 80 % [9]. Перед розтином щурів піддавали цервікальній дислокації. Ізольовані клітини СОШ отримували за модифікованим методом Levin [10]. Розділення та кількісне визначення нативних білків здійснювали електрофорезом у поліакриламідному гелі [11], екстракцію ліпідів з клітин шлунка та визначення їх окремих фракцій – використанням тонкошарової хроматографії [12]. Вміст фукози – вуглеводного компонента СОШ – вимірювали спектрофотометрично [13, 14], визначення вмісту галактози проводили за методикою Handel [15]. Усі показники перераховано на 1 мг білка [16].

Препарати вводили щурам per os протягом 5 діб: сквален, розчинений в рослинній олії 1:10, по 20 мкл 3 рази на добу, аммівіт – по 100 мкл двічі на добу.

Експериментальні результати обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього значення, середнього квадратичного відхилення і середньої квадратичної похибки. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За етанолової моделі виразки встановлено зниження вмісту холестерину в 1,6 раза та ацилгліцеролів у 2,8 раза, водночас концентрація вільних жирних кислот (ЖК) зростала

у 3,8 раза відносно контролю (табл. 1). При застосуванні аммівіту не спостерігалось статистично достовірних змін порівняно зі значеннями у разі ульцерогенезу, тоді як комплексне додавання тваринам аммівіту та сквалену призводило до нормалізації вмісту холестерину та підвищувало вміст ацилгліцеролів в 1,9 раза щодо етанолової моделі виразки, концентрація ЖК знижувалась у 1,3 раза відповідно (див. табл. 1).

Можна припустити, що такі зміни вмісту ацилгліцеролів і ЖК за умов патології пов’язані з підвищенням активності клітинних фосфоліпаз ( $A_1$ ,  $A_2$  та C), котрі розщеплюють ацилгліцероли до гліцерину та ЖК. Імовірно, нормалізація вмісту холестерину за сумісного введення препаратів відбувається за рахунок участі сквалену у біосинтетичних процесах вищезазначеного ліпиду, оскільки він є довгою аліфатичною гідрофобною молекулою, що має високу здатність до вбудовування в клітинну мембрану, а також проміжним продуктом у реакціях біосинтезу холестерину.

Дослідження фосфоліпідного складу клітин СОШ щурів за умов етанолової моделі виразки показало зниження вмісту головних фракцій фосфоліпідів: фосфатидилхоліну в 2,5 раза і фосфатидилінозитолу в 1,5 раза щодо контролю (табл. 2). Також було виявлено зростання концентрації лізофосфатидилхоліну в клітинах СОШ щурів у 1,9 раза. Встановлені зміни можуть бути пов’язані з інтенсифікацією вільнорадикальних окисних реакцій насамперед перекисного окиснення поліненасичених ЖК, які входять до складу фосфоліпідів, і з активацією клітинних фосфоліпаз.

**Таблиця 1. Вміст (мкг/мг білка) нейтральних ліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Нейтральні ліпіди	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Холестерин	14,2±1,1	9,1±0,6*	10,3±0,8*	14,5±1,2**
Ацилгліцероли	463,2±36,5	165,5±12,7*	180,4±14,3*	318,8±24,5*,**
Жирні кислоти	164,6±12,5	629,4±50,3*	580,6±46,4*	491,2±38,3*,**

Примітка. Тут і в табл. 2–4 \* $P \leq 0,05$  різниці достовірні відносно контролю; \*\* $P \leq 0,05$  – етанолової моделі виразки.

**Таблиця 2. Вміст (мкг/мг білка) фосфоліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M±m; n=10)**

Фосфоліпіди	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Фосфатидилетаноламін	26,3±2,1	24,3±1,9	23,2±1,8	22,8±1,8
Фосфатидилхолін	69,0±5,4	28,1±2,2*	31,4±2,3*	50,9±4,0*,**
Лізофосфатидилхолін	2,0±0,1	3,7±0,3*	3,2±0,2*	2,3±0,2*,**
Фосфатидилінозитол	27,8±2,1	18,0±1,4*	21,1±1,6*	22,5±1,7*,**

Фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін синтезуються за однаковим шляхом. Зниження вмісту фосфатидилхоліну на фоні незмінності фосфатидилетаноламіну може пояснюватися порушенням процесу метилювання фосфатидилетаноламіну до фосфатидилхоліну в печінці. Зниження концентрації фосфатидилхоліну також, ймовірно, зумовлено пригніченням реакціювання лізофосфатидилхоліну та лізофосфатидної кислоти.

Зростання вмісту лізофосфатидилхоліну у разі виразкоутворення (див. табл. 2), можливо, пов'язано з активацією фосфоліпази A<sub>2</sub> внаслідок порушення транспортування Ca<sup>2+</sup> чи структурних перебудов мембран, які призводять до підвищення доступності мембранних фосфоліпідів до гідролізу цитозольною ізоформою ферменту. Зменшення концентрації фосфатидилінозитулу за ульцерогенезу може бути пояснено інтенсифікацією його деградації, яку, ймовірно, спричинено активацією Ca<sup>2+</sup>-фосфатидилінозитольного сигнального каскаду або інгібування синтезу фосфоліпиду.

При додаванні аммівіту не спостерігалось статистично достовірних змін вмісту фосфоліпідів порівняно зі значеннями за виразкоутворення, тоді як сумісне введення препаратів підвищувало вміст фосфатидилхоліну та фосфатидилінозитулу у 1,8 і 1,3 раза відповідно щодо значень при ульцерогенезі і знижувало вміст лізофосфатидилхоліну у 1,6 раза.

До основних компонентів СОШ також відносять сульфомуцинові фракції та вуглеводи глікопротеїнів, а саме: сіалові кислоти, гексозаміни, фукозу і галактозу. Дослідження

останніх років свідчать про те, що глікопротеїни беруть участь практично в усіх метаболічних процесах, оскільки входять до складу ферментів, гормонів, транспортних білків, антитіл, білків-рецепторів та інших біологічно активних речовин [17]. Особливо цікавим є вивчення ролі глікопротеїнів, які містяться на поверхні клітин і беруть участь у міжклітинних взаємодіях [18], їхнього зв'язку з процесами проліферації та розвитку тощо. Сьогодні є експериментальні роботи [19], які дають змогу стверджувати, що глікопротеїнам притаманна важлива біологічна функція у секреторних гранулах клітин шлунка.

Було встановлено [20], що N-зв'язані олігосахариди, які утримують залишки фукози і галактози, локалізовані у внутрішніх каналцях і тубуловезикулярній системі парієнтальних клітин, а також у їх гранулах. На поверхні клітин шлунка були виявлені N-зв'язані фукозилізовані олігосахариди, які створюють захисний слизовий бар'єр у шлунку [19].

Нами встановлено, що внаслідок дії етанолу знижується концентрація фукози у 3 рази та галактози у 1,5 раза порівняно з контрольними значеннями (табл. 3). За умов додавання аммівіту вміст цих вуглеводів у клітинах СОШ щурів сягав меж контрольних значень. Подібні результати спостерігались і за сумісного застосування досліджуваних антиоксидантів.

Зростання концентрації фукози і галактози при введенні препаратів може свідчити про збільшення продукції глікопротеїнів і мукопротеїнів, відновлення захисного



**Таблиця 3. Вміст (мкг/мг білка) фукози і галактози в клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M±m; n=10)**

Вуглеводи	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Фукоза	48,0±3,5	16,4±1,2*	47,9±3,6**	59,7±4,7**
Галактоза	54,5±4,3	36,2±2,7*	55,8±4,4**	67,8±10,9**

бар'єра СОШ, оскільки за даними літератури між концентрацією фукози у СОШ і рівнем секреції слизу існує пряма залежність [17].

При вивченні дослідження білкового складу клітин СОШ було встановлено як якісні, так і кількісні зміни білкового складу (табл. 4). Так, за умов виразкоутворення не виявлено фракцій білків з відносними молекулярними масами 138, 70, 38, 32, 30, та 28 кДа (див.табл. 4). Також зменшується вміст білкових фракцій з молекулярними масами 55, 16 та 11 кДа – у 2,5 раза щодо контролю. Загалом спостерігається зниження концентрацій білкових фракцій з молекулярними масами у діапазоні 11–138 кДа. У клітинах СОШ з'являється білкова фракція з відносною молекулярною масою 19 кДа, якої у контролі не виявлено. Після введення аммівіту встановлено часткове відновлення білкових фракцій (див. табл. 4) з відносними молекулярними масами 138 і 28 кДа і зникнення фракцій з масами 11 і 19 кДа. Відмічено зростання вмісту білкових фракцій з моле-

кулярними масами 55 та 16 кДа – у 1,5 та 1,4 раза щодо моделі виразки відповідно. При комбінованому додаванні препаратів (див. табл. 4) знову з'являються білкові фракції з відносними молекулярними масами 138, 70, 38 та 32 кДа.

Таким чином, можна зробити висновок, що комплексне застосування досліджуваних антиоксидантів природного походження сприяє відновленню вмісту ліпідів, білків та основних глікопротеїнів зв'язаних вуглеводів клітин СОШ.

**В.А. Ковалёва, А.Е. Шевченко, Л.И. Остапченко**

**ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ АММИВИТА И СКВАЛЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ, БЕЛКОВ И УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗЕ**

Исследовали эффекты природных антиоксидантов на содержание липидов, белков и углеводов клеток слизистой оболочки желудка крыс при экспериментальном этаноли-

**Таблиця 4. Вміст (мкг/мг білка) білків у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M± m; n = 10)**

Відносна молекулярна маса, кДа	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
138	135,1±9,7	0	70,1±5,5*	72,9±5,7*
70	7,5±0,5	0	0	0,6±0,1*
55	34,8±2,7	14,8±1,1*	21,7±1,6*,**	23,1±1,7*,**
38	6,1±0,4	0	0	5,2± 0,4*
32	10,8±0,8	0	0	2,0±0,1*
30	14,5±1,1	0	0	0
28	55,6±4,4	0	3,5±0,2*	0
19	0	2,4±0,1	0	0,8± 0,1**
16	159,9±12,7	64,0±5,1*	88,9±6,5*,**	87,2±6,7*,**
11	60,2±4,7	23,9±1,8*	0	0

дущированном ульцерогенезе. Определено достоверное уменьшение содержания нейтральных и фосфолипидов при моделировании язвы желудка и его повышение при введении антиоксидантных препаратов природного происхождения (аммивита и сквалена). Также достоверно снижалось содержание основных гликопротеинсвязанных углеводов (фукозы и галактозы) и белковых фракций с молекулярными массами в диапазоне 11–138 кДа; при введении аммивита отдельно и в комплексе со скваленом наблюдалась нормализация этих показателей.

Ключевые слова: этанолиндуцированная язва, слизистая оболочка желудка, аммивит, сквален, галактоза, фукоза.

**V.A. Kovalova, A. Y. Shevchenko, L.I. Ostapchenko**

### **EFFECTS OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON THE CONTENT OF LIPIDS, PROTEINS AND CARBOHYDRATES IN RAT'S GASTRIC MUCOSAL CELLS UNDER EXPERIMENTAL ULCERATION**

Effects of natural antioxidants on the contents of lipids, proteins and carbohydrates in rat's gastric mucosal cells under experimental ethanolinduced ulceration have been studied. A significant decrease in the contents of neutral and phospholipids was found under experimental ulceration and their increase was detected under addition of squalene and ammivit. Under ulceration we found a significant decrease of protein fractions with molecular weight within the range of 11-138 kDa, galactose and fucose contents. Following addition of squalene and ammivit, a normalization of these parameters was observed.

Key words: ethanol ulcer, gastric mucosa, ammivit, squalene, galactose, fucose.

*Taras Shevchenko National University, ESC "Institute of Biology", Kyiv, Ukraine*

#### **REFERENCES**

1. Vasylenko V.Kh., Hrebenev A.L., Sheptulyn A.A. [Ulcer disease]. M.: Medicine;1987. 285 p. Russian.
2. Smyrnov Iu.V., Osolpov V.N., Bylych Y.L. [Epidemiological aspects of the combination of hypertension and ulcer disease]. Ter. arkh. 1990;2:48-50. Russian.
3. Saenko V.F., Homoliako Y.V., Buryi A.N. [Features of associated with Helicobacter pylori infection stomach and duodenum diseases' diagnosis and treatment in the surgical clinic]. Klinichna khirurgiia. 2001;6:14-18. Ukrainian.
4. Shetty R., Kumar K.V., Naidu M.U.R., Ratnakar K.S.

- Effect of Gingko biloba extract on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. Indian J. of Pharmacology. 2000;32 (6):313-317.
5. Marhuenda U.E., Martin M.J. and Alarcon-de-Lastra C. Anti-ulcerogenic activity of aescine in different experimental models. Phytother. 1993;22 (7) :13-16.
6. Hemandez R., Munoz C., Montel Ruiz and Vazquez O. Martinez. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. Lab. Invest. 2000;80 (1) :1161-1169.
7. Jainu M. and Devi C.S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of Solanum nigrum (L.) on experimental ulcer models. Possible mechanism for the inhibition of acid formation. J. Ethnopharmacol. 2006;104 (10) :156-163.
8. Zapadniuk Y.P., Zapadniuk V.Y., Zakharyia E.A., Zapadniuk B.V. [Laboratory animals. Breeding, keeping, using in experiment]. K.: Vyshcha shkola;1983. 383 p. Russian.
9. Academician, prof. RAMN Yvashkyn V.T., prof. Rapoport S.Y., editors. [Gastroenterology directory of practical doctor]. M.: Sov. sport; 1999. 432 p. Russian.
10. Levin, G.G., Bulygin Th.V., Vishnyakov G.N. Coherent Oscillations Of The Molecular State Of Protein In Live Cells. Tsitologiya. 2005;47: 348-356.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
12. Kates M. Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, NY: North-Holland Pub. Co.American Elsevier;1972. p. 269-610.
13. Dische Z., Shettles L.B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for the determination. J. of Biol. Chemistry. 1948; 175 (2):595-603.
14. Uholev A. M., Yezuytova N. N. [Determination of invertase's and other disaccharidases' activity. Investigation of the digestive tract in humans]. L.: Nauka;1969. p.192-196.
15. Handel D.U., Kittlak W. Vergleichende Untersuchung zur Metodik der Bestimmung des eiwei gedundenen suckers. Z. Med. Labor. Techn. 1963; 4:163-169.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1). : 265-275.
17. Wallace J., Grander D. FASEB J.1996; 10: 731-740.
18. Elkins R. Miracle Sugars. Woodland Publishing; 2003.
19. Kolset S., Prydz K., Pejler G. Biochem. J. 2004; 379: 217-227.
20. Ogata M., Araki K., Ogata T. Histol. Histopathol. 1998; 13: 347-348.

*ННЦ "Ін-т біології" Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка*

*E-mail: decanat\_bf@univ.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 08.07.2013*

В.Г. Зеленюк, І.І. Заморський, О.М. Горошко

## Вплив статинів на розвиток ниркової недостатності у білих щурів

*В експерименті на щурах досліджена дія трьох статинів (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) на функцію нирок за умов гострої ниркової недостатності (ГНН) і встановлено ефективні дози, у яких вони найбільш виражено виявляють нефропротекторні властивості. Виявлено, що всі статини у різних дозах викликали відновлення функціональної активності нирок на тлі змодельованої рабдоміолітичної ГНН, проте у дозі 20 мг/кг відзначали найбільш істотне покращення основних показників функцій нирок: посилення діурезу на 32 %, швидкості клубочкової фільтрації на 90 %, зменшення протеїнурії більше ніж удвічі. При цьому активність креатинфосфокінази плазми крові тварин була всього на 14 % вища за значення інтактного контролю. Водночас у тварин із модельною патологією без застосування препаратів цей показник підвищувався на 141 %, що вказує на незначну міотропну активність статинів у обраному режимі введення. Отже, застосування дози 20 мг/кг є найбільш обґрунтованим з точки зору нефропротекторної ефективності та безпеки.*  
*Ключові слова:* гостра ниркова недостатність, статини, нефропротекція, креатинфосфокіназа.

### ВСТУП

Відомо, що при захворюваннях нирок, які супроводжуються розвитком ниркової недостатності, виникає також і гіперліпідемія. Доведено, що ці порушення можуть викликати прискорення прогресування ураження нирок [1]. У експериментальних дослідженнях встановлено, що збільшення споживання холестерину викликає гломерулосклероз, проліферацію мезангію та помірну протеїнурію у тварин з нормальною функцією нирок, а також посилює ураження клітин і протеїнурію у тварин із уже існуючими захворюваннями нирок. За результатами гістологічного дослідження тканини нирок при ушкодженні клубочків встановлено відкладення ліпопротеїнів в ендотеліальних і мезангіальних клітинах [2, 3].

Інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарилкоензим А-редуктази (статини) є ефективними в боротьбі з гіперхолестеролемією навіть на пізніх стадіях ниркової недостатності [4]. Гіполіпідемічний ефект статинів поєднується

із їх неліпідними (плейотропними) властивостями: антиоксидантними, протизапальними, імуномодулювальними і антитромботичними [2, 5]; та, на відміну від гіполіпідемічної дії, плейотропний їх вплив є швидкоплинним [6]. Враховуючи вищенаведене, можна припустити, що основні та додаткові ефекти статинів при нирковій недостатності можуть уповільнити порушення функції нирок і забезпечити її відновлення.

Метою нашого дослідження було встановлення нефропротекторної ефективності у різних статинів (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) та доз, у яких вони будуть найкраще виявляти нефропротекторні властивості на тлі експериментальної гострої ниркової недостатності (ГНН).

### МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 77 нелінійних ставтевозрілих білих щурах масою 140–180 г, які знаходились в умовах віварію з підтриманням постійної температури та вологості з вільним

доступом до води та їжі. Тварин розподілили на 11 груп ( $n=7$ ): I – контрольна (інтактні); II – неліковані тварини, у яких моделювали рабдоміолітичну ГНН введенням 50%-го розчину гліцеролу внутрішньом'язово у дозі 10 мл/кг [7]; з III по XI – тварини, яким вводили досліджувані препарати (аторвастатин, ловастатин та симвастатин) у дозах 10, 20 та 30 мг/кг відповідно. Для дослідження використовували різні статини, керуючись при цьому ступенем вираженості їх гіполіпідемічної дії [8]. Дозу 10 мг/кг обрали як базову для встановлення ефективної нефропротекторної на підставі літературних даних [9–11]. Препарати вводили одноразово внутрішньошлунково в 1%-му розчині крохмалю з розрахунку 1 мл суспензії препарату на 100 г маси тіла через 40 хв після моделювання ГНН. Для оцінки функціонального стану нирок на 24-ту годину експерименту за умов індукованого діурезу (внутрішньошлункове введення питної води в об'ємі 5 % від маси тіла) протягом 2 год збирали сечу. Після цього виводили тварин з експерименту декапітацією під тіопенталовим (80 мг/кг) наркозом для забору крові та нирок із дотриманням положень “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях” [12].

