

Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 2 2016

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Струтинська Н.А., Коцюруба А.В., Будько А.Ю., Мись Л.А., Сагач В.Ф.</i> Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженим конститутивним NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу	3
<i>Minchenko O.H., Bashta Y.M., Minchenko D.O., Ratushna O.O.</i> Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue	12
<i>Телька М.В., Рихальський О.В., Веселовський М.С.</i> Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі	24
<i>Zapukhliak O.S., Kachanovska V.O., Isaeva E.V., Netsyk O.V., Isaev D.S.</i> Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus	35
<i>Верещак І.В., Булгакова Н.В., Корнєєв В.В., Чайковський К.А., Мазниченко А.В.</i> Модуляція моносинаптичних рефлекторних розрядів у щурів після децеребрації під впливом гідрокситриптофану	41
<i>Богдановська Н.В., Коцюруба А.В., Голубенко А.В.</i> Індукція оксидативного та нітрозативного стресу в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах	47
<i>Станішевська Т.І., Аносов І.П.</i> Вплив різного тиреоїдного статусу на електрофізіологічні та міографічні показники скорочення скелетного м'яза (m. Tibialis anterior) білих щурів	57
<i>Панасюк О.С., Шиш А.М., Мойбенко О.О.</i> Омега-3 поліненасичені жирні кислоти нормалізують функцію мітохондрій, ферментів про- та антиоксидантної системи та експресію цитохрому P450 2E1 при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця	64
<i>Бойчук Т.М., Кметь Т.І.</i> Порівняльна характеристика активності апоптотичних процесів у корі різних часток великих півкуль при експериментальній ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету	72

<i>Дринь Д.О., Мельник М.І., Кізуб І.В., Хью Х., Соловйов А.І., Жолос О.В.</i>	
Роль TRPV4 каналів у регуляції фенілефриніндукованого скорочення легеневих артерій щурів	79
<i>Рижкова Н.О., Гавриленко Т.І., Пархоменко О.М.</i> Корвітин знижує високий рівень мієлопероксидази в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарда	87
<i>Землянських Н.Г., Бабійчук Л.О.</i> Зміни поверхневого маркера еритроцитів CD44 при їх гіпотермічному та низькотемпературному зберіганні	94
<i>Бабенко Н.О., Стороженко Г.В.</i> Тривале обмеження калорійності харчового раціону попереджає вікові порушення вмісту біологічно активних сфінго- та гліцероліпідів у тканинах щурів	103
<i>Чернозуб А.А.</i> Безпечні та критичні рівні фізичних навантажень для тренуваних та нетренуваних осіб в умовах м'язової діяльності силової спрямованості	110
НЕКРОЛОГИ	
В.О. Цибенко	117
А.В. Коцюруба	119
Т.М. Зеленська	120

Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу

Н.А. Струтинська, А.В. Коцюруба, А.Ю. Будько, Л.А. Мись, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

Досліджували чутливість мітохондріальної пори (МП) до індуктора кальцію у серці дорослих і старих щурів, а також показники оксидативного та нітрозативного стресу в мітохондріях та тканинах серця. На основі експериментально визначених показників розраховували індекс спряження конститутивних NO-синтаз (cNOS). Показано, що при старінні розвивається оксидативний і нітрозативний стрес, що супроводжується зниженням індексу спряження cNOS і підвищенням чутливості МП до індуктора кальцію. Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів суттєво зростали такі показники оксидативного стресу – швидкість генерації супероксидного (O_2^-) у 4 рази і гідроксильного (OH^\bullet) аніон-радикалів у 2,7 рази та вміст сечовини і ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів – на порядок, що вказує на інтенсифікацію цих процесів. При цьому спостерігали підвищення показників нітрозативного стресу, а саме активності iNOS та нітратредуктази. Водночас за старіння в органах знижувалися пули NO_2^- , що утворюються за нормальної оксигенації органа, а також низькомолекулярних нітрозотіолів і активність Ca^{2+} /кальмодулінзалежних cNOS. Останнє зумовлено зростанням неспряженого стану cNOS, внаслідок чого посилюється окисний стрес. Також в органах суттєво знижувався ендогенний вміст газового медіатора сірководню (H_2S). На тлі цих процесів спостерігали підвищення чутливості МП до кальцію у серці старих тварин, спричинене зниженням у мітохондріях концентрації оксиду азоту і сірководню, котрі мають інгібіторний вплив на МП, і водночас, підвищенням рівня активних форм кисню та азоту (АФК, АФА), які є індукторами її відкривання.