Концентрацію креатиніну в плазмі крові досліджували за методом Поппера у модифікації Мерзона, у сечі – за методом Фоліна [13], вміст білка в сечі – за реакцією за сульфосаліциловою кислотою [14]; рН сечі визначали на мікробіоаналізаторі “Radelkis” (Угорщина), вміст кислот та аміаку в сечі – титруванням [15]. Концентрацію іонів калію та натрію в сечі і плазмі крові оцінювали методом полум'яної фотометрії на “ФПЛ-1” (Україна) [15]. Вміст загального холестерину у плазмі крові визначали за ферментативним методом Schettler [16], а концентрацію  $\beta$ -ліпопротеїнів – турбодиметричним методом Бурштейна–Самая [17]. Активність креатинфосфокінази (КФК) вивчали за допомогою набору реактивів виробництва “Lachema” (Чехія) [18].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0. Оцінку нормальності їх розподілу виконували з допомогою тесту Шапіро–Уїлка. Оскільки більшість вибірок показників не відповідала критеріям нормального розподілу, для їх порівняння користувалися непараметричним критерієм Манна–Уїтні. Зміни вважали статистично значущими при  $P \leq 0,05$ . При проведенні кореляційного аналізу вибірок застосовували коефіцієнт кореляції Спірмена.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В умовах змодельованої патології встановили, що застосування статинів підтвердило їх гіполіпідемічну дію і призводило до вірогідного вираженого зниження вмісту загального холестерину та  $\beta$ -ліпопротеїнів у плазмі крові щурів та було дозозалежним (табл. 1). Найбільш ефективним виявився аторвастатин, який у дозі 20 мг/кг достовірно зменшував вміст загального холестерину на 42 %, а при підвищенні дози – на 44 %. Аналогічну тенденцію спостерігали стосовно вмісту  $\beta$ -ліпопротеїнів, причому введення аторвастатину, ловастатину та симвастатину у найвищій дозі призвело до зменшення вмісту атерогенних ліпідів на 28, 18 та 26 % відповідно. Згідно з одержаними результатами, досліджувані препарати можна розмістити в такому порядку зменшення ступеня їх гіполіпідемічної активності: аторвастатин, симвастатин, ловастатин.

Варто відзначити, що зміни показників ліпідного обміну при збільшенні дози статинів з 20 до 30 мг/кг були незначними та становили стосовно зменшення вмісту загального холестерину та  $\beta$ -ліпопротеїнів у середньому 3 та 5 % відповідно, водночас збільшення дози з 10 до 20 мг/кг становили 13 та 4 % відповідно. Отже, у дозі 20 мг/кг виявляється достатня гіполіпідемічна дія статинів, а при її підвищенні приріст ефективності виявився незначним.

Таблиця 1. Характеристика вмісту загального холестерину та  $\beta$ -ліпопротеїнів у щурів при введенні статинів у різних дозах ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

Група тварин	Загальний холестерин, мг/дл	$\beta$ -ліпопротеїни, ум.од
Інтактні тварини	62,36 $\pm$ 1,72	19,43 $\pm$ 1,38
Тварини з модельованою патологією	76,92 $\pm$ 5,57*	24,71 $\pm$ 1,01*
Тварини, яким вводили		
аторвастатин		
10 мг/кг	62,91 $\pm$ 3,27	21,14 $\pm$ 1,53
20 мг/кг	54,35 $\pm$ 4,49**	20,71 $\pm$ 1,89
30 мг/кг	53,30 $\pm$ 1,77**	19,29 $\pm$ 2,10**
ловастатин		
10 мг/кг	70,88 $\pm$ 4,1	21,50 $\pm$ 1,4
20 мг/кг	65,11 $\pm$ 5,06	21,07 $\pm$ 1,49
30 мг/кг	64,01 $\pm$ 3,93	20,93 $\pm$ 2,05
симвастатин		
10 мг/кг	69,78 $\pm$ 3,43	21,64 $\pm$ 1,46
20 мг/кг	64,84 $\pm$ 2,81	20,43 $\pm$ 2,14
30 мг/кг	61,81 $\pm$ 3,10**	19,67 $\pm$ 1,17**

Примітка. Тут і в табл. 2 \* $P < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями у нелікованих тварин.

Крім того, вірогідне збільшення вмісту  $\beta$ -ліпопротеїнів і загального холестерину у щурів з модельною нелікованою патологією порівняно з інтактними тваринами (загального холестерину – на 23 % та  $\beta$ -ліпопротеїнів – на 28 %) узгоджується з наведеними вище відомостями щодо ролі дисліпідемії, зокрема ретенційної гіперліпідемії, у розвитку патології нирок, що також підтверджується виявленим прямим кореляційним зв'язком між рівнем протеїнурії та вмістом  $\beta$ -ліпопротеїнів ( $r=0,62$ ; рис. 1а), а також загального холестерину ( $r=0,70$ ; рис. 1б).

Функціональний стан нирок тварин на 24-ту годину експерименту на тлі гліцеролової ГНН значно погіршився, що позначилося у щурів із модельною патологією зниженням швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) на 92 %, зменшенням діурезу на 45 %, збільшенням концентрації білка в сечі в 3 рази порівняно із інтактним контролем, порушенням іоно- та кислотнорегулювальної функцій нирок (див. табл. 2).

Застосування статинів сприяло покращенню роботи нирок і мало дозозалежний характер, причому зростання їхньої ефек-

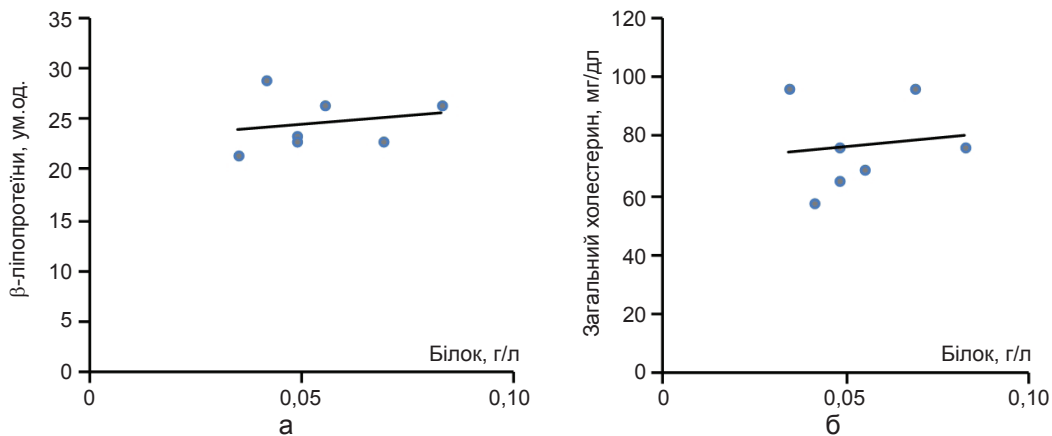


Рис. 1. Співвідношення вмісту  $\beta$ -ліпопротеїнів і білка (а) та вмісту загального холестерину і білка в сечі щурів (б)



Таблиця 2. Показники функціонального стану нирок щурів при введенні статинів у різних дозах (M±m, n=7)

Групи тварин	Діурез, мл/год	Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв	Концентрація креатиніну в плазмі крові, мкмоль/л	Концентрація білка в сечі, г/л	рН сечі	Екскреція, мкмоль/ год			
						титрованих кислот	амонію	іонів натрію	
Інгакні тварини	4,08±0,29	367,19±36,04	68,42±3,65	0,017±0,002	7,55±0,07	30,13±2,16	66,85±3,26	2,29±0,17	34,85±1,89
Тварини з моделюваною патологією Тварини, яким вводили агорвастатин	2,81±0,13*	190,93±17,76*	127,92±4,38*	0,054±0,006*	6,98±0,1*	37,16±3,32	45,26±3,91*	4,02±0,38*	40,72±1,19*
10 мг/кг	2,99±0,22	311,57±57,55	96,68±9,29**	0,027±0,005**	6,78±0,07	37,57±3,98	87,67±6,53**	1,75±0,15**	35,99±4,59
20 мг/кг	3,66±0,16**	378,13±28,25**	72,88±3,94**	0,023±0,004**	7,16±0,13	27,12±4,63**	99,50±9,08**	2,03±0,27**	33,04±2,28**
30 мг/кг	3,59±0,15**	348,05±23,77**	89,24±5,01**	0,038±0,005**	6,87±0,15	40,40±3,41	91,55±7,02**	1,45±0,13**	42,94±2,40
ловастатин									
10 мг/кг	3,01±0,11	301,32 ±21,45**	81,81±5,76**	0,036±0,005**	6,91±0,17	36,37±3,09	76,64±5,01**	1,79±0,15**	35,73±2,23
20 мг/кг	3,57±0,19**	347,49±26,31**	72,88±3,21**	0,030±0,006**	7,22±0,17	27,18±2,24**	62,87±2,49**	2,08±0,32**	33,88±2,23**
30 мг/кг	2,97±0,20	330,49±39,85**	75,86±8,72**	0,034±0,005**	6,85±0,13	37,13±4,94	73,59±8,25**	2,13±0,26**	40,27±3,05
симвастатин									
10 мг/кг	3,62±0,28**	323,21±51,31**	77,34±3,84**	0,035±0,003**	7,02±0,1	33,76±3,41	85,51±5,97**	2,81±0,27**	37,19±4,22
20 мг/кг	3,92±0,14**	362,31±31,07**	56,37±3,18**	0,021±0,003**	7,18±0,07	31,70±2,26	91,19±3,05**	2,89±0,18**	31,27±3,7**
30 мг/кг	3,75±0,19**	341,64±43,41**	73,77±2,83**	0,031±0,005**	7,11±0,15	30,41±2,24	69,54±5,08**	3,26±0,28	33,16±4,14

тивності відзначили у дозі 20 мг/кг. Так, при застосуванні аторвастатину у згаданій дозі діурез зростав найбільше – на 30 %, а при підвищенні дози – на 28 %. У групах тварин, яким вводили інші статини, зміни при збільшенні дози з 20 до 30 мг/кг були виражені яскравіше: ловастатин збільшував діурез на 27 та 6 % відповідно; симвастатин – на 40 та 33 % відповідно. Досліджувані препарати вірогідно збільшували ШКФ, причому спостерігалась аналогічна тенденція, наведена вище. Найбільш виражене зростання цього показника фільтраційної здатності нирок встановили при застосуванні аторвастатину, ловастатину, симвастатину у дозі 20 мг/кг на 98, 82 і 90 % відповідно. Концентрація креатиніну в плазмі крові під впливом препаратів вірогідно зменшувалася, хоча і була вищою, ніж у інтактного контролю. Зменшення протеїнурії спостерігали в усіх групах лікованих тварин. Найкращі показники при цьому відзначили при введенні статинів у дозі 20 мг/кг: симвастатину – у 2,6 рази, аторвастатину – у 2,4 рази, ловастатину – у 1,8 рази.

Застосування статинів мало незначний вплив на кислотнорегулювальну функцію нирок. Тенденцію до зростання рН відзначали у тварин, яким вводили статини у дозі 20 мг/кг. При аналогічному дозуванні аторвастатин і ловастатин вірогідно зменшували екскрецію кислот, що титруються, на 37 %. Значно кращою виявилася здатність препаратів до сприяння виведенню продуктів азотистого обміну,

причому екскреція амонію зросла на 81 % за значеннями усіх груп лікованих тварин.

При моделюванні ГНН внаслідок імовірного руйнування клітин нефрону детритом та міоглобіновими циліндрами збільшився вміст іонів калію в сечі та їх екскреція на 17 %. Застосування статинів у цілому мало калійзберігаючий ефект, сприяючи зменшенню екскреції іонів калію, що вірогідно проявлялося в групах щурів, яким вводили статини у дозі 20 мг/кг, та становило 24 %, дещо перевищуючи значення інтактного контролю. Екскреція іонів натрію зростала у тварин із нелікованою патологією на 75 % порівняно з інтактними тваринами, що можна пов'язати зі зменшенням реабсорбції іонів натрію внаслідок зниження ШКФ та тяжкого ушкодження каналців. Уведення статинів у згаданій дозі сприяло значному зменшенню втрати іонів натрію із сечею переважно при застосуванні аторвастатину у 2 рази і ловастатину у 1,9 рази.

Можна припустити, що приблизно однакова ефективність статинів, різних за силою антихолестеринемічної активності, у дозі 20 мг/кг пояснюється, ймовірно, різним ступенем прояву їх плеiotропних властивостей. Нижча ефективність статинів у вищій дозі (30 мг/кг) може бути зумовлена виснаженням фізіологічних процесів, завдяки яким препарати виявляють свою дію.

У лікованих статинами тварин досліджували активність КФК для вивчення дозозалежності міотропного впливу препаратів (рис. 2),

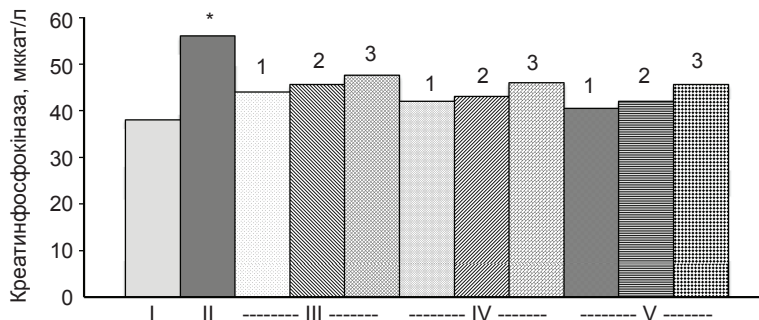


Рис. 2. Активність креатинфосфокинази у крові щурів при одноразовому застосуванні статинів на тлі міоглобінурічної гострої ниркової недостатності: I – група інтактних тварин, II – тварини із модельованою патологією, III–V – введення аторвастатину, ловастатину, симвастатину відповідно, 1–3 – введення статинів у дозах 10–30 мг/кг відповідно. \* $P < 0,05$  вірогідність різниці з контролем

за результатами чого встановили зростання активності КФК у тварин із модельною патологією у 1,5 раза пов'язано із травмуючим впливом гіпертонічного розчину гліцеролу на м'язову тканину щурів. Статини не призводили до значного збільшення активності КФК у порівнянні з контролем, проте спостерігалася дозозалежна тенденція до зростання цього показника. Таким чином, застосування статинів у дозі 20 мг/кг можна вважати безпечним при обраному режимі введення на тлі змодельованої патології, проте слід вивчити вплив препаратів на м'язову тканину при більш тривалому введенні.

## ВИСНОВКИ

1. Статини (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) проявляють нефропротекторну дію при міоглобінурічній формі гострої ниркової недостатності.

2. Аторвастатин, ловастатин, симвастатин виявляють найбільшу нефропротекторну активність у дозі 20 мг/кг в основному завдяки покращенню видільної функції нирок.

3. Встановлено пряму залежність між збільшенням дози статинів і підвищенням активності креатинфосфокинази, проте в умовах здійсненого експерименту не виявлено тяжкої міодеструктивної дії препаратів.

**В.Г. Зеленюк, И.И. Заморский, А.М. Горошко**

## ВЛИЯНИЕ СТАТИНОВ НА РАЗВИТИЕ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У БЕЛЫХ КРЫС

В эксперименте на крысах исследовано действие трёх статинов (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) на функцию почек в условиях острой почечной недостаточности и установлено нефропротекторная активность условно эффективных доз, в которых они наиболее выражено проявляют защитные свойства. Установлено, что все статины в разных дозах вызвали восстановление функциональной активности почек на фоне смоделированной рабдомиолитической острой почечной недостаточности, однако в дозе 20 мг/кг отмечали наиболее существенное улучшение основных показателей функций почек: увеличение диуреза в среднем на 32 %, скорости клубочковой фильтрации в среднем на 90%, уменьшение протеинурии более чем в 2

раза. При этом активность креатинфосфокиназы плазмы крови животных была всего на 14 % выше показателя интактного контроля. Вместе с тем у животных с модельной патологией уровень креатинфосфокиназы увеличивался на 141 %, что указывает на незначительную миотропную активность статинов в выбранном режиме введения. Таким образом, использование дозы 20 мг/кг является наиболее обоснованным с точки зрения нефропротекторной эффективности и безопасности.

Ключевые слова: острая почечная недостаточность, статины, нефропротекция, креатинфосфокиназа.

**V.G. Zeleniuk, I.I. Zamorskii, O.M. Goroshko**

## RENOPROTECTIVE EFFICACY OF DIFFERENT DOSES OF STATINS IN EXPERIMENTAL ACUTE RENAL FAILURE

The effect of three statins (atorvastatin, lovastatin, simvastatin) on the renal function under conditions of experimental acute renal failure in rats was studied. The relatively effective doses were found to possess the most considerable renoprotective properties. All the statins were established to cause the restoration of functional activity of the kidneys under conditions of experimental rhabdomyolytic acute renal failure at various doses, but with the dose of 20 mg/kg they showed the most significant improvement in key indices of kidney function: an increase in diuresis by an average of 32% and glomerular filtration rate by an average of 90%, reduction of proteinuria in more than twice. At the same time, in the animals with acute renal failure the level of creatine phosphokinase was increased by 141%. However, the activity of blood plasma creatine phosphokinase of all animals treated with statins was 14% higher than in the intact control, indicating the minor myotrophic activity of statins in selected mode of administration. Thus, the use of 20 mg/kg dose is the most reasonable from the standpoint of renoprotective efficacy and safety.

Key words: acute renal failure, statins, renoprotection, creatine phosphokinase.

*Bukovinsky Medical University, Ministry of Public Health, Ukraine*

## REFERENCES

1. D'Amico G. Statins and renal diseases: from primary prevention to renal replacement therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: S148-S152.
2. Epstein M., Campese V.M. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on renal function. *Am. J. Kidney Dis.* 2005; 45: 2-14.
3. Tonelli M. Do statins protect the kidney as well as the heart? *Cardiology rounds.* 2006; Vol. 10, Iss. 6: 171-173.
4. Navaneethan S.D., Pansini F., Perkovic V. et al. HMG CoA reductase inhibitors (statins) for people with chronic kidney disease not requiring dialysis (Review). *The Cochrane Library.* 2009; Iss. 3.

5. Atroshchenko E.S. Pleiotropic effects of statins: new aspects of the action of HMG-CoA reductase inhibitors. *Medical news*. 2004; 3: 59-66.
6. Nestic Z. Acute protective effects of different doses of simvastatin in the rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Acta Vet-Beograd*. 2008; Vol. 58, 5-6: 413-427.
7. Shtrygol S.Iu., Lisovyi V.M., Zupanets I.A. et al. Methods of experimental simulation of the kidney injury in the pharmacological studies: Methodological recommendations of the SPU of the HC of Ukraine. Kyiv; 2009. с. 9-10.
8. Law M.R., Wald N.J., Rudnicka A.R. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003; Vol. 326: 1-7.
9. Ozbek E., Cekmen M., Ilbey Y.O. et al. Atorvastatin prevents gentamicin-induced renal damage in rats through the inhibition of p38-MAPK and NF-kappaB pathways. *Ren. Fail*. 2009; 31(5): 382-392.
10. Issabeagloo E., Gharamaleki M.N., Kermanizadeh P., Abri B. Effect of lovastatin in prevention of renal lesions due to complete unilateral urethral obstruction in rats. *Am. J. Sci. Res*. 2012; 72: 89-98.
11. Jabbari M., Rostami Z., Jenabi A. et al. Simvastatin ameliorates gentamicin-induced injury in rats. *Saudi. J. Kid. Dis. Transp*. 2011; Vol. 22, Iss. 6: 1181-1186.
12. European convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. Strasbourg, 1986.
13. Riabov S.I., Natochin Iu.V. *Phunctional nephrology*. Saint Petersburg: Lan', 1997.
14. Mikheeva A.I., Bogodarova I.A. Methods of determining the total protein in the urine on the photoelectric colorimeter. *Lab. delo*. 1969; 7: 441-442.
15. Berkhin E.B., Ivanov Iu.I. *Methods of experimental study of the kidney and water-salt metabolism*. Barnaul; 1972.
16. Schettler G., Nussel E. Determination of triglycerides. *Arbeitsmed. Sozialmed. Chol. Praventiv. Med*. 1975; 10: 25.
17. Goriachkovskii A.M. *Clinical biochemistry*. Odessa: Astroprint; 1998.
18. Ueda I., Wada T. Determination of inorganic phosphate by the molybdovanadate method in the presence of ATP and some interfering organic bases. *Anal. Biochem*. 1970; Vol. 37, Iss. 1: 169-174.

*Буковин. мед. ун-т МОЗ України*  
*E-mail: vzeleniuk@gmail.com*

*Матеріал надійшов*  
*до редакції 07.10.2013*

Н.Ю. Селюкова, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренева, О.В. Сомова, Н.П. Смоленко,  
С.С. Почерняєва, Н.М. Бречка

## Фітоестрогенізація самців-щурів для соматостатевого розвитку та фертильності їхніх нащадків

*Досліджено наслідки вживання самцями-батьками впродовж 30 днів з їжею суміші рослинних фітоестрогенів у дозі 20 мг / кг щодо репродуктивної функції їх нащадків чоловічої статі, а також характер змін у останніх за умов додаткової фітоестрогенізації під час молочного вигодовування. Вживання батьком фітоестрогенів перед спаровуванням викликає фемінізацію нащадків, а саме аногенітальна відстань у самців при народженні була менша, ніж у інтактних тварин:  $2,7 \pm 0,1$  щодо  $3,1 \pm 0,0$  мм ( $P < 0,05$ ). Це, а також додаткова фітоестрогенізація народжених щурят, гальмують їх соматичний і статевий розвиток, призводять до послаблення статевої активності у дорослих і зменшення фертильності внаслідок погіршення запліднювальної здатності сперматозоїдів. Можливим механізмом цього може бути зменшення відносної андрогенізації за рахунок 3–4-кратного зростання вмісту естрадіолу. Виявлено більш значні наслідки для репродуктивної функції за умов додаткової фітоестрогенізації нащадків фітоестрогенізованого батька.*

*Ключові слова:* фітоестрогени, нащадки, статеве поведінка, сперматогенез.

### ВСТУП

Нині багатьма експериментальними та клінічними дослідженнями, результати яких узагальнені у змістовних оглядах, доведено негативні наслідки для статевої функції людини та тварин дії ксенобіотиків [1, 2]. Серед них важливе місце займають рослинні фітоестрогени (ФЕ) – ізофлавоноїди з естрогеноподібною активністю – за умов надходження їх надлишку з продуктами харчування. Вживання значної кількості ФЕ матір'ю під час вагітності призводить до порушень соматостатевого розвитку [3] та репродуктивної функції у нащадків чоловічої статі [4]. Водночас питання відносно значення надлишку ФЕ у раціоні батька для стану його нащадків не досліджено. Відомо, що функціональна активність системи відтворення нащадків змінюється внаслідок дії на батька у преко́нсумаційний період різних факторів: гіперандрогенізації [5], стресу [6], іонізуюче випромінювання [7], важких металів [8]. Ціл-

© Н.Ю. Селюкова, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренева, О.В. Сомова, Н.П. Смоленко, С.С. Почерняєва, Н.М. Бречка

ком можливо, що й надлишок ФЕ у раціоні самця може відігравати роль негативного фактора щодо соматостатевого розвитку та репродуктивної функції його нащадків.

Невисвітленим також є питання про вплив фітоестрогенізації батька у преко́нсумаційний період на чутливість його нащадків до дії такого ж чинника. Тим більше, що показано негативні наслідки експозиції до ФЕ у критичні періоди онтогенезу для статевої диференціації мозку самців з індукцією поведінкових розладів у дорослому віці [4]. Можливо, це може вплинути на реакцію нащадків на надлишок ФЕ у материнському молоці, змінюючи становлення та функціонування їх репродуктивної системи. Це питання є актуальним через поширення епідемії гіпогалакції та штучного вигодовування немовлят молочними сумішами, переважна більшість яких містить похідні сої.

Метою нашої роботи було визначення наслідків вживання ФЕ самцями-плідниками перед паруванням з самицею (у преко́нсума-



ційний період) для репродуктивної функції їх нащадків чоловічої статі, а також встановлення значення попередньої фітоестрогенізації батька для чутливості їх нащадків до дії сполук з естрогеновою активністю у критичний період онтогенезу (період молочного вигодовування).

## МЕТОДИКА

Робота виконана на дорослих щурах лінії Вістар та їх нащадках чоловічої статі з датованим народженням (день народження вважали за першу добу життя). Тварин утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні, рекомендованому раціоні та питному режимі *ad libitum*. Дослідження проводили відповідно до національних “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Україна, 2001) [9].

Самців батьківського покоління (Р<sub>0</sub>) впродовж 30 днів згодовували надлишком суміші ФЕ у дозі 20 мг / кг, після чого їх спарувували з інтактними самицями для одержання нащадків, які утворили групу Р<sub>0</sub>(ФЕ). Приблизно половина нащадків з 1-ї по 30-ту добу життя також отримувала надлишок ФЕ з молоком матері, якій у корм додавали таку ж суміш ФЕ і у такій самій дозі. Ці тварини увійшли у групу Р<sub>0</sub>(ФЕ)+ФЕ. За щурятами спостерігали до статевої зрілості, досліджували характер соматостатевого розвитку. У віці 6–7 міс у них вивчали статеву поведінку, стан сперматогенезу, плідність, вміст тестостерону та естрадіолу у сироватці крові, масу деяких внутрішніх органів.

Для моделювання аліментарного надходження надлишку ФЕ використовували харчову домішку Genistein Soy Complex isoflavone-rich («Soylife», США), відносний вміст ізофлавононів у якій (у перерахунку на індивідуальні аглікони) був: дайдзеїну 60 %, гліцитеїну 22 %, геністеїну 18 %. Дозу розраховували за так званим «геністеїновим еквівалентом» [10].

Соматостатевий розвиток тварин оцінювали за часом відлипання вушок, появи гене-

ралізованого волоссяного покриву, відкриття очей, прорізування зубів і опущення яєчок у мошонку, життєздатність – за часткою тварин, що залишилися живими на 30-ту добу життя. Контролювали також динаміку маси тіла.

Статеву поведінку самців досліджували у 15-хвилинному парному тесті з рецептивною самицею після оварієктомії у присмерковий час. Визначали кількісні та часові показники статевої поведінки. Для формування в самців стереотипних реакцій та отримання ними сексуального досвіду було проведено три поведінкових тести з самицями. Вихідний рівень статевої активності досліджуваних самців оцінювали за результатами четвертого тесту.

Фертильність самців-нащадків визначали за результатами парування з інтактними самицями. Самиць швидко декапітували на 20-ту добу вагітності, підраховували кількість жовтих тіл вагітності, місць імплантації та плодів. Визначали рівень пре-, постімплантаційних і сумарних внутрішньоутробних втрат у вагітних самиць, розраховували індекс запліднення та індекс вагітності.

Після виведення щурів з експерименту за допомогою декапітації визначали масу сім’яників, сім’яних пухирців, епідидимісів, вентральної частини передміхурової залози. Стан сперматогенезу оцінювали за концентрацією епідидимальних сперматозоїдів, їх рухливістю та відсотком патологічних форм [11].

Вміст гормонів у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою тест-наборів Estradiol ELISA EIA-2693 («DRG», США) та Стероид ИФА-тестостерон-01 («АлкорБио», Росія) на аналізаторі Stat FAX-3100.

Отримані результати наведені як середнє арифметичне ( $\bar{x}$ ), його похибка ( $\pm S_{\bar{x}}$ ) і їх порівнювали зі значеннями, отримані у інтактних тварин, народжених від інтактних батьків (контрольна група). Статистичну вірогідність відмінностей між групами розраховували використовуючи критерій t Стьюдента або  $\chi^2$  (у разі якісних порівнянь), які вважали значущими при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фітоестрогенізація самця-плідника позначилася на кількості нащадків у виводку. У гніздах не тільки кількість щурят була більшою порівняно з виводками контрольної групи:  $9,3 \pm 0,7$  щодо  $6,5 \pm 0,7$  плодів ( $P < 0,01$ ), але й новонароджених самиць серед них було більше на 60 %:  $5,3 \pm 0,5$  щодо  $3,3 \pm 0,5$  плодів ( $P < 0,01$ ). Таке явище може бути пояснене більшою життєздатністю плодів жіночої статі або заплідненням овоцитів переважно сперматозоїдами з хромосомою X [12].

Ознакою внутрішньоутробного статевого розвитку є аногенітальна відстань (АГВ). Так, у самців-нащадків групи  $P_0(\Phi E)$  вона при народженні була менша, ніж у інтактних тварин:  $2,7 \pm 0,1$  щодо  $3,1 \pm 0,0$  мм ( $P < 0,05$ ), що може свідчити про фемінізуючу дію преко-сумаційного введення ФЕ.

Надалі нащадки цієї групи були розподілені порівну і половина їх додатково отримувала ФЕ з молоком матері (група  $P_0(\Phi E) + \Phi E$ ). За перший місяць спостереження життєздатність щурят дослідних груп (відсоток загиблих у гнізді) не відрізнялася від контролю. У щурят групи  $P_0(\Phi E)$  перебіг соматичного розвитку не порушувався, але додаткова фітоестрогенізація у групі  $P_0(\Phi E) + \Phi E$  прискорила появу вторинного волосяного покриву та затримала відкриття очей.

Аналіз динаміки маси тіла нащадків, яка вважається інтегральним показником фізичного стану, показав, що у самців груп  $P_0(\Phi E)$  та  $P_0(\Phi E) + \Phi E$  маса тіла була меншою, ніж у

самців контрольної групи, починаючи з 60-ї доби життя ( $P < 0,01$ ; рис. 1). Це відставання (на 14–15 %) спостерігалось й у 6-місячних щурів. Така затримка соматичного розвитку, можливо, викликана здатністю ФЕ гальмувати синтез білка [13], змінювати експресію генів білків у печінці, які регулюють метаболізм жирних кислот і тиреоїдних гормонів [14]. Крім того, у тварин обох груп статеве дозрівання за часом опущення яєчок запізнювалося порівняно зі щурами контрольної групи:  $24,0 \pm 0,3$  щодо  $22,6 \pm 0,4$  доби ( $P < 0,01$ ).

У самців-щурів груп  $P_0(\Phi E)$  та  $P_0(\Phi E) + \Phi E$  (рис. 2) виявлені зміни у статевій поведінці, які полягали, по-перше, у зменшенні частки самців, які демонстрували повноцінний статевий акт. Так, у самців групи  $P_0(\Phi E)$  еякуляція спостерігалася у однієї тварини з десяти (у контролі – 100 %;  $P < 0,001$ ), жодна тварина не розпочинала другу серію парубань (у контролі – 22 %). За умов додаткової фітоестрогенізації (група  $P_0(\Phi E) + \Phi E$ ) еякуляції спостерігалися у 9 самців з 10, хоча деякі теж не встигали за час тесту розпочати другу серію копуляцій. По-друге, варто відмітити гальмування статевих реакцій у дослідних самців, що проявлялося зростанням майже втричі латентності перших садок та інтромісій ( $P < 0,05$ ) при статистично значущому зменшенні їх кількості. Ці результати узгоджуються з даними наших попередніх досліджень про вплив екзогенної фітоестрогенізації тварин різного віку на їх статеву поведінку [15].

При дослідженні плідності самців дослідних груп індекс запліднення становив 90,9 та

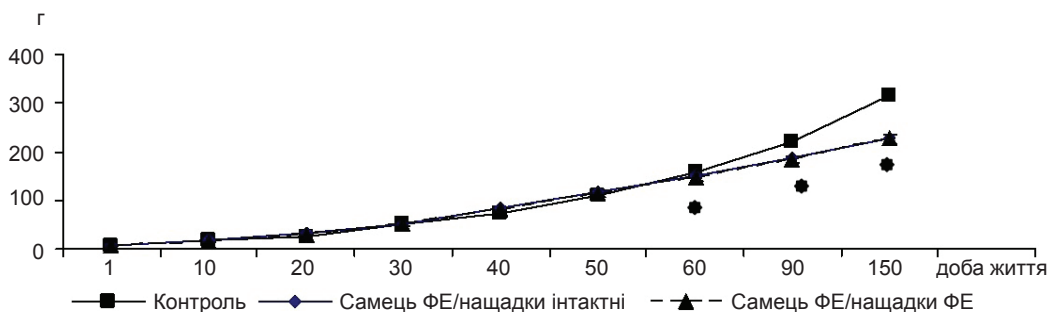


Рис. 1. Динаміка маси тіла самців-нащадків фітоестрогенізованого батька.

\* статистично вірогідні відмінності від контролю ( $P < 0,05$ )

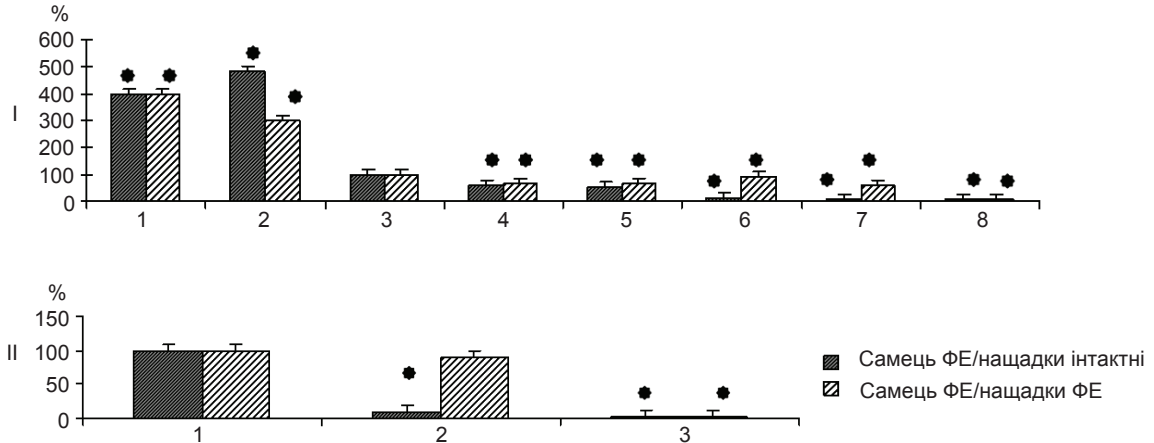


Рис. 2. Статеве поведінка самців-нащадків отриманих від фітоестрогенізованого батька. За 100 % прийняті дані контрольної групи; I – показники статевої поведінки за 15-хвилинний тест, 1 – латентність садки (с), 2 – латентність інтромісії (с), 3 – латентність еякуляції (с), 4 – кількість садок, 5 – кількість інтромісій, 6 – кількість еякуляцій, 7 – кількість інтромісій до першої еякуляції, 8 – тривалість постеякуляторного інтервалу (с); II – кількість тварин з наявністю окремих елементів статевої поведінки: 1 – садки та інтромісії; 2 – еякуляції, 3 – друга серія копуляцій. \* статистично вірогідні відмінності від контролю (P < 0,05)

100 %, що не відрізнялося від контрольних значень, але індекс вагітності знижувався і дорівнював 60 (група Ро(ФЕ)) та 75 % (група Ро(ФЕ)+ФЕ) відповідно порівняно зі 100,0 % у контрольній групі (P < 0,05). Перебіг вагітності у самиць (за внутрішньоутробними втратами) в обох групах не порушувався.

Аналіз спермограм показав, що фітоестрогенізація батька не вплинула на сперматогенез у нащадків групи Ро(ФЕ). Водночас у нащадків групи Ро(ФЕ)+ФЕ виявлено зниження рухливості сперматозоїдів (на третину) порівняно зі значеннями контрольної групи та збільшена частка патологічних форм

клітин порівняно з самцями групи Ро(ФЕ) (P < 0,01).

Наслідки зміни темпів і характеру соматостатевого розвитку проявилися у динаміці масових коефіцієнтів внутрішніх органів. Так, у нащадків групи Ро(ФЕ), абсолютна маса передміхурової залози була вірогідно нижчою на 27 % (табл. 1). У нащадків групи Ро(ФЕ)+ФЕ зменшилась абсолютна маса сім'яних пухирців (на 29 %), придатків сім'яників (на 14 %) та передміхурової залози (на 37 %) порівняно з інтактними щурами (P < 0,05). При порівнянні самців груп Ро(-ФЕ) та Ро(ФЕ)+ФЕ було знайдено вірогідне

Таблиця 1. Маса тіла та абсолютна маса органів самців-нащадків фітоестрогенізованого батька ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Маса	Контроль (n=11)	Батько ФЕ / нащадки інтактні (n=14)	Батько ФЕ / нащадки ФЕ (n=15)
Тіло, г	322,3±8,8	277,9±6,2*	275,3±11,3*
Сім'яники, мг	3495,4±128,1	3459,3±143,5	3374,7±191,6
Придатки сім'яників, мг	1260,5±64,3	1190,7±58,6	1084,3±54,6*
Сім'яні пухирці, мг	663,5±75,5	556,9±47,3	471,5±50,1*
Вентральна частина передміхурової залози, мг	620,9±59,6	452,3±46,5*	393,5±48,9*

Примітка. Тут і в табл. 2: \* статистично значущі відмінності від контрольної групи (P < 0,05).