Ключові слова: мітохондрії; серце; неспряження cNOS; оксидативний стрес; старіння; щури.

ВСТУП

Старіння організму – складний фізіологічний процес, що характеризується послабленням функцій всіх органів, зокрема, серця, та підвищенням їх чутливості до дії стресових факторів [1]. Дисбаланс між продукцією вільних радикалів – АФК та АФА – й антиоксидантними системами захисту в клітині призводить до оксидативного та нітрозативного стресу, що супроводжує фізіологічне старіння та є причиною розвитку таких патологічних станів, як ішемія, гіпоксія, діабет тощо [2, 3]. Вважається, що мітохондрії з віком стають основним джерелом супероксидного ради-

© Н.А.Струтинська, А.В. Коцюруба, А.Ю. Будько, Л.А. Мись, В.Ф. Сагач

кала (O_2^-), який самостійно чи взаємодіючи з оксидом азоту (NO) утворює токсичні гідроксильний аніон-радикал (OH^\bullet) і пероксинітрит (ONOO^-) [4]. Оксид азоту, який синтезується індукцибельною Ca^{2+} -незалежною NO-синтазою (iNOS), продукується у великих кількостях за патологічних умов, знижуючи при цьому рівень субстрату L-аргініну для конститутивних Ca^{2+} /кальмодулінзалежних NOS (cNOS) – ендотеліальної (eNOS) та нейрональної (nNOS). До механізмів виникнення оксидативного стресу також відносять неспряження cNOS, яке зумовлене втра-тою здатності ферментами перетворювати

L-аргінін у L-цитрулін з вивільненням NO, натомість відбувається перенесення електронів від НАДФН на молекулярний кисень, з утворенням супероксидного радикала [5]. Як відомо, NOS для своєї роботи потребують НАДФН, ФМН, ФАД, кальмодулін, гем та кофактор тетрагідробіоптерин, а їхнє неспряження може відбуватися внаслідок дефіциту кофактора, виснаження субстрату L-аргініну, накопичення ендогенного інгібітора NOS – асиметричного диметиларгініну (ADMA) та S-глутатіонілювання eNOS [6].

Встановлено, що знижена біодоступність NO в результаті неспряження NOS відіграє важливу роль у такій патології серця, як дилатаційна кардіоміопатія, ішемічно-реперфузійне пошкодження, ендотеліальна дисфункція, атеросклероз, гіпертензія, цукровий діабет [5, 7]. Усі ці порушення характеризуються дисфункцією мітохондрій, одним із проявів якої є відкривання неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), індукторами якої є оксидативний стрес і навантаження Ca^{2+} [8]. Відомо, що відкривання високопровідної МП між зовнішньою і внутрішньою мембранами органел викликає колапс мітохондріального потенціалу, що призводить до втрати енергоутворювальної функції органел (синтезу АТФ) і індукції клітинної смерті – апоптозу [8, 9]. Тим не менше існує МП, яка характеризується низькою провідністю і оборотністю, відіграє фізіологічну роль, вивільняючи кальцій і АФК з органел, тим самим регулюючи кальцієвий і енергетичний гомеостаз клітини. Молекулярна ідентичність компонентів МП наразі залишається до кінця не з'ясованою. Останні дані свідчать про участь фосфатного транспортера та с-субодиниці АТФази мітохондрій у пороутворенні [10]. Порушення функціонування серця при старінні може бути пов'язано з мітохондріальною дисфункцією, а саме з відкриванням високопровідної МП.

На сьогодні не існує достатньо відомостей щодо неспряження NOS у серці при

старінні, проте підвищений вміст АФК та АФА свідчить про те, що ферменти синтезу оксиду азоту за цих умов можуть працювати не ефективно, продукуючи $\cdot\text{O}_2^-$. Тому мета нашої роботи – дослідження різних джерел утворення $\cdot\text{O}_2^-$ і NO, їх ролі у розвитку оксидативного і нітрозативного стресу, а також впливу останніх на чутливість МП до кальцію при старінні.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220-250 г) і старих (24 міс, 300-350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. При дослідженні враховано міжнародні принципи Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10-12 тварин.