Таблиця 2. Вміст гормонів у сироватці крові самців-нащадків фітоестрогенізованого батька ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Маса	Контроль (n=9)	Батько ФЕ / нащадки інтактні (n=13)	Батько ФЕ / нащадки ФЕ (n=8)
Естрадіол, пмоль/л	30,1±6,0	129,8±23,6*	106,2±7,9*
Тестостерон, нмоль/л	22,2±4,6	26,8±4,5	15,7±3,9
Тестостерон / естрадіол, ум. од.	806,2±147,1	341,9±103,3*	168,0±52,7*

підвищення маси гіпофіза на 15 %:  $3,0 \pm 0,1$  щодо  $3,5 \pm 0,1$  мг/100 г ( $P < 0,05$ ).

Спрямованість гормональних змін була однаковою в обох дослідних групах. Хоча вміст тестостерону у них не відрізнявся від контролю, але концентрація естрадіолу зростала у 3–4 рази порівняно з інтактними щурами, що може вказувати на посилення ароматазної активності або зменшення активності  $5\alpha$ -редуктази внаслідок дії ФЕ (табл. 2). Більше того, співвідношення вмісту цих гормонів було нижчим в обох групах, що вказує на відносну гіперестрогенію.

Таким чином, вплив естрогеноподібних речовин проявляється не тільки за умов надходження у критичні періоди ембріонального та постнатального періодів, а й, навіть, при дії на статеві клітини батьків. Швидше за все, спостерігається вплив ФЕ на ДНК сперматозоїдів батька на епігенетичному рівні, що можливо пов'язано зі зміною процесів метилювання нуклеїнових кислот. Адже мутагенна дія чинника проявилася б зростанням внутрішньоутробних втрат у вагітних самиць. Тим більше, що для геністеїну максимально безпечна доза для них становила 100 мг/кг [16], що в 5 разів більше, ніж у нашому досліді.

## ВИСНОВКИ

1. Надлишок ФЕ у раціоні батька в преко́нсумаційний період викликає народження більшої частки нащадків жіночої статі у запліднених ними інтактних самиць. Потомки чоловічої статі фітоестрогенізованого батька фемінізовані та відрізняються затримкою статевого дозрівання.

2. Порушення репродуктивної функції нащадків фітоестрогенізованого батька полягають у послабленні статевої поведінки, зменшенні індексу вагітності у запліднених ними самиць, які супроводжуються змінами гормонального фону, що полягають у відносній гіперестрогенії.

3. Преко́нсумаційне вживання ФЕ не тільки змінює соматичний і статевий стан особини, але й відображається на наступній реактивності до цього чинника у нащадків у період молочного вигодовування, викликаючи більш виражене зниження репродуктивного потенціалу останніх.

**Н.Ю. Селюкова, Н.А. Карпенко, Е.М. Коренева, Е.В. Сомова, Н.П. Смоленко, С.С. Почерняева, Н.М. Бречка**

## ФИТОЕСТРОГЕНИЗАЦИЯ САМЦОВ-КРЫС ДЛЯ СОМАТОПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ И ФЕРТИЛЬНОСТИ ИХ ПОТОМКОВ

Исследованы последствия употребления самцами крыс в течение 30 сут с кормом смеси растительных фитоэстрогенов в дозе 20 мг/кг для репродуктивной функции их потомков мужского пола, а также характер изменений у последних при условии дополнительной фитоэстрогенизации при молочном вскармливании. Найдено, что фитоэстрогенизация отца вызывает феминизацию его потомков, а именно аногенитальное расстояние у самцов при рождении было меньше, чем у интактных животных  $2,7 \pm 0,1$  против  $3,1 \pm 0,0$  мм ( $P < 0,05$ ). Это, а также дополнительная фитоэстрогенизация родившихся крысят тормозит их соматическое и половое развитие, приводит к ослаблению половой активности у взрослых, уменьшению плодовитости из-за ухудшения оплодотворяющей способности сперматозоидов. Возможным механизмом этого может быть уменьшение относительной андрогенизации за счет 3–4-кратного роста содержания эстрадиола. Выявлено более значительные последствия для репродуктивной функции в условиях дополнительной фитоэстрогенизации потомков фитоэстрогенизованого отца.

Ключевые слова: фитоэстрогены, потомки, половое поведение, сперматогенез.

**N.Yu. Selyukova, N.O. Karpenko, E.M. Koreneva, O.V. Somova, N.P. Smolyenko, S.S. Pochermyayeva, N.M. Brechka**

### **THE IMPACT OF MALE PHYTOESTROGENIZATION ON THE SOMATO-SEXUAL DEVELOPMENT AND FERTILITY OF THE OFFSPRINGS IN RATS**

The effect of phytoestrogen-rich diet administered to male rats in a dose 20 mg / kg of body weight for 30 days with the mixture of phytoestrogens on reproductive function of male offspring and the effect of additional phytoestrogenization during milk feeding have been investigated. It was shown that male phytoestrogenization leads to feminization of the offsprings. Specifically, at birth, the ano-genital distance in males was less than that measured in control rats: (2,7 ± 0,1) vs (3,1 ± 0,0) mm (P <0,05). This and additional phytoestrogenization of newborn rats during milk feeding inhibit their somatic and sexual development, weakening sexual activity in adults and reducing fertility at the expense of decreased fertilizing capacity of sperm. A possible mechanism for the observed effects may be a reduction of relative androgenization due to increased of estradiol concentration by 3-4 times. Analysis of the data revealed a significant impact of phytoestrogens in father's diet on reproductive function of their offsprings under conditions of additional phytoestrogenization after birth. Key words: phytoestrogens, descendants, sexual behavior, spermatogenesis.

*SI « V Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv*

#### **REFERENCES**

1. Koreneva EM, Karpenko NA. Phytoestrogens. Influence on the reproductive system. *Problems Endocrine Pathology* 2007; **3**:87-95.
2. Wigle D, Arbuckle T, Tuner M. Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev* 2008; **11**(5-6):373-517.
3. Shepelskaya NR, Prodanchuk MG. Soy phytoestrogens and their anti-androgenic action. *Problems harch* 2010; 3-4:26-31.
4. Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. Expisure to Genistein during Gestation and lactation demasculinized the reproductive system in rats. *J Urol* 2003; **169**(4):1582-6.
5. Gladkova A, Zolotukhina V, Klimova A. Features consequences of hyperandrogenism of a parent for a offspring. *Endocrinology* 2001; 6:6.
6. Chistyakova EE. Features of reproductive disorders of male offspring received from male rats that have had stress. Thesis fundamental and Clinical endocrinology: problems, achievements and perspectives (7th Danilevsky reading), Kharkov, 21-22 February. p. 144-5.
7. Karpenko NA, Chub N, Bryzgalova G. Effect of long-term low-dosage of irradiation of germ cells in male gametogenesis postmeyotychniy phase of spermatogenesis in their offspring. *UJ of Radiology* 2000; 8:73-76.
8. Hu WY, Wu SH, Wang LL. A toxicological and epidemiological study of reproductive functions of male workers exposed to lead. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol* 1992; **36**(1):25-30.
9. General ethical principles of animal experimentation. *Endocrinology* 2003; **8**(1):142-5.
10. Gladkova AI Yaremenko FG, Nikishina LE, Kravchenko SV. Study of the composition of soy product Genistein Soy Complex using chromatographic methods. Thesis conference Kharkiv, 3-4 March. 2011 p. 29-30.
11. Byshovets TF. Experimental study embryotoxic action of medicines: methodological recommendations. *Preclinical studies of medicines*; 2001.
12. Vorobyova OA, Leontyeva OA, Korsak VS. Effect sperm morphology on of fertilization frequency and early embryonic development disorders. *Cytology* 1996; **38**(2):1248-54.
13. Rehfeldt C, Kalbe C, Nürnberg G, Mau M. Dose-dependent effects of genistein and daidzein on protein metabolism in porcine myotube cultures. *J Agric Food Chem* 2009; **57**(3):852-7.
14. Simmen FA, Mercado CP, Zavacki AM, Huang SA, Greenway AD, Kang P, Bowman MT, Prior RL. Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. *J Nutr Biochem* 2010; **21**(11):1106-13.
15. Smolyenko NP, Gladkova AI Karpenko N. Deleted consequences of phytoestrogens in different age periods for a sexual behavior of male rats. Thesis scientific and practical Conference «Achievements and Prospects of Experimental and Clinical Endocrinology» (9th Danilevsky reading), Kharkiv, 2-3 March. 2010 p.122-3.
16. McClein RM, Wolz E, Davidovich A. Reproductive safety studies with genistein in rats. *Food. Chem. Toxicol* 2007; **45**(8):1319-32.

*ДУ «Ін-т проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», Харків  
E-mail: selyk3@ukr.net*

*Матеріал надійшов до редакції 09.08.2013*



И.М. Быков, Е.Е. Есауленко, Р.И. Сепиашвили, М.А. Хильчук

## Оценка эффективности антиоксидантных свойств липофильных продуктов растительного происхождения *in vitro* методом липосомальной модельной тест-системы

*В статье представлены результаты об изучении возможности эффективного использования липосомальных модельных тест-систем на основе фосфатидилхолиновых липосом для поиска и оценки антиоксидантных свойств у продуктов растительного происхождения, полученных как экспериментально, так и входящих в состав лекарственных препаратов. В экспериментальных группах, где использовались льняное масло, масла черного и грецкого ореха, фосфоглив, был обнаружен высокий антиоксидантный эффект, что позволяет сделать вывод о необходимости определения дальнейшей стратегии использования антиоксидантов в клинике.*

*Ключевые слова: фосфатидилхолиновые липосомы, антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, прооксидантные свойства.*

### ВВЕДЕНИЕ

В клетках в процессе метаболизма постоянно образуются токсичные активные формы кислорода (АФК). Они способны инициировать в организме реакции свободнорадикального окисления, вызывающие повреждение различных белков и пептидов, азотистых оснований и нуклеиновых кислот, липидов и других биомолекул. Свободные радикалы непосредственно повреждают ферментативные системы, а также оказывают прооксидантное действие, инициируя цепную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к структурной и функциональной перестройке биологических мембран, повышению их проницаемости для ионов с последующим пространственным разобщением окислительных цепей [1, 8, 10, 16].

При различных патологических изменениях в организме в силу тех или иных причин развивается дисбаланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов и функциональной активностью антиоксидантной

системы (АОС). Он играет ключевую роль при таких широко распространенных заболеваниях, как гепатит, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания, диабетические ангиопатии, катаракта, некоторые формы рака, болезнь Дауна [1, 2, 5, 16]. В то же время у некоторых лекарственных препаратов, используемых для терапии этих заболеваний, были обнаружены прооксидантные свойства [4, 13]. Нарушения баланса интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) и функционального статуса АОС отягощают течение любого заболевания и вынуждают искать пути диетологической и фармакологической их коррекции [3, 7, 12].

Данные предпосылки определяют актуальность целенаправленного поиска антиоксидантов с конкретными мишенями действия и определенными особенностями проявления антиоксидантных свойств. Важным этапом такого поиска является скрининг химических соединений, позволяющий отобрать антиоксиданты с определенным набором свойств.

© И.М. Быков, Е.Е. Есауленко, Р.И. Сепиашвили, М.А. Хильчук

Цель нашей работы – выявить эффективность использования модельной тест-системы на основе липосом для целенаправленного поиска и оценки антиоксидантных свойств липофильных продуктов растительного происхождения.

## МЕТОДИКА

В работе исследованы липофильные продукты растительного происхождения, полученные как экспериментально, так и входящие в состав лекарственных препаратов: масло черного ореха (*Juglans nigra*); масло грецкого ореха (*Juglans regia*); масло льняное (производство «ИП Цыпляков А.Н.», Россия); масло оливковое («LOWARI», Италия); масло подсолнечное (производство ООО «Родник-98», Россия); масло кукурузное (производство ООО «Кубанская долина», Россия); эссенциале форте Н (A. Nattermann & Cie. GmbH, Германия); эссливер форте («Nabros Pharma», Индия); фосфоглив (ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия); ретинола ацетат (АЙ СИ ЭН Октябрь, Россия) [15].

Моноламеллярные липосомы получали из яичного фосфатидилхолина методом инъекции этанольного раствора липида в водную фазу. Для этого в 5 мл деионизированной воды, при постоянном интенсивном перемешивании, шприцом с тонкой иглой быстро впрыскивали 0,25 мл раствора фосфолипида необходимой концентрации в этаноле. Конечная концентрация фосфолипида в суспензии липосом в большинстве экспериментов составляла 2,38 мг/мл. Липофильные исследуемые вещества добавляли до нужной концентрации к этанольному раствору фосфолипидов перед приготовлением липосом [9].

Выбор концентраций, в которых исследуемые вещества вносили в модельную систему, осуществляли исходя из физиологических (для растительных масел – 1000 мг) или терапевтически достижимых (для лекарственных препаратов: эссенциале форте и эссливер форте – 1800 мг, фосфоглив – 390 мг, ретинола

ацетат – 1,5 мг) концентраций в тканях и биологических жидкостях организма человека.

Определение в суспензии липосом концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), проводили следующим способом. К 0,5 мл суспензии липосом добавляли 0,5 мл 0,92 моль/л трихлоруксусной кислоты и 1 мл 49 ммоль/л 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), нагревали 15 мин на кипящей водяной бане, центрифугировали 10 мин при 3000 мин<sup>-1</sup>, после чего надосадочную жидкость фотометрировали при длинах волн 452 и 532 нм соответствующим образом обработанной контрольной пробы (деионизированная вода). Индукцию ПОЛ липосом вызывали добавлением сульфата железа (II). Полученные результаты выражали в микромолях малонового диальдегида (МДА), содержащегося в 1 л суспензии липосом, исходя из коэффициента молярной экстинкции МДА ( $1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) [9, 11].

Эффективность антиоксидантного действия исследуемого химического соединения в каждой серии опытов и для каждой длительности периода окисления липосом рассчитывали по формуле:  $[(C_0 - C_1) / C_0] \times 100 \%$ , где  $C_0$  и  $C_1$  – концентрация ТБК-РП в суспензии липосом, не содержащей и содержащей исследуемое соединение (контроль и опыт соответственно). Если значение эффективности антиоксидантного действия было положительным, предположили, что тестируемое вещество проявляет антиоксидантное действие, а если отрицательным – прооксидантное [9].

Экспериментальные результаты были обработаны методами вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента. Достоверным считали различие при  $P < 0,05$  [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение особенностей влияния на интенсивность ПОЛ отобранных для исследования растительных масел и лекарственных препара-

тов показало наличие у них антиоксидантных свойств (табл. 1, 2). Исследуемые продукты достоверно снижали содержание ТБК-РП в липосомах в течение первых 12 ч окисления. При дальнейшем исследовании процесса ПОЛ выраженность антиоксидантного действия заметно снижалась, а у ретинола ацетата проявлялись прооксидантные свойства.

Высокая антиоксидантная активность исследуемых продуктов на начальном этапе ПОЛ согласуется с известными данными о механизме антиоксидантного действия химических соединений, содержащих в своем составе ненасыщенные связи (фосфолипиды, триглицериды, жирорастворимые витамины и др.) [8, 13, 14]. Имея в своем составе реакционноспособные двойные связи, они перехватывают свободные радикалы – инициаторы ПОЛ, конкурируя за них с молекулами липидов и тем самым защищая последние от интенсивного окисления. Однако такая тенденция сохраняется лишь до тех пор, пока содержание антиоксиданта описанного типа достаточно для перехвата основного количества образующихся в ходе СРО радикалов. После истощения пула ан-

тиоксидантов с ненасыщенными связями скорость СРО существенно возрастает. Кроме того, при определенных условиях продукты окисления самих антиоксидантов этой группы могут вовлекаться в дальнейшее развитие реакций СРО, что определяет наличие у антиоксидантов с ненасыщенными связями прооксидантных свойств. По-видимому, отсутствие у растительных масел и фосфолипидных концентратов прооксидантных свойств было обусловлено наличием в их составе различных компонентов, обладающих антиоксидантными действиями.

В целом, по значению антиоксидантного эффекта исследуемые продукты можно расположить следующим образом: ретинола ацетат < оливковое масло < кукурузное масло < подсолнечное масло < эссливер форте < эссенциале форте < масло грецкого ореха < фосфоглив < масло черного ореха < льняное масло. В связи с этим для дальнейших исследований и клинических испытаний были отобраны четыре наиболее перспективных продукта (льняное масло, масло черного и грецкого орехов, фосфоглив), обладающие наиболее выраженными антиоксидантными

**Таблица 1. Динамика содержания веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (мкмоль/л) в липосомах, содержащих исследуемые продукты ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Исследуемый продукт	Время окисления, ч				
	3	6	9	12	24
Суспензия липосом (контроль)	15,406±0,057	20,758±0,174	25,595±0,194	28,986±0,273	29,682±0,163
Ретинола ацетат	12,428±0,184*	16,619±0,351*	22,329±0,239*	27,286±0,194*	32,117±0,302*
Оливковое масло	11,533±0,155*	14,372±0,154*	20,345±0,165*	25,641±0,225*	29,402±0,202**
Кукурузное масло	9,449±0,168*	12,329±0,165*	17,532±0,126*	23,696±0,149*	28,391±0,192*
Подсолнечное масло	8,353±0,121*	11,958±0,156*	16,196±0,207*	22,425±0,161*	27,897±0,127*
Масло грецкого ореха	6,554±0,093*	8,399±0,123*	12,617±0,044*	19,459±0,091*	22,689±0,068*
Масло черного ореха	5,398±0,091*	6,521±0,084*	10,679±0,121*	17,708±0,052*	20,501±0,060*
Льняное масло	3,662±0,060*	5,633±0,051*	9,650±0,031*	16,795±0,019*	19,578±0,031*
Эссливер форте	7,624±0,064*	10,650±0,073*	14,841±0,163*	21,225±0,194*	24,845±0,189*
Эссенциале форте	7,085±0,111*	10,064±0,081*	14,075±0,049*	21,022±0,174*	24,254±0,185*
Фосфоглив	6,094±0,01*	7,497±0,048*	11,751±0,067*	18,311±0,094*	21,651±0,048*

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P > 0,05$ .

Таблица 2. Эффективность антиоксидантного действия (%) изучаемых растительных продуктов (M± m; n=10)

Исследуемый продукт	Время окисления, ч				
	3	6	9	12	24
Ретинола ацетат	19,31±1,29	19,86±2,01	12,71±1,18	5,77±1,31	-8,21±0,90
Оливковое масло	19,12±1,23	20,24±1,94	12,71±1,11	5,30±1,32	0,94±0,50
Кукурузное масло	38,66±1,10	40,55±1,06	12,71±1,11	5,30±1,32	4,31±0,96
Подсолнечное масло	45,75±0,95	42,33±1,10	36,68±0,98	22,55±1,14	5,97±0,90
Масло грецкого ореха	57,46±0,56	59,53±0,59	50,67±0,47	32,81±0,77	23,54±0,54
Масло черного ореха	64,95±0,64	68,58±0,38	58,25±0,61	38,86±0,60	30,92±0,30
Льняное масло	76,23±0,39	72,84±0,36	62,28±0,28	42,01±0,56	34,02±0,39
Эссливер форте	50,52±0,36	48,66±0,51	41,99±0,72	26,73±0,85	16,28±0,72
Эссенциале форте	53,99±0,81	51,51±0,23	44,98±0,44	27,44±0,71	18,25±0,88
Фосфоглив	60,44±0,11	63,85±0,46	54,06±0,53	36,79±0,50	27,04±0,45

свойствами.

Таким образом, использование модельной тест-системы на основе фосфатидилхолиновых липосом является эффективным звеном для поиска новых продуктов с антиоксидантными свойствами. Подобный подход к оценке антиоксидантных свойств новых продуктов позволяет также выявить особенности их механизма действия, а также оценить возможности проявления ими прооксидантных свойств в зависимости от длительности окисления, что необходимо для определения дальнейшей стратегии использования антиоксидантов с лечебной целью.

## REFERENCES

- Aksenova TA, Parkhomenko UV, Gorbunov VV. Peroxidation of lipids in hypertension combined with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical lab. diagnostics*. 2008;(8):17-19.
- Alekseeva AS, Beloborodova EI, Raczkowski MI, Naumova EL, Lambrov EG, Philippova LP. Indicators of serotonin metabolism in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2008;146(11):512-514.
- Amosov BB, Lapin AA, Markov MV, Zelenkov VN. The antioxidant capacity of aqueous and alcoholic extracts of *Filipendula kamchatsky* (*Filipendula kamtschatica maxim.*). *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2009;(1):25-26.
- Belonogova VD, Korepanova NS, Oleshko GI, Nazarenko PV, Mukhamedzhanova DM. Some aspects of the study of biologically active substances and pharmacological properties of the medicinal plants. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2003;(4):16-20.
- Boychuk SV, Shaimardanov RS, Minnebaev MM, Valeeva IC, Mustafin IG, Sharafislamov IF et al. Necrosis and apoptosis of hepatocytes and evaluation of some biochemical parameters of blood in patients with obstructive jaundice tumor etiology. *Russian journal of gastroenterology, hepatology and coloproctology*. 2007;17(6):32-36.
- Gerasimov AN. *Medical statistics: study guide*. Moscow: Medical inform. agency; 2007.
- Goykova LA, Zoryan EV, Anisimova EN, Gurevich KG. Pharmacological methods of correction of stress. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2004;(3):3-5.
- Janashiya MM. *Antioxidants in physiological and pathological processes of organism*. St. Petersburg: Publ N-L; 2001.
- Kamyshnikov VS. *Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnosis*. Moscow: MEDpress Inform; 2009.
- Lukashina TV, Mineeva MF, Dubinskaya VA, Strelkova LB, Kolhir VK, Sokolskaya TA. Using specific enzymatic test systems in vitro for development of multicomponent drug Stabinorm. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2007;(4):25-30.
- Makarov VG, Makarova NM, Selezneva AI. Study of the mechanism of antioxidant action of vitamins and flavonoids. *Problems of nutrition*. 2005;74 (1):10-13.
- Maltseva EL, Gurevich KG, Palmina NP. Possible

- mechanism of bimodal action of  $\alpha$ -tocopherol to proteinkinase activity in vitro. Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry. 2003;(4):44-48.
13. Mashkovskii MD. Medicines. Moskow: Novaya volna; 2001.
14. Menshchikova EB. Oxidative stress: the pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ARTA; 2008.
15. Zaichik AS, Churilov LP. Patochemistry (endocrine and metabolic disorders). St. Petersburg: ELBI-SPb; 2007.
16. Zaitsev VG, Zakrevskii VI. Modeling of lipid peroxidation in vitro. Application of dinitrophenylhydrazine to assess the intensity of peroxidation of phosphatidyl choline liposomes. Vestnik of Volgograd Medical Academy. 2000;56(6):130-133.

*Кубан. гос. мед. ун-т, Краснодар, Россия;  
Ин-т иммунофизиологии, Москва, Россия  
E-mail: IlyaMB@ksma.ru*

*Материал поступил в  
редакцию 13.11.2012*



І.Я. Коцан, Н.О. Козачук, Т.І. Мамчич

## **$\alpha$ -Активність мозку чоловіків і жінок за умов дивергентного мислення**

*Метою дослідження було виявлення електроенцефалографічних патернів, які забезпечують високу оригінальність рішення дивергентного завдання, в  $\alpha$ -піддіапазонах, визначених за індивідуальную частотою  $\alpha$ -ритму. Аналізували динаміку показників потужності та когерентності в  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 та  $\alpha$ -3-піддіапазонах в процесі вирішення завдань конвергентного та дивергентного типу. Встановлено, що обстежуваним з високою оригінальністю мислення властива більша готовність до сприйняття інформації, яка проявляється в більш вираженій депресії  $\alpha$ -2 та  $\alpha$ -3-ритмів у період переходу в стан спокою із розплющеними очима. Виявлено посилення лобних і лобно-центральных зв'язків в  $\alpha$ -2-діапазоні під час виконання завдання дивергентного типу для груп, протилежних за статтю та рівнем оригінальності: «стереотипних» жінок та «оригінальних» чоловіків. В  $\alpha$ -3-діапазоні відмічено формування специфічного для кожної групи патерна змін рівня та характеру внутрішньокоркової взаємодії, пов'язаного зі статтю та оригінальністю.*

*Ключові слова: креативність,  $\alpha$ -піддіапазон, потужність ЕЕГ, когерентність ЕЕГ, внутрішньокіркові взаємодії.*

### **ВСТУП**

Дивергентне мислення – це мислення в «ширину», яке передбачає можливість знаходження багатьох шляхів вирішення завдання чи виявлення нових властивостей об'єкта [1]. Ефективність дивергентного мислення оцінюється за двома показниками – продуктивністю (кількістю запропонованих розв'язків) та оригінальністю (унікальністю, нестандартністю відповіді). Нині електрофізіологи здійснюють численні спроби дослідити мозкові механізми, які забезпечують оригінальність мислення, однак систематизувати отримані результати поки що дуже важко. Це пов'язано з тим, що мозкова організація оригінального (творчого) мислення залежить від багатьох факторів мотивації [2] суб'єктивної складності завдання [3], стратегії обробки інформації [4], статі обстежуваних [5] тощо.

Згідно з гіпотезою Мартиндейла [6], у осіб з високими креативними здібностями більш «гнучкі» процеси активації мозку

відповідно до характеру й умов вирішення творчого завдання. Виходячи з цього, ми припустили, що нестандартні рішення здатні генерувати ті люди, які можуть змінювати рівень активації відповідно до типу завдання – конвергентного (за заданим алгоритмом) чи дивергентного (багатовекторним).

Мета нашого дослідження – виявити особливості активації кори головного мозку в різних піддіапазонах  $\alpha$ -ритму у чоловіків і жінок з високими показниками оригінальності дивергентного мислення.

### **МЕТОДИКА**

Обстежено 206 практично здорових студентів університету (100 чоловіків і 106 жінок) віком від 18 до 21 року. Всі вони попередньо були ознайомлені з умовами експерименту та виявили добровільну згоду на участь у ньому. Електроенцефалограми (ЕЕГ) реєстрували в стані спокою з розплющеними (фон) і заплющеними (фон') очима та під час виконання

© І.Я. Коцан, Н.О. Козачук, Т.І. Мамчич

завдань конвергентного (тест 1) і дивергентного (тест 2) типу.

Як конвергентне завдання нами було використано тест Козлової [7], який вимагав виконання серії простих операцій (підкреслити літеру або цифру, провести лінію, написати коротке слово тощо) в умовах їх швидкої зміни. Інструкцію і «бланк» завдання подавали обстежуваним на монітор комп'ютера.

Завдання дивергентного типу вибиралися з книги Альтшуллера [8] групою незалежних експертів (студентів різних факультетів університету) і подавалися на монітор комп'ютера. Тривалість виконання конвергентного тесту – 2,5 хв, дивергентного – 2 хв. Результати виконання фіксувалися експериментатором після закінчення реєстрації ЕЕГ. Установка на створення оригінального продукту не давалася.

Аналіз ЕЕГ-результатів проводили з урахуванням оригінальності запропонованих відповідей, яку визначали за формулою  $1/(N+1)$ , де  $N$  – кількість аналогічних відповідей в базі даних. Для подальшого аналізу відбирали ЕЕГ тих обстежуваних, у яких коефіцієнти відповідали значенням від 75-ї до 100-ї перцентилі (групи з оригінальними відповідями). Оскільки нестандартні відповіді в переважній більшості випадків з'являлися тоді, коли продуктивність становила 3 і більше варіантів вирішення завдання, в групі із стереотипними відповідями були відібрані студенти з такою самою продуктивністю.

На основі цих результатів і з урахуванням статі було виділено 4 групи обстежуваних: чоловіки, які запропонували оригінальні відповіді (13 осіб); жінки, які запропонували оригінальні відповіді (12 осіб); чоловіки, які запропонували стереотипні відповіді (13 осіб); жінки, які запропонували стереотипні відповіді (12 осіб).

Електричну активність кори головного мозку реєстрували монополярно від 19 відведень за міжнародною системою 10/20 (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, Fz, C3, C4, Cz, T3, T4, T5, T6, P3, P4, Pz, O1, O2) з референтними вуш-

ними електродами А1 і А2. Реєстрацію проводили за допомогою апаратно-програмного комплексу «Нейроком», розробленого науково-технічним центром радіоелектронних медичних приладів і технологій «ХАІ-Медика» Національного аерокосмічного університету «ХАІ» (свідоцтво про державну реєстрацію № 6038/2007 від 26 січня 2007 року). Для покращення якості запису використовували додаткові референтні електроди N (nazion) і Ref та вмонтовану в комплекс систему реєстрації ЕКГ. Реєструвалися 60 с інтервали ЕЕГ. При проведенні Фур'є-реалізації епоха аналізу становила 500 мс. Частота дискретизації аналогового сигналу була 2 мс; вхідний опір для синфазного сигналу – понад 100 МОм. Фільтри високих частот встановлювали на 50 Гц, низьких – 0,1 Гц. Межі можливої відносної похибки при вимірюванні напруги та часових інтервалів ЕЕГ-сигналів –  $\pm 5\%$ . Для режекції ЕЕГ-артефактів використовували ІСА-аналіз. Далі ІСА-компоненти фільтрували з артефактним сигналом і композицією неартефактних ІСА-компонент у результуючу ЕЕГ. У разі, коли окремі спалахи артефактної активності не вдавалося відфільтрувати артефактні відрізки ЕЕГ вирізали з нативної ЕЕГ в ручному режимі.

Для кожного відведення методом швидкого перетворення Фур'є були отримані значення потужності і когерентності ЕЕГ в діапазонах:  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 і  $\alpha$ -3, частотні межі яких визначалися на основі індивідуальної частоти  $\alpha$ -ритму кожного обстежуваного. Індивідуальну частоту обраховували як середнє значення показників центру тяжіння діапазону по всіх відведеннях у стані спокою із заплющеними очима. Частотні межі  $\alpha$ -піддіапазонів розраховували (таблиця) за таким принципом: нижня межа  $\alpha$ -1 – це індивідуальна частота мінус 4 Гц, нижня межа  $\alpha$ -2 – індивідуальна частота мінус 2 Гц; верхня межа  $\alpha$ -3 – індивідуальна частота плюс 2 Гц [9].

Достовірність міжгрупових відмінностей отриманих результатів визначали за

Частотні межі піддіапазонів  $\alpha$ -ритму, розраховані на основі індивідуальної частоти

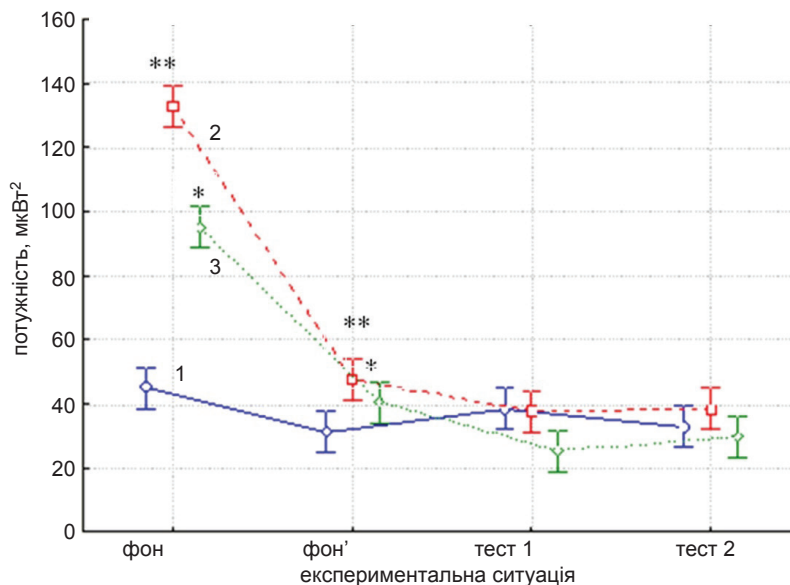
Індивідуальна частота $\alpha$ -ритму, Гц	Частотні межі ритмів, Гц		
	$\alpha$ -1	$\alpha$ -2	$\alpha$ -3
9	5,0-7,0	7,0-9,0	9,0-11,0
9,5	5,5-7,5	7,5-9,5	9,5-11,5
10	6,0-8,0	8,0-10,0	10,0-12,0
10,5	6,5-8,5	8,5-10,5	10,5-12,5
11	7,0-9,0	9,0-11,0	11,0-13,0
11,5	7,5-9,5	9,5-11,5	11,5-13,5

допомогою критерію  $t$  Стьюдента (у разі нормального розподілу), критерію Віл-коксона (у разі ненормального розподілу); міжгрупових відмінностей – за допомогою парного критерію  $t$  Стьюдента та критерію Манна–Уїтні. Багатофакторний дисперсійний аналіз MANOVA був проведений для показників потужності та когерентності з урахуванням таких факторів: стать, ритм ( $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3), експериментальна ситуація (стан спокою з заплющеними очима, стан спокою з розплющеними очима, виконання завдання конвергентного типу, виконання завдання дивергентного типу), оригінальність відповідей (оригінальна, стереотипна), відведення (19 відведень).

Статистична обробка та графічне оформлення отриманих результатів здійснювали з використанням програм «Microsoft Office Excel 2003», програмного пакета «Statistica-5,5», «CorelDRAW X3».

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На основі аналізу взаємодії факторів “ритм” та “експериментальна ситуація” було встановлено, що динаміка показників потужності  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 і  $\alpha$ -3-ритму мала спільну тенденцію: зниження потужності при переході від стану спокою із заплющеними очима до спокійного споглядання. Однак глибина депресії (міра зниження потужності) відрізнялася в різних частотних діапазонах (рис. 1).



ис. 1. Динаміка потужності електричної активності кори головного мозку в різних піддіапазонах  $\alpha$ -ритму. \*,\*\* – статистично вірогідні ( $P \leq 0,05$ ) відмінності між показниками. 1 - ритм  $\alpha$ -1, 2 - ритм  $\alpha$ -2, 3 - ритм  $\alpha$ -3

Тільки в  $\alpha$ -2 і  $\alpha$ -3-піддіапазоні нами були виявлені відмінності, пов'язані з оригінальністю дивергентного мислення. В  $\alpha$ -3-піддіапазоні в «оригінальних» обстежених обох статей фоніві значення потужності та глибина депресії, пов'язані з переходом до спокійного споглядання, були більшими, ніж у студентів, які пропонували стереотипні відповіді (рис. 2).

В  $\alpha$ -2-піддіапазоні глибина депресії також відрізнялася в обстежуваних з різними показниками оригінальності відповідей. Але в «оригінальних» жінок і чоловіків більша глибина депресії  $\alpha$ -2-ритму досягалася різними механізмами. У жінок – за рахунок вищих показників потужності у стані спокою із заплющеними очима, у чоловіків – за рахунок менших у стані спокійного споглядання (рис. 3).

Результати MANOVA також виявили, що відмінності коефіцієнтів когерентності, пов'язані з неординарністю дивергентного мислення, характерні тільки для  $\alpha$ -2 і  $\alpha$ -3-піддіапазонів.

Аналіз змін когерентності в  $\alpha$ -2-піддіапазоні виявив цікаву, на наш погляд, осо-

бливість – подібність груп чоловіків з оригінальними відповідями і жінок із стереотипними відповідями. Під час виконання дивергентного завдання в цих групах формувалася чітко виражений фокус взаємодії в латеральній лобній ділянці лівої півкулі (рис. 4) Ніколаєв і співавт. [10] вважають, що в фокусах взаємодії відбувається порівнювання і синтез різноманітної інформації та функціональне об'єднання «зацікавлених» ділянок кори.

Наші попередні дослідження [11, 12] показали, що особливості активаційного забезпечення дивергентного мислення пов'язані із стратегією досягнення результату. Чоловіки, вирішуючи завдання з множинними розв'язками, не враховують можливість і доцільність реалізації запропонованих варіантів вирішення проблемної ситуації, а орієнтуються на свої внутрішньо закріплені «ментальні схеми» і на їхній основі виконують нові завдання. Однак в одних обстежуваних чоловічої статі така стратегія породжує неординарний ментальний продукт, а в других – стереотипний. На нашу думку, це пов'язано з тим наскільки ефективно на-

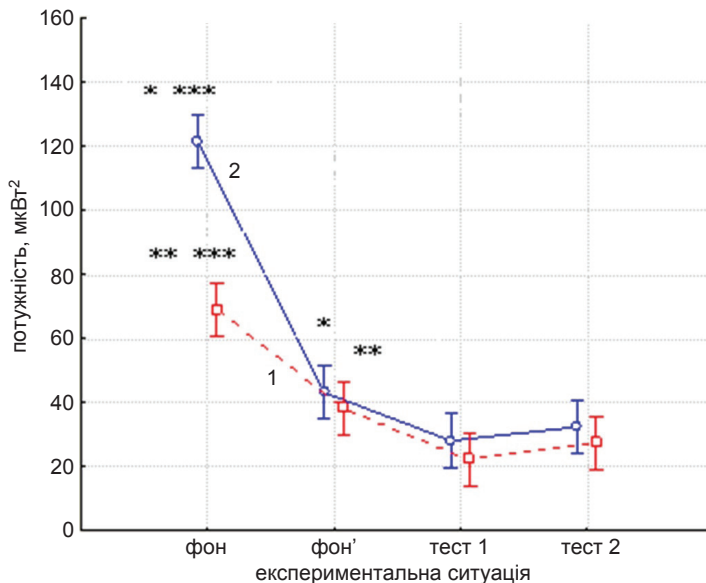


Рис. 2. Особливості взаємодії факторів «експериментальна ситуація» – «оригінальність відповідей» в  $\alpha$ -3-піддіапазоні. 1 – обстежувані з оригінальними, 2 – зі стереотипними відповідями.