У свіжоприготовлених гомогенатах серця щурів та мітохондріях серця визначали біохімічні показники оксидативного стресу (швидкість генерації супероксидного ($\cdot\text{O}_2^-$) і гідроксильного ($\cdot\text{OH}$) радикалів, пули стабільного пероксиду водню (H_2O_2), ейкозаноїдів - тромбоксану B_2 (TxB_2) та пептидолейкотрієну C_4 (LTC_4), сечової кислоти й дієнових кон'югатів (ДК) [11]. Визначали показники нітрозативного стресу: кальцій-залежну активність cNOS, як суму eNOS і nNOS, кальційнезалежну активність iNOS, активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO – нітриту (NO_2^-) і нітрату (NO_3^-)-аніонів, низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ), вміст ендогенного сірководню (H_2S) [12]. Індекс спряження cNOS розраховували як відношення активності cNOS до різниці швидкості генерації $\cdot\text{O}_2^-$ без та за наявності її інгібітора L-NAME [7].

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів [13]. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного

складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 5 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках ($\Delta, \%$) між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Концентрація білка, яку визначали за методом Лоурі, в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування біохімічних механізмів, що призводять до мітохондріальних дисфункцій у серці при старінні, ми визначили показники, які характеризують наявність комбінованого окисного стресу та надлишкового синтезу $\cdot\text{O}_2^-$

і NO. Як видно з рис. 1, більшість показників окисативного стресу як у мітохондріях, так і тканинах серця в цілому при старінні були вищими від контрольних значень або мали тенденцію до зростання, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів. Так, швидкості генерації нестабільних активних форм кисню, а саме $\cdot\text{O}_2^-$, як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга мітохондрій, а також $\cdot\text{OH}$ зростали при старінні у 4 і 2,7 рази відповідно у мітохондріях серця, а також у його тканинах (в 3,7 і 4 рази відповідно). Підвищувався також вміст стабільного H_2O_2 , порівняно з контролем. Вірогідно не відрізнялися від контрольних значень пули тромбоксану B_2 , які характеризують активність циклооксигеназного метаболічного шляху продукції $\cdot\text{O}_2^-$ та пули ейкозаноїдів пептидолейкотрієну C_4 , як маркера утворення $\cdot\text{O}_2^-$ ліпоксигеназою із залученням потужного антиоксиданта глутатіону. Пули сечової кислоти, як кінцевого продукту обміну пуринів, які характеризують активність ксантиноксидази (див. рис. 1, а) у мітохондріях зростали на порядок, а в тканинах серця – в 2,5 рази (див. рис. 1, б), що засвідчує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів в органі.

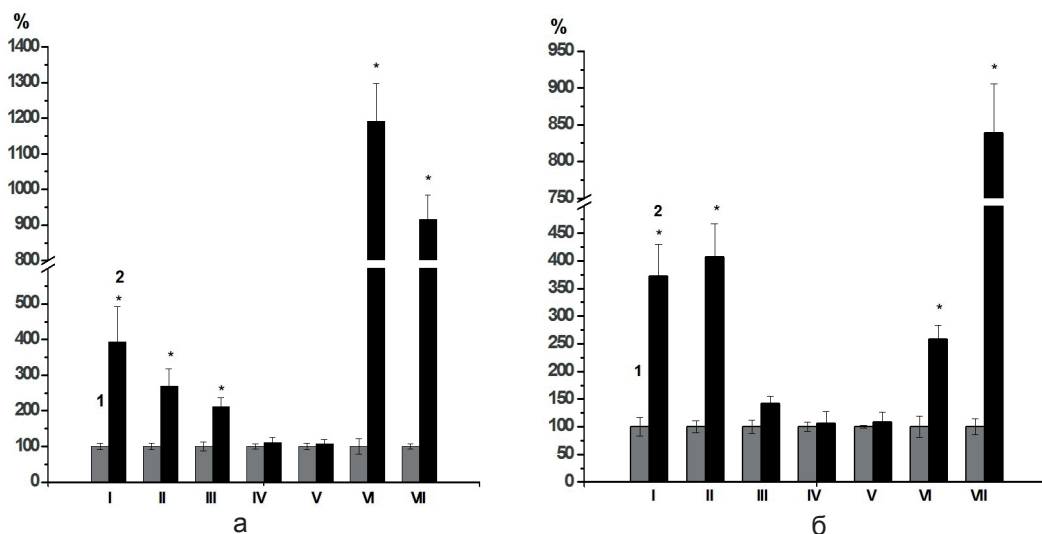


Рис. 1. Відносні показники окисативного стресу в мітохондріях (а) та тканинах серця (б) дорослих (1) та старих шурів (2): I – швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, II – швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, III – вміст H_2O_2 , IV – вміст тромбоксану B_2 , V – вміст пептидолейкотрієну C_4 , VI – вміст сечової кислоти, VII – вміст дієнових кон'югатів. * $P<0,05$ відносно контролю

Суттєве зростання пулів ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – ДК, що є маркерами інтенсивності окисного стресу, також вказує на розвиток цього процесу мітохондріях і тканинах серця зокрема при старінні.