\*, \*\*, \*\*\* – статистично вірогідні ( $P \leq 0,05$ ) відмінності між показниками

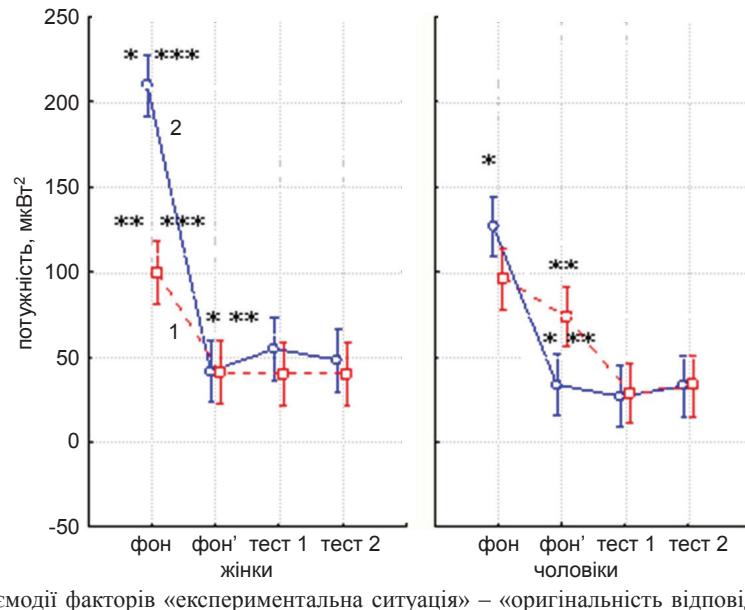


Рис. 3. Особливості взаємодії факторів «експериментальна ситуація» – «оригінальність відповідей» – «стать» в  $\alpha$ -2-піддіапазоні. 1 – обстежувані з оригінальними, 2 – зі стереотипними відповідями. \*, \*\*, \*\*\* – статистично вірогідні ( $P \leq 0,05$ ) відмінності між показниками

явні знання залучаються в створення нового мислительного продукту. Підтвердженням нашого припущення якраз і може бути картина просторової синхронізації, отримана в нашому дослідженні в  $\alpha$ -2,3-діапазоні під час виконання завдання дивергентного типу. В групі чоловіків з оригінальними відповідями спостерігалась інтеграція багатьох ділянок кори: всіх ділянок лобної кори, яка відіграє головну роль у селекції інформації та підтриманні уваги до релевантної інформації [13] та бере участь у контролі як утримання цілей діяльності, так і сприйняття інформації [14]; центральних, що відображують роботу акцептора результату дії [15, 16]; скроневих, пов'язаних з вилученням інформації із пам'яті [17]. Об'єднання цих ділянок саме в  $\alpha$ -2-діапазоні, який згідно з сучасними уявленнями має відношення до функції підтримання уваги [9], та формування фокусу взаємодії в лівій передньо-скроневій ділянці в  $\alpha$ -3-діапазоні, який пов'язаний із семантичною обробкою інформації [9], дає підстави говорити про те, що в групі чоловіків з оригінальними відповідями узгоджуються існуючі когнітивні схеми з новою інформацією (рис.

5). На жаль, ми не змогли спростувати чи підтвердити свої припущення, опираючись на самозвіти обстежуваних, оскільки ніхто із чоловіків не зміг описати, як він розв'язував завдання. Непрямим підтвердженням нашого положення про те, що самотність мислення у чоловіків зумовлена стратегією вбудовування своїх знань у нову когнітивну задачу, можуть бути відповіді обстежуваних. Наприклад, студент П-ць, який навчався на географічному факультеті запропонував використати морські течії; студент П-ей, який навчався на хімічному факультеті, – хімічну речовину; студент К-юк, який навчався на біологічному факультеті, – підкопувати дерева. Отже, цілком очевидно, що в чоловіків важливе значення має саме використання знань, які зберігаються в довготривалій пам'яті.

У групі жінок, які пропонували стереотипні варіанти вирішення завдання, інтеграційні процеси охоплювали значно меншу кількість зон кори і були зосереджені в основному на лобних і центральних ділянках. Опитування жінок цієї групи показало, що переважна більшість із них витратили основні зусилля



на аналіз змісту завдання та побудову логічного ланцюга між його «компонентами». Можливо, саме тому оригінальні рішення і не були запропоновані.

Відсутність змін показників потужності в групах жінок, які пропонували оригінальні відповіді, і чоловіків із стереотипними відповідями при переході від стереотипного до творчого завдання може свідчити, що обстежувані пропонували тільки очевидні

рішення, а така стратегія не потребувала зміни рівня активації. Однак вимагає пояснення, чому в жінок за таких умов оригінальні рішення з'являлися, а в чоловіків – ні. Частково це можна пояснити схожістю топографії змін когерентності в  $\alpha$ -3-піддіпазоні. Звертає на себе увагу активне залучення всіх центральних ділянок, що можна трактувати як ефективну роботу акцептора результату дії функціональної

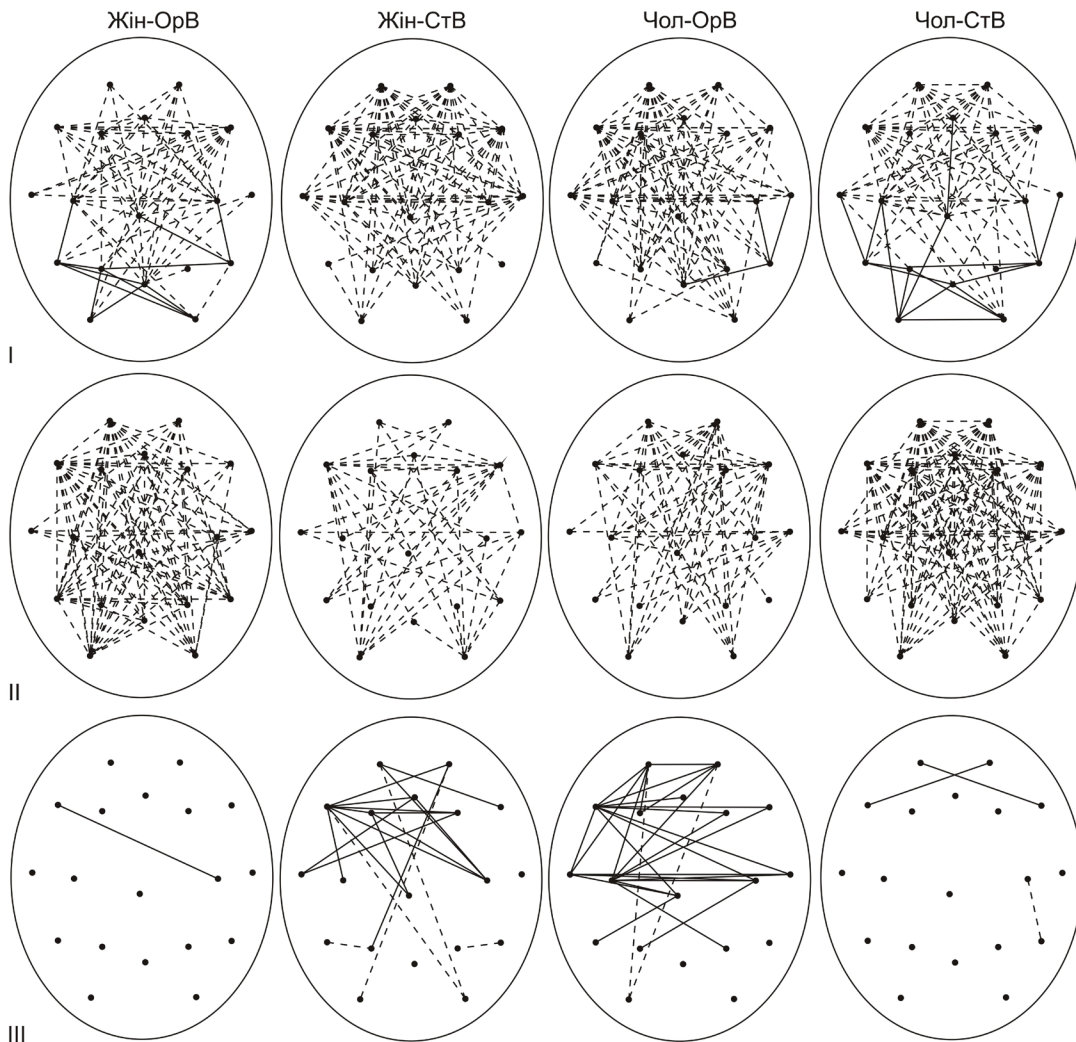


Рис. 4. Зміни просторової синхронізації в  $\alpha$ -2-піддіпазоні. Обстежувані з оригінальними відповідями: Жін-ОрВ, Чол-ОрВ; зі стереотипними відповідями: Жін-СтВ, Чол-СтВ. I – стан спокою з розплющеними очима порівняно зі станом спокою із заплющеними очима; II – виконання завдання конвергентного типу порівняно зі станом спокою з розплющеними очима; III – виконання завдання дивергентного типу порівняно з виконанням завдання конвергентного типу. Суцільні лінії, які з'єднують відповідні відведення, вказують на статистично вірогідно ( $P \leq 0,05$ ) більше значення когерентності в першому із порівнюваних станів, пунктирні – на менше

системи, спрямованої на виконання завдання дивергентного типу [15, 16]. На нашу думку, у чоловіків очевидні рішення – це ті, які навіть не потребують «зв'язки» з існуючими енграмами (зв'язуються тільки з акцептором результату дії). За таких умов стають не помітними ще якісь рішення. У жінок очевидні рішення не зазнають критичного відбору й, таким чином, не відкидаються певні, скажімо, важкі для

реалізації варіанти (а такі, як правило, і є оригінальними).

Отже, отримані результати лише частково підтвердили наше припущення. Процеси активації кори головного мозку за показниками потужності та когерентності  $\alpha$ -ритму, які забезпечують оригінальність дивергентного мислення, визначаються двома факторами – статтю та стратегією вирішення завдання.

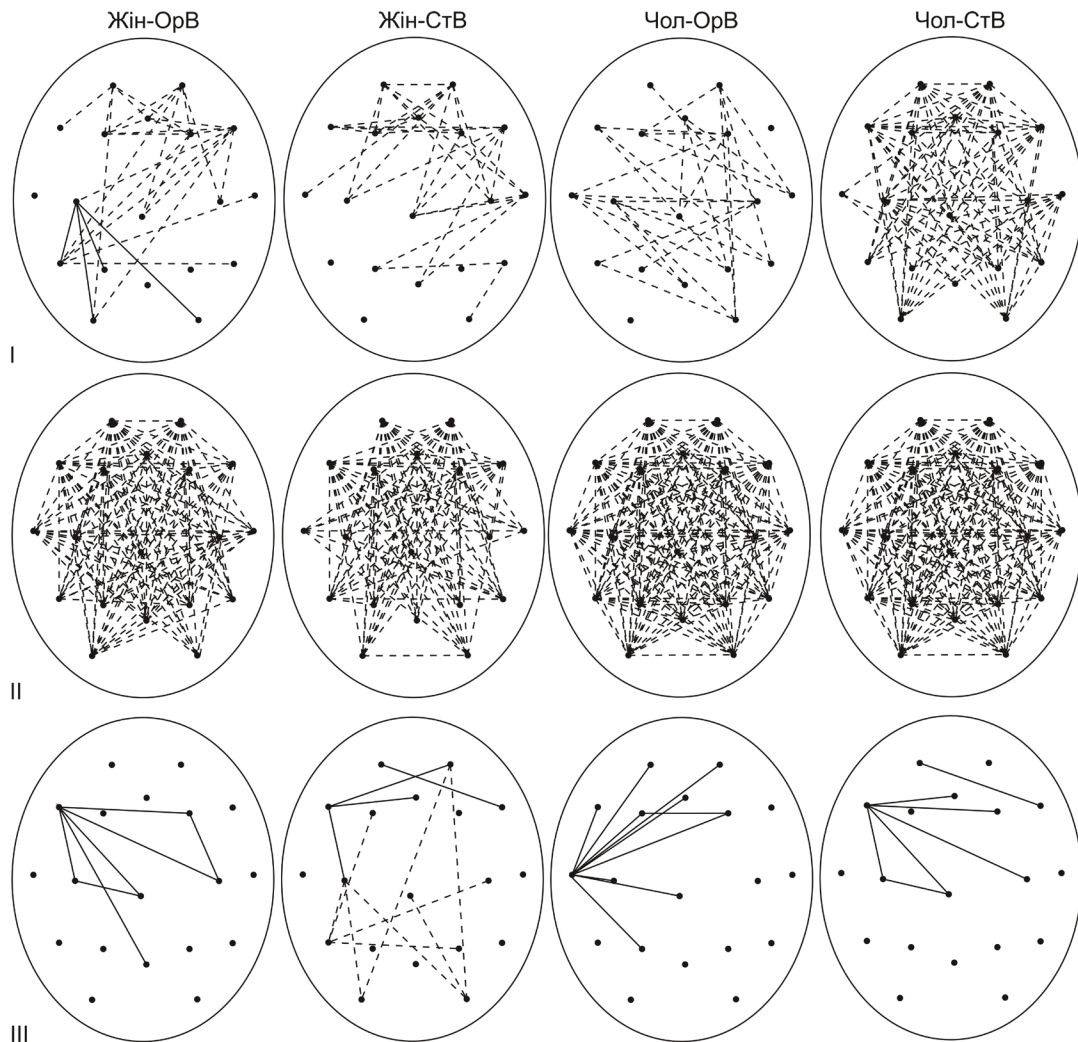


Рис. 5. Зміни просторової синхронізації в  $\alpha$ -3-піддіпазоні. Обстежувані з оригінальними відповідями: Жін-ОрВ, Чол-ОрВ; зі стереотипними відповідями: Жін-СтВ, Чол-СтВ. I – стан спокою з розплющеними очима порівняно зі станом спокою із заплющеними очима; II – виконання завдання конвергентного типу порівняно зі станом спокою з розплющеними очима; III – виконання завдання дивергентного типу порівняно з виконанням завдання конвергентного типу. Суцільні лінії, які з'єднують відповідні відведення, вказують на статистично вірогідно ( $P \leq 0,05$ ) більше значення когерентності в першому із порівнюваних станів, пунктирні – на менше

## ВИСНОВКИ

1. Для обстежуваних обох статей, які пропонували оригінальні відповіді, характерна більш виражена депресія  $\alpha$ -2 і  $\alpha$ -3-ритмів під час переходу від стану спокою із заплученими очима до спокійного споглядання.

2. Посилення лобних і лобно-центральных зв'язків в  $\alpha$ -2-діапазоні під час виконання творчого завдання характерне для протилежних за статтю та оригінальністю груп: «оригінальних» чоловіків і «стереотипних» жінок.

3. В  $\alpha$ -3-діапазоні відмічене формування специфічного для кожної групи патерна змін рівня і характеру внутрішньокіркової взаємодії, пов'язаного зі статтю обстежуваних та оригінальністю дивергентного мислення.

**И.Я. Коцан, Н.А. Козачук, Т.И. Мамчич**

## $\alpha$ -АКТИВНОСТЬ МОЗГА МУЖЧИН И ЖЕНЩИН ПРИ ДИВЕРГЕНТНОМ МЫШЛЕНИИ

Целью исследования было выявление электроэнцефалографических паттернов, обеспечивающих высокую оригинальность решения дивергентного задания, в  $\alpha$ -поддиапазонах, определенных по индивидуальной частоте  $\alpha$ -ритма. Анализировали динамику показателей мощности и когерентности в  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 и  $\alpha$ -3-поддиапазонах в процессе решения заданий конвергентного и дивергентного типа. Установлено, что обследованным с высокой оригинальностью мышления свойственна большая готовность к восприятию информации, проявляющаяся в более выраженной депрессии  $\alpha$ -2 и  $\alpha$ -3-ритмов при переходе в состояние покоя с открытыми глазами. Обнаружено увеличение лобных и лобно-центральных связей в  $\alpha$ -2-диапазоне во время выполнения задания дивергентного типа для групп, противоположных по полу и уровню оригинальности: «оригинальных» мужчин и «стереотипных» женщин. В  $\alpha$ -3-диапазоне отмечено формирование специфического для каждой группы паттерна изменений уровня и характера внутрикорткового взаимодействия, связанного с полом испытуемых и оригинальностью ответов. Ключевые слова: креативность,  $\alpha$ -поддиапазон, мощность EEG, когерентность EEG, внутрикортковые взаимодействия.

**I.Ya. Kotsan, N.A. Kozachuk, T.I. Mamchich**

## FEATURES OF THE ALPHA-ACTIVITY OF MALE AND FEMALE BRAIN CORTEX UNDER CONDITIONS OF DIVERGENT THINKING

The main goal of our study was to determine the EEG-patterns,

which provide high originality of divergent task solving, defined on the base of alpha-rhythm individual frequency. The dynamics of power and coherence indexes in alpha-1, alpha-2 and alpha-3 subbands during the divergent and convergent tasks solving were analyzed. It was shown that the individuals from high thinking originality group have higher readiness to information perception, which is revealed in a higher depression of alpha-2 and alpha-3 rhythms during transition to rest state with eyes open. During the divergent task processing, an increase in frontal and fronto-central connections in alpha-2 subband was typical for groups opposite in sex and the originality level: for «original» males and «stereotype» females. In alpha-3-band, we observed the formation of level and character changes of intracortical interaction pattern, which was specific for each group and related to the sex of tested individuals and the level of originality of answers.

Key words: creativity, alpha-subbands, EEG power, EEG coherence, intercortical interactions.

*Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk*

## REFERENCES

1. Guilford JP. Is Some Creative Thinking Irrational? The Journal of Creative Behavior. Вересень 1982;16(3):151–4.
2. Razumnikova OM, Volf NV, Tarasova IV. Influence of motivation on the of cortex biopotentials power changes during implementation of graphical and verbal creative tasks. Zh Vyssh Nerv Deiat. 2007;57(5):553–61. (in rus)
3. Danko SG, Shemyakina NV, Nagornova ZhV, Starchenko MG. Comparison of the influence of subjective complexity and creative character of verbal activity on the spectral power indexes. Fiziol Cheloveka. 2009;35(3):132–4. (in rus)
4. Sviderskaya NE, Taratynova GV, Kozhedub RG. EEG-correlates of information processing strategy changes under conditions of visual imagination. Zh Vyssh Nerv Deiat. 2005;55(5):624–32 (in rus).
5. Tarasova IV, Volf NV, Razumnikova OM. Brain cortex biopotentials coherence changes during solving of verbal creative task in males and females. Zh Vyssh Nerv Deiat. 2009;59(2):155–61. (in rus)
6. Martindale C. Biological bases of creativity. Handbook of Creativity. Ed. Sternberg R. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press.; 1999. 137–152 p.
7. Kozlova WT Development of methods of labil nervous processes detection in intellectual-verbal activity [Thesis abstr]. MGU; 1973 (in rus).
8. Altshuller GS. To find an idea. Novosibirsk: Nauka; 1986. 200 p. (in rus)
9. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. Brain Research Reviews. Квітень 1999;29(2-3):169–95.

10. Nikolaev AP, Ivanitskiy GA, Ivanitskiy AM. The study of cortical interactions during short time intervals under conditions of verbal associations search. *Zh Vyssh Nerv Deiat.* 2000;50(1):44–61. (in rus)
11. Kotsan IYa, Kozachuk NO. Local synchronization of cortex biopotentials during divergent thinking in males and females. *Bulletin of Taras Shevchenko Lugansk National University.* 2009;(2):63–8. (in ukr)
12. Kotsan IYa, Kozachuk NO, Shevchuk TYa, Kuznecov IP, Goshko LI. EEG power features of males with high and low indexes of divergent thinking originality. *Tavricheskiy of mediko-biologicheskiiy vestnik.* 2009;12(4):91–5. (in ukr)
13. Schroeter ML, Zysset S, Wahl M, von Cramon DY. Pre-frontal activation due to Stroop interference increases during development—an event-related fNIRS study. *NeuroImage.* 2004;23(4):1317–25.
14. Roelofs A, Hagoort P. Control of language use: cognitive modeling of the hemodynamics of Stroop task performance. *Cognitive Brain Research.* 2002;15(1):85–97.
15. Shvyrkov VB. The basic stages of system-evolutional approach development in psychophysiology. *Psychol Zh.* 1993;14(3):15–27. (in rus)
16. Aalexandrov Y, Jarvilehto T. Activity Versus Reactivity in Psychology and Neurophysiology. *Ecological Psychology.* March 1993;5(1):85–103.
17. Heilman KM, Nadeau SE, Beversdorf DO. Creative Innovation: Possible Brain Mechanisms. *Neurocase.* 01, October 2003;9(5):369–79.

*Східноєвроп. нац. ун-т ім. Лесі Українки, Луцьк, Україна*  
*E-mail: natashakozachuk@gmail.com*

*Матеріал надійшов до редакції 14.06.2013*

І.Г. Літовка, У.О. Мазепа-Крижанівська, В.Я. Березовський

## Вплив мелатоніну на метаболізм кісткової тканини

*В огляді сучасної літератури за період 2000–2013 рр. представлено дані про вплив мелатоніну на органічний та неорганічний матрикс кісткової тканини. Наведені результати дають підстави вважати, що мелатонін є важливим медіатором у формуванні кісткової тканини. Він може запобігати передчасному руйнуванню кісткової тканини та сприяти її відновленню за допомогою механізмів мелатонінопосередкованих рецепторів і рецепторів самостійної дії.*

*Ключові слова: мелатонін, кісткова тканина.*

### ВСТУП

Сполучна тканина відіграє важливу структурну та функціональну роль в організмі людини та тварин. Вона створює основу шкіри, судинної стінки, м'язів, фасцій, оболонки нервів тощо. Опорну функцію забезпечують кісткова, хрящова та сухожильна тканини.

Засновник учення про «фізіологічну систему сполучної тканини» О.О. Богомолець наголошував на важливості вивчення її реактивності [1, 2]. Він вважав, що старіння починається зі сполучної тканини, різновидом якої є кісткова тканина, яка по суті являє собою мінералізований позаклітинний матрикс і має спеціалізовані клітини: остеобласти, остецити і остеокласти. З віком у кістковій тканині змінюється клітинний склад, співвідношення основних структурних макромолекул міжклітинної речовини. Збільшується вміст колагену та змінюються його біофізичні властивості. Водночас зменшується концентрація глікопротеїдів, глікозаміногліканів, протеогліканів, еластичних волокон. Все це призводить до зниження інтенсивності метаболізму, швидкості мінералізації остеоїдної тканини, зменшення кількості клітин остеобластного ряду. Порушується співвідношення органічних та неорганічних компонентів,

мінералізація матриксу та структура і функції білкової матриці кістки [3].

Комплекс вікових змін кісткової тканини моделює початкові стадії проявів остеопорозу. В останні десятиліття ця форма клінічної патології набула істотного поширення серед населення багатьох розвинутих країн. За даними медичної статистики, станом на 2010 р. остеопороз становить близько 10 % від загальної захворюваності. Незважаючи на значні успіхи у створенні лікарських засобів, остеопороз залишається основною причиною переломів кісток, тимчасової або постійної втрати працездатності та інвалідизації населення. Якщо у минулі часи така патологія була типова лише для старших вікових груп, то нині вона вражає й молодь.

Фізіологічна регенерація кісткової тканини у ссавців відбувається безперервно протягом усього життя. Вона контролюється трофічними нейрогенними впливами та системними гормонами. Серед них найбільш дослідженими є паратиреоїдний гормон, кальцитонін та гормон росту. Існують також численні локальні гуморальні фактори росту – природні поліпептиди, близькі до гормонів, що діють на кісткову тканину через аутокринні, паракринні та ендокринні механізми [4–8].

© І.Г. Літовка, У.О. Мазепа-Крижанівська, В.Я. Березовський



В останні роки виявлені нові фактори росту та гормони, які здійснюють різноспрямовані впливи на процеси ремоделювання кісткової тканини та її масу. Серед них мелатонін – основний гормон епіфіза, який секретується шишкоподібною залозою. Проте в організмі виявлено і екстрапінеальний мелатонін, що синтезується поза епіфізом.

### **Мелатонін як індикатор циркадних ритмів метаболізму кісткової тканини**

Клітини-мішені мелатоніну виявлено у печінці, нирках, наднирникових залозах, жовчному міхурі, яєчниках, ендометрії, плаценті, тимусі, лейкоцитах, ендотелії, в сітківці ока, шлунково-кишковому тракті, кістковому мозку [9, 10]. Екстрапінеальну продукцію мелатоніну відкрили російські учені Кветний і Райхлін [11]. Екстрапінеальний мелатонін відіграє роль паракринної сигнальної молекули для локальної координації клітинної функції та міжклітинних зв'язків у нормі та патології. Він може діяти і як типовий гормон, сягаючи віддалених клітин-мішеней за допомогою кровотока. Функціонально всі клітини, що продукують мелатонін, мають відношення до так званої дифузної нейроендокринної системи, універсальної системи адаптації та підтримки гомеостазу організму.

Взаємодія мелатоніну з клітинами може відбуватися різними способами. За своєю природою мелатонін – це похідне індолу, має амфіфільні властивості. Його молекула в а.о.м. становить 232,3. Внаслідок цього він долає всі тканинні бар'єри, вільно проходить через клітинну мембрану. Мелатонін може впливати на внутрішньоклітинні процеси минаючи систему рецепторів і вторинних меседжерів або взаємодію з ядерними рецепторами. Він здатний впливати на клітинні системи шляхом зміни процесів міжклітинної взаємодії [12]. За своїми властивостями цей гормон належить до циркадно-залежних регуляторів метаболізму та кальцієвого гомеостазу кістки.

Біоритмологічна структура метаболізму кісткової тканини є досить пластичною

та легко модифікується змінами рухової активності, ритму світло/темрява, режиму харчування [13]. Показано, що порушення фотоперіодизму може призводити до інтенсифікації або гальмування ремоделювання кістки [14, 15]. В літературі існує точка зору, що мелатонін регулює циркадні ритми метаболізму кістки. Він діє опосередковано, через зміни концентрацій ендогенних факторів – паратиреоїдного та тиреоїдного гормонів, інсуліноподібного фактора росту 1.

Припускають, що, з одного боку, важливими синхронізаторами цих ритмів у щурів є паратиреоїдний гормон, мелатонін, гормон росту, інсуліноподібний фактор росту 1 [16]. З іншого боку, ці гормональні ритми у щурів самі обмежені співвідношенням періодів освітлення та темряви.

Дослідження, проведені на щурах, показали, що вміст маркерів формування кісткової тканини (лужної фосфатази та С-термінальних пропептидів колагену I типу (CICP) і показників руйнування (гідроксипроліну, кальцію, карбокситермінальних телопептидів колагену I типу) знижується з 8-ї до 17-ї години [13]. Концентрація паратиреоїдного гормону мінімальна з 5-ї до 8-ї і з 17-ї до 23-ї години. Концентрація інсуліноподібного фактора росту 1 була високою між 20-ю та 11-ю годинами. Разом із тим вміст CICP зростав з 20-ї до 11-ї, карбокситермінальних телопептидів колагену I типу – з 23-ї до 5-ї, гідроксипроліну – з 21.30 до 6.30, кальцію – з 3.30 до 9.30. Концентрація неорганічного фосфору зменшувалася з 14.00 до 23.00.

Протилежний ефект зафіксовано в інші періоди часу 24-годинного циклу. Збільшення секреції паратиреоїдного гормону та гормону росту спостерігали з 8-ї до 17-ї години. Вміст інсуліноподібного фактора росту 1 був знижений о 2-й, 14-й та 23-й годині.

Синхронність і магнітуда циркадних ритмів виявляється обмеженою періодом годування, циклом світло/темрява та ендокринними взаємозв'язками [17]. У дослідах, проведених на щурах [16], показано, що

вірогідними регуляторами циклічності є паратиреоїдний гормон, інсуліноподібний фактор росту 1, гідроксипролін і мелатонін [13, 18], які впливають на кістковий метаболізм *in vitro* та мають денний ритм (особливо інсуліноподібний фактор росту 1) *in vivo*. Ці гормональні ритми у щурів виявляються обмеженими періодичністю світла та темряви. Крім того, світловий цикл залишається основним синхронізатором кісткового ремоделювання [13, 16, 19].

Мелатонін також виконує функції модулятора диференціації остеобластів та остеокластів [20]. Він сприяє мінералізації матриксу у культурі, посилює синтез колагенових та неколагенових білків кісткового матриксу, гальмує розвиток остеопенії, активуючи секрецію гормону росту у щурів [10].

У модельних експериментах на трансгенній лінії (MMTV-Neu) сліпих мишей, але реагуючих на світло, було показано вплив замісної гормональної терапії або нічного прийому мелатоніну на маркери остеогенезу та його вміст у сироватці крові. Концентрація мелатоніну у цих мишей (FVB / N) з дегенерацією сітківки (RD-/-) змінюється в межах доби. Ефект хронічної замісної гормональної терапії (0,5 мг 17 $\beta$ -естрадіолу та 50 мг прогестерону в 1800 ккал раціону) окремо і в комбінації з мелатоніном (15 мг/л питної води) на якість та щільність кісток оцінювали гістоморфометрично та мікрокомп'ютерною томографією відповідно. Після 1-го року лікування щільність кістки вірогідно зросла на 22 % і на 20 % після прийому мелатоніну на ніч у порівнянні з контролем. Лише замісна гормональна терапія збільшила кісткову поверхню, зменшила трабекулярний простір, знизила кількість остеокластів, не впливаючи на кількість остеобластів порівняно з контролем, а у комплексі з мелатоніном дещо збільшила щільність кісткової тканини. Ці дані дають змогу припустити, що ендогенний ритм мелатоніну модулює важливі якісні та кількісні показники кісткової тканини. Замісна гормональна терапія з/або без додавання

мелатоніну на ніч у мишей проявляє унікальні впливи на маркери кісткової тканини та її щільність. Наслідки цих засобів корекції поодиночі і в поєднанні можуть поліпшити стан кісткової тканини у жінок у перименопаузі та у осіб із низьким вмістом введеного вночі мелатоніну від порушень глибини сну, надлишку освітлення або віку [21].

Досліджено вплив екзогенно введеного мелатоніну (у період мінімуму його природного синтезу приблизно 17.00) на ліпідний та амінокислотний склад органічного матриксу у 11- і 15-місячних щурів-самців лінії Вістар. Відмічено, вірогідне підвищення концентрації загальних фосфоліпідів у цих тварин на 19 і 26 % відповідно. Екзогенний мелатонін у концентрації 1 мг/кг вірогідно знижує концентрацію цистину – на 35 %, орнітину на 59 %, лізину на 33 % у кістковій тканині 11-місячних щурів. У 15-місячних тварин спостерігали вірогідне зниження концентрації серину й аспарагінової кислоти на 29 %. Висловлено думку, що екзогенний мелатонін опосередковано впливає на кістковий метаболізм за допомогою підвищення вмісту полярних ліпідів та зниження вільних амінокислот. Це свідчить про здатність мелатоніну активувати процеси ремоделювання кісткової тканини та інтенсифікувати в ній синтез колагену [22]. Аналогічними дослідженнями підтверджено, що ритми та амплітуда синтезу мелатоніну в організмі людей і тварин не обмежуються лише періодичністю світла та темряви, а залежать від експресії цього гормону, яка з віком знижується [23, 24].

*Вплив пінеалектомії на кістковий метаболізм.* Факт впливу пінеалектомії на кістковий метаболізм було показано на вівцях. Досліджено [25] чотири групи самок овець: контрольну, з хірургічною оваріектомією, з хірургічною пінеалектомією та овець, яким було здійснено обидва втручання. До та через 6 міс після операції вивчали біоптат гребеня клубової кістки. Структурні показники вимірювали за допомогою мікротомографічної цифрової системи ( $\mu$ CT 40, Scanco

Medical, Bassersdorf, Switzerland). Визначали маркери формування та резорбції кістки. Для оцінки довгострокових змін після пінеалектомії, аналізували мінеральну щільність кістки через 0, 3, 9, 18 і 30 міс. Індекс об'єму губчастої кістки через 6 міс знизився на 13,3 % після пінеалектомії і на 21,5 % після оваріектомії та пінеалектомії. Зниження цього показника, на думку авторів, можуть бути зумовлені збільшенням частки губчастої частини, а також зменшенням її щільності. Кількісна гістоморфометрична оцінка та визначення продуктів деградації колагену підтвердили підвищення резорбції кісткової тканини після пінеалектомії. Оваріектомія призводить до тимчасової втрати маси нижньої третини променевої кістки з подальшим збільшенням її до вихідного рівня. Зміни після пінеалектомії у овець свідчать про втрату кісткової маси, яка не була тимчасовою, оскільки постійне зниження мінеральної щільності спостерігали до 30 міс. Таким чином, шишкоподібна залоза впливає на метаболізм кісткової тканини, а пінеалектомія може бути використана як модель деструкції скелета.

Досліджено радіологічні та гістологічні зміни в шийних хребцях курчат на моделі грудного сколіозу. Сорок бройлерів після вилуплення рендомізовано розподілено на чотири рівні групи: просто прооперовані (контроль), курчата після пінеалектомії, прооперовані з введенням мелатоніну і курчата з пінеалектомією, яким внутрішньоочеревинно вводили мелатонін. Пінеалектомію проводили тридобовим курчатам, а забивали в двомісячному віці. Вивчали гістологічні зразки відсканованого шийного хребця. Середньосагітальний зріз фарбували гематоксиліном і еозином та обробляли тар-тратрезистентною кислотою фосфатазою для оцінки кількості остеобластів і остеокластів відповідно. Сколіоз розвивався в грудному відділі хребта в усіх курчат після пінеалектомії і в двох після пінеалектомії з введенням мелатоніну. Дані мікротомографії показали, що курчата після пінеалектомії мали значний

ступінь загального остеопорозу порівняно з іншими птахами. Кількість остеобластів була значно нижчою після пінеалектомії, в той час як ніяких істотних відмінностей у числі остеокластів всіх інших особин не спостерігалося. Встановлено зниження проліферації остеобластів при дефіциті мелатоніну, що призводить до розвитку сколіозу та остеопорозу. Відновлення вмісту мелатоніну запобігає розвитку цих патологій. На думку авторів, цей показник може мати вирішальне значення для розвитку деформацій і остеопорозу при ідіопатичному сколіозі [26]. Подібні дані отримані в роботах Machida та співавт. [27], Man та співавт. [24], Oyama та співавт. [28].

*Вплив мелатоніну на неорганічний матрикс.* У другій половині ХХ сторіччя досліджено вплив мелатоніну на вміст кальцію в тканинах організму. Було відзначено, наприклад, зменшення концентрації кальцію в сироватці крові новонароджених щурів, яким гальмували синтез мелатоніну білим люмінесцентним світлом [29]. Після застосування екзогенного мелатоніну виявлено відновлення вихідного вмісту кальцію. Автори розглядають наслідки світлозалежної гіпокальціємії як результат недостатнього поглинання кальцію кістками за умов, коли вміст мелатоніну знижений після гальмування його синтезу світлом [29]. Крім того, коли секрецію мелатоніну пригнічували у щурів застосуванням  $\beta$ -адреноблокаторів, концентрація кальцію у сироватці крові знижувалася [30]. Після введення мелатоніну цей показник відновлювався. Автори дійшли до висновку, що зменшення концентрації мелатоніну викликає гіпокальціємію. Зроблено припущення, що мелатонін регулює концентрацію кальцію в крові. Оскільки стан кісткової тканини залежить від активності як остеобластів, так і остеокластів, доцільно розглянути вплив мелатоніну на ці клітини.

*Вплив мелатоніну на остеобласти.* Численні дослідження *in vitro* підтвердили гіпотезу стимулювального ефекту мелатоніну на диференціювання та активність

остеобластів. Преостеобласти культивовані за наявності мелатоніну, здійснювали ранне диференціювання і експресію білків кісткових маркерів порівняно з контрольними клітинами інкубованих без мелатоніну [31]. Ці ефекти блокуються лузиндолом, що є антагоністом рецепторів мелатоніну [31]. Вікове зниження продукції мелатоніну може змістити диференціацію клітин кісткового мозку від остеобластичної диференціації до адипоцитотичної лінії клітин. Це може мати відношення до розвитку остеопорузу при старінні [32]. Мелатонін також сприяє остеогенному диференціюванню стовбурових клітин кісткового мозку. Водночас він негативно впливає на диференціювання отриманих із жирової тканини стовбурових клітин [33, 34].

У культурах остеобластів людини [35, 36], мелатонін, у фармакологічних дозах (мкмоль/л): стимулює проліферацію та активність лужної фосфатази цих клітин; сприяє експресії колагену I типу, остеопонтину, кісткового сіалопротеїну й остеокальцину; стимулює формування мінералізованої матриці.

Чи опосередковують сигнальні механізми вплив мелатоніну на остеобласти – невідомо, хоча роль мітогенактивованої протеїнкінази вважається вірогідною [37].

Одним із важливих компонентів діяльності остеобластів є утворення вільних радикалів, які здійснюють процеси руйнування кісток і резорбції [38]. Мелатонін безпосередньо нейтралізує вільні радикали і стимулює активність антиоксидантних ферментів [20, 39], може гальмувати остеокластичну активність. Ці дії сприяють остеобластичній диференціації, активності та експресії остеопротегерину, який запобігає диференціюванню остеокластів, пригнічують вільні радикали, що утворюються при активності остеокластів та реалізують резорбцію кістки.

Існують і протилежні гіпотези щодо впливу мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини та роль остеобластів у цьому процесі. Островська та співавт. [15] виявили кореляцію між високими концентраціями

мелатоніну в плазмі крові шурів-самців лінії Вістар і низьким вмістом маркерів формування кістки. В іншому дослідженні проаналізовано ефекти мелатоніну на культуру остеобластів за наявності остеокластів. Виявлено пригнічення активності обох типів клітин, що дало змогу зробити висновок про встановлення балансу між ними [9, 40]. Автори підкреслюють важливість міжклітинної взаємодії остеобластів і остеокластів для розуміння їх фізіологічної активності так само, як і реакції на мелатонін.

*Вплив мелатоніну на остеокласти.* Іншою можливою мішенню для мелатоніну можуть бути остеокласти. Мелатонін, за припущенням Сонсоні та співавт. [41], втручається у функцію остеокластів. Schroeder та співавт. [42] показали, що мелатонін може гальмувати резорбцію кісток. Виявлено, що мелатонін у фармакологічних дозах знижує резорбцію кісткової маси за рахунок пригнічення регуляції RANK-L [43, 44]. Отримані дані свідчать про остеогенний ефект мелатоніну і мають клінічне значення. Препарати мелатоніну використовують як терапевтичний агент при необхідності формування кістки (в лікуванні переломів, остеопенії або остеопорузу). Ці препарати також використовують для стимуляції біоактивної поверхні імплантату [45].

Активність остеокластів перебуває під контролем паракринних факторів, які продукуються остеобластами. Паратиреоїдний гормон і 1,25-дигідроксихолекальциферол стимулюють експресію диференціації фактора остеокластів (ODF) стромальних клітин і остеобластів кісткового мозку. ODF зв'язується з рецептором-активатором ядерного фактора kB (RANK) на поверхні гофрованої облямівки остеокластів – зони кісткової резорбції [4, 46]. Мелатонін, в мікромольних дозах, зменшує експресію RANK мРНК в остеобластах миші і збільшує як мРНК, так і вміст остеопротегерину, який є часткою суперродини TNFR (рецептора фактора некрозу пухлини), який інгібує диференціювання остеокластів зв'язуванням з ODF і запобіган-



ня зв'язування цього фактора з RANK [47]. За допомогою цього шляху, мелатонін може інгібувати кісткову резорбцію та сприяти зростанню маси кісткової тканини.

Показано [48], що пероральне введення екзогенного мелатоніну у дозі 1 мг/кг у період мінімуму його природного синтезу в організмі дає змогу значно підвищити загальну концентрацію цього гормону в сироватці крові 3- та 9-місячних щурів на 50 та 25,6 % відповідно. Збільшення вмісту мелатоніну у сироватці крові як молодих, так і дорослих щурів не супроводжується значними змінами остеометричних показників кістки. Проте інтенсифікує темпи резорбції кісткової тканини у молодих та дорослих щурів, про що свідчить підвищення активності кислій фосфатази та концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові. Автори вважають, що використання екзогенного мелатоніну може бути корисним для нормалізації процесу фізіологічної регенерації кісткової тканини сучасної людини, яка страждає від гіпокінезії та гіподинамії.

*Вплив мелатоніну на остеогенез.* Показано, що мелатонін здатний змінювати остеогенез і остеогенне диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин. Liu та співавт. [49] дослідили дію мелатоніну на проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин і остеогенне диференціювання без або за наявності інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), який використовували, щоб викликати запалення. Виявлено поліпшення життєздатності клітин і зменшення генерації активних форм кисню у мезенхімальних стовбурових клітинах залежно від дози мелатоніну. Для дослідження впливу мелатоніну на остеогенез, мезенхімальні стовбурові клітини культивували в середовищі остеогенної диференціації, доповненому IL-1 $\beta$  або мелатоніном. Після впливу IL-1 $\beta$  протягом 21 діб, 1 мкмоль/л мелатоніну значно підвищував вміст колагену I типу, активність лужної фосфатази та остеокальцину. Мелатонін у дозі 100 мкмоль/л максимально підвищував вміст остеопонтину, а також сприяв виживанню мезенхімальних

стовбурових клітин і остеогенному диференціюванню при запаленні в середовищі, індукованому IL-1 $\beta$ . Автори припускають, що мелатонін може бути перспективним для стимуляції регенерації кісткової тканини.

Наведені результати підтвердили, що мелатонін є важливим медіатором у формуванні кісткової тканини [9, 50]. Він може запобігати передчасному руйнуванню кісткової тканини та сприяти її відновленню за допомогою механізмів мелатоніноспосередкованих рецепторів і рецепторів самостійної дії. Налічують три основні механізми ефектів мелатоніну на функцію кісткової тканини, а саме сприяння:

диференціації остеобластів і їх активності; зростанню секреції остеопротегерину; зниженню диференціації та активності остеокластів, гальмування резорбції очищення вільних радикалів, що утворюються завдяки активності остеокластів [9].

Таким чином, виявлена можливість регуляції інтенсивності процесів фізіологічної регенерації кісткової тканини, змінюючи амплітуду та ритм добових флуктуацій концентрації мелатоніну в організмі.

**И.Г. Литовка, У.А. Мазепа-Крижанивская, В.А. Березовский**

#### **ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ**

В обзоре современной литературы за период 2000–2013 гг. представлены данные о влиянии мелатонина на органический и неорганический матрикс костной ткани. Приведенные результаты дают основания полагать, что мелатонин является важным медиатором в формировании костной ткани. Он может предотвращать преждевременное разрушение костной ткани и способствовать ее восстановлению с помощью механизмов мелатонинопосредованных рецепторов и рецепторов самостоятельного действия.

Ключевые слова: мелатонин, костная ткань.

**I.G. Litovka, U.O. Mazepa-Kryzhanivska, V.A. Berezovskii**

#### **THE EFFECT OF MELATONIN ON BONE TISSUE METABOLISM**

In a review of the current literature for the 2000–2013 period, the data of the effect of melatonin on organic and inorganic



matrix of bone tissue have been presented. These results suggest that melatonin is an important mediator in the formation of bone tissue. It can prevent the premature destruction of bone and promote its recovery through mechanisms of melatonin-related receptors and receptors of independent action.

Key words: melatonin, tissue bone .

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

## REFERENCES

- Bogomolets A.A. Connective tissue physiological system and affect its function antireticular cytotoxic serum. Physiological system of connective tissue. Kiev: Academy of Sciences of the USSR, 1941. P.23-62.
- Bogomolets A.A. Selected Works. K.: Science opinion, 1969. 422 p.
- Podrushnyak E.P. Age-related changes and diseases of the human musculoskeletal system. K.: Health, 1987. 304 p.
- Cardinali D.P., Ladizesky M.G., Boggio V., Cutrera R.A., Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives J. of Pineal Research. 2003; **34** (2): 81–87.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M. A., Mariano C. P., Jerez L. B. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 2006; **1**: 151-157.
- Markus R.P., Cecon E., Pires-Lapa M.A. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. Int. J. Mol. Sci. 2013; **14** (10): 10979-10997.
- Ohlsson C., Bengtsson B., Isaksson Olle G. Growth Hormone and Bone Endocrine Reviews. 1998; **19** (1): 55-79.
- Zofková I. Neuro-skeletal biology and its importance for clinical osteology. Cesk Fysiol. 2012; **61** (2): 41-44.
- Sanchez-Barcelo E.J., Mediavilla M.D., Tan D.X., Reiter R.J. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. J. of Osteoporosis. 2010; **2010** (1): 1-10.
- Wolden-Hanson T., Mitton D. R., MCCants R. L., Yellon S. M., Wilkinson C. W., Matsumoto A. M., Rasmussen D. D. Daily melatonin administration to middle-Aged Male Rats Suppresses Body Weight, Intraabdominal Adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. Endocrinology. 2000; **41** (2): 487-497.
- Kvetnoy I.M., Reichlin N.T., Yuzhakov V.V., Ingel I.E. Ekstrapinealny melatonin: the place and role in the neuroendocrine regulation of homeostasis. BEBiM . 1999; **127** (4): 364 – 370.
- Anisimov V.N. Melatonin role in the body, the application in the clinic. St. Petersburg: Publisher «System», 2007. – 40 p.
- Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J, Kajdaniuk D, Wolkowska K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. Endocr. Regul. 2003; **37** (4): 163-174.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter R.J. Melatonin: potential functions in the oral cavity. J Periodontol. 2007; **78** (6): 1094-1102.
- Ostrowska Z, Wołkowska-Pokrywa K, Kos-Kudła B, Swietochowska E, Marek B, Kajdaniuk D. Melatonin and bone status. Pol. Merkur. Lekarski. 2006; **21** (124): 389-93.
- Ostrowska Z., Kos-Kudla K., Marek B. et al. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormones secretion in rats under physiological conditions. Neuroendocrinol. Lett. 2002; **23** (5–6): 417– 425.
- Shinoda H., Stern P.H. Diurnal rhythms in Ca transfer into bone, Ca release from bone, and bone resorbing activity in serum of rats. Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1992; **262** (2): R.235 – R.240.
- Sirotnin N.N. Effect of adaptation to hypoxia and acclimatization to high mountain climate on the resistance of animals to some extreme effects. Patol. Physiol. Exp. Ter. 1964; **33**: 12–15.
- Shao P, Ohtsuka-Iso Y.A., Shinoda H. Circadian rhythms in serum bone markers and the relation to the effect of etidronate in rats. Chronobiol. Int. 2003; **20** (2): 325– 326.
- Reiter R. J., Tan D.-X., Manchester L. C., Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. Cell Biochemistry and Biophysics. 2001; **34** (2): 237–256.
- Witt-Enderby P.A., Slater J.P., Johnson N.A., Bondi C.D., Dodda B.R., Kotlarczyk M.P., Clafshenkel W.P., Sethi S., Higginbotham S., Rutkowski J.L., Gallagher K.M., Davis V.L. Effects on bone by the light/dark cycle and chronic treatment with melatonin and/or hormone replacement therapy in intact female mice. J Pineal Res. 2012; **53** (4): 374-384.
- Berezovskii V.A., Litovka I.G., Veselskii S.P., Zamorska T.M., Yanko R.V. The exogenous melatonin influence on the bone's organic matrix lipid and amino acid. Space Science and Technology. 2012; **18** (3): 78-82.
- Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. Experimental Gerontology. 2004; **39** (11-12): 1723–1729.
- Man G.C., Wong J.H., Wang W.W., Sun G.Q. et al. Abnormal melatonin receptor 1B expression in osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis. J. Pineal Res. 2011; **50** (4): 395-402.
- Egermann M., Gerhardt C., Barth A., Maestroni G.J., Schneider E., Alini M. Pinealectomy affects bone mineral density and structure--an experimental study in sheep. BMC Musculoskelet Disord. 2011; **24** (12): 271-280.
- Kono H., Machida M., Saito M., Nishiwaki Y., Kato H., Hosogane N., Chiba K., Miyamoto T., Matsumoto M., Toyama Y. Mechanism of osteoporosis in adolescent idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinea-

- lectomized chickens. *J Pineal Res.* 2011; 51 (4): 387-393.
27. Machida M., Dubouset J., Yamada T. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *J. of Pineal Research.* 2006; 41 (1): 1-7.
  28. Oyama J., Murai I., Kanazawa K., Machida M. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. *J. of Pineal Research.* 2006; 40 (3): 219–224.
  29. Hakanson D. O., Bergstrom W. H. Phototherapy-induced hypocalcemia in newborn rats: prevention by melatonin. *Science.* 1981; 214 (4522): 807–809.
  30. Hakanson D. O., Penny R., Bergstrom W. H. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. *Pediatric Research.* 1987; 22 (4): 414–416.
  31. Roth J. A., Kim B.-G., Lin W.-L., Cho M.-I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J. of Biological Chemistry.* 1999; 274 (31): 22041–22047.
  32. Sanchez-Hidalgo M., Lu Z., Tan D.-X., Maldonado M. D., Reiter R.J., Gregerman R.I. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am. J. of Physiology.* 2007; 292 (6): R2208–R2215.
  33. Zaminy A., Kashani I. R., Barbarestani M., Hedayatpour A. et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iranian Biomedical Journal.* 2008; 12 (3): 133–141.
  34. Zaminy A., Kashani I., Barbarestani M. et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cell. *Indian Journal of Plastic Surgery.* 2008; 41 (1): 8–14.
  35. Nakade O., Koyama H., Arijji H.Yajima, A., Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J. of Pineal Research.* 1999; 27 (2): 106–110.
  36. Satomura K., Tobiume S., Tokuyama R. et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J. of Pineal Research.* 2007; 42 (3): 231–239.
  37. Radio N.M., Doctor J. S., A.Witt-Enderby P. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J. of Pineal Research.* 2006; 40 (4): 332–342.
  38. Fraser J. H. E., Helfrich M. H., Wallace H. M., Ralston S. H. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulate bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 1996; 19 (3): 223–226.
  39. Reiter R.J., Paredes S.D., Manchester L.C., Tan D.X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a new discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2009; 44 (2): 175–200.
  40. Suzuki N. Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. of Pineal Research.* 2002; 33 (4): 253–258.
  41. Conconi S., Hertens E., Skwarlo-Sonta K., Markowska M., Maestroni G.J.M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. of Pineal Research.* 2000; 28 (4): 193–202.
  42. Schroeder A., Van Der Zypen E., Stich H., Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces//*J. of Maxillofacial Surgery.* 1981; 9 (1): 15–25.
  43. Penarrocha Diago M., Oltra Moscardo M.J., Sanchis Bielsa J.M. *Implantologia Oral.* Barcelona, Spain: Ars Medica; 2005. *Conceptos generales de implantologia.* - 3–17.
  44. Stefflik D.E., Parr G.R., Sisk A.L. et al. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J. of Periodontology.* 1994; 65 (5): 404–413.
  45. Lissoni P., Barni S., Cattaneo G. Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology.* 1991; 48 (6): 448–450.
  46. Krane S. M. Genetic control of bone remodeling-insights from a rare disease. *New England Journal of Medicine.* 2002; 347 (3): 210–212.
  47. Koyama H., Nakade O., Takada Y., Kaku T., Lau K.-H.W. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation//*J. of Bone and Mineral Research.* 2002; 17 (7): 1219–1229.
  48. Berezovskiy V.A., Litovka I.G., Kostjuchenko A.S., Yanko R.V. Influence of melatonin on the bone tissue physiological regeneration processes of young and adult rats. *Space Science and Technology.* 2008; 14 (3): 75-81.
  49. Liu X., Gong Y., Xiong K., Ye Y., Xiong Y., Zhuang Z., Luo Y., Jiang Q., He F. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cell. *J. Pineal Res.* 2013; 54 (1): 67-72.
  50. Magri F., Sarra S., Cinchetti W. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. *J. of Pineal Research.* 2004; 36 (4): 256–261.

## CONTENTS

V.Yu. Maslov, N.S. Veselovsky, A.A. Moskalyuk, N.F. Myasoedov, S.I. Shram, S.A. Fedulova. Protective action of peptide pro-gly-pro on electrophysiological characteristics of cultured hippocampal neurones during excitotoxic damage	3
Yu.V. Danylovykh, O.V. Kolomiets, G.V. Danylovykh, S.O. Kosterin. Nitric oxide as a possible regulator of energy-dependent $Ca^{2+}$ transport in mitochondria of uterine smooth muscle	12
V.Yu. Garbuzova, A.V. Polonikov, D.A. Stroy, O.I. Matlaj, Y.A. Ataman, V.A. Sukhareva. A.V. Ataman. Analysis of the effect of $n^5$ , $n^{10}$ -methylene tetrahydrofolate reductase gene c677t polymorphism on the ischemic stroke development in persons with various risk factors	18
I.V. Kompanets, I.O. Stepanets, V.V. Voytenko, D.M. Grebinyk, L.I. Ostapchenko. The activity of interferon-dependent 2',5'-oligoadenylatesynthetase in rat thymus lymphoid cells under the action of ethanol and acetic zinc administration	25
I.V. Vladimirova, I.B. Filippov, A.N. Paduraru, E.Y. Shuba, E.M. Kuliyeva, Y.M. Shuba. Changes of neuromuscular transmission in smooth muscles of rats bladder with experimental diabetes	31
I.A. Topol, A.M. Kamyshny, A.V. Abramov, Yu.M. Kolesnik. Expression of xbp1 in lymphocytes of small intestine in rats under chronic social stress and modulation of intestinal microflora composition	38
V.V. Ruschak, M.O. Chashchyn. Insulin determination in pancreas of guinea pigs with metabolic syndrome	45
I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk, L.P. Biletska, N.B. Panasyuk, A.Ya. Sklyarov. Parameters of no synthase system of gastric mucosa in rats under stress conditions and inhibition of oxygenase cycle.	51
O.M. Oleshchuk. The impact of modulators of nitric oxide synthesis on biochemical indices of liver in rats	57
O.A. Savchenyuk, O.V. Virchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, L.P. Babenko, L.M. Lazarenko, M.Ya. Spivak. The effect of probiotic therapy on development of experimental obesity in rats caused by monosodium glutamate	63
V.A. Kovalova, A. Y. Shevchenko, L.I. Ostapchenko. The effects of natural antioxidants on the content of lipids, proteins and carbohydrates in rat gastric mucosal cells during experimental ulceration	70
V.G. Zeleniuk, I.I. Zamorskii, O.M. Goroshko. Renoprotective efficacy of different doses of statins in experimental acute renal failure	75
N.Yu. Selyukova, N.O. Karpenko, E.M. Koreneva, O.V. Somova, N.P. Smolyenko, S.S. Pochernyayeva, N.M. Brechka. The impact of male phytoestrogenization on the somato-sexual development and fertility of the offsprings in rats	82
I.M. Bykov, E.E. Esaulenko, R.I. Sepiashvili, M.A. Hilchuk. Evaluating the effectiveness of the antioxidant properties of lipophilic plant products in liposome model test systems in vitro	88
I.Ya. Kotsan, N.A. Kozachuk, T.I. Mamchich. Features of the alpha-activity of male and female brain cortex under conditions of divergent thinking	93
<b>REVIEWS</b>	
I.G. Litovka, U.O. Mazepa-Kryzhanivska, V.A. Berezovskii. The effect of melatonin on bone tissue metabolism	102