Як видно з рис. 2, у мітохондріях і тканинах серця при старінні розвивається не лише окисдаивний, як було показано вище, а також і нітрозативний стрес. Так, показано зростання активності iNOS (кальційнезалежний *de novo* синтез NO) та нітратредуктази. Натомість знижувалась активність cNOS, яку ідентифіковано як мітохондріальну NOS (mtNOS) чи nNOS (кальційзалежний *de novo* синтез NO), пули NO_2^- і низькомолекулярних нітрозотіолів (див. рис. 2, а). Зростання вмісту нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів, може свідчити про компенсаторне підвищення реутилізаційного синтезу NO. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як нітрит- та нітрат-аніони [14]. Вміст цих метаболітів відображає стан окисного обміну аргініну в кардіоміоцитах. Спонтанним продуктом окиснення NO за фізіологічних умов при нормальній оксигенації (нормоксії)

є NO_2^- . Встановлено, що в мітохондріях серця старих щурів пули NO_2^- , що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються втричі. При цьому пули NO_3^- , що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, не змінювалися. Це свідчить про підвищення в умовах окисного стресу утилізації NO, що посилено синтезувався ферментом iNOS, не на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад, на що вказує відсутність вірогідного підвищення мітохондріальних пулів аніонів нітрату. Пули НМНТ знижувалися в мітохондріях вдвічі. Цей комплекс включає три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником *de novo* синтезу H_2S , нітрозоглутатіон (GSNO), що містить у своєму складі L-цистеїн і нітрозильований сірководень (HSNO). НМНТ беруть участь у транспортуванні і депонуванні NO з його вивільненням в процесі декомпозиції, а зниження їх пулів характеризує зменшення інтенсивності цих процесів. В тканинах серця (див. рис. 2, б) старих щурів також спостерігали подібні зміни: підвищення активності

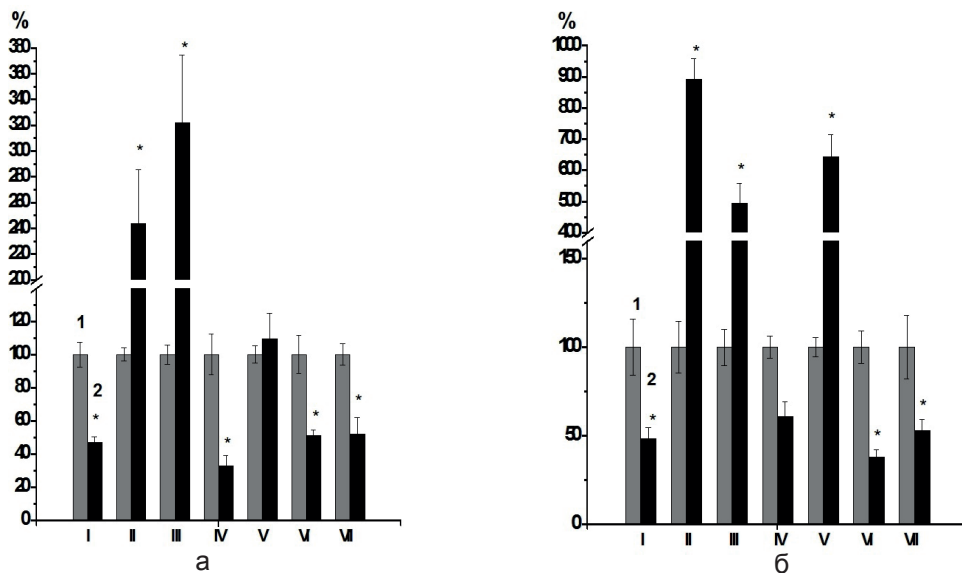


Рис. 2. Відносні показники нітрозативного стресу в мітохондріях (а) та тканинах серця (б) дорослих (1) та старих щурів (2): I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукційної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст NO_2^- , V – вміст NO_3^- , VI – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – вміст H_2S , * $P < 0,05$ відносно контролю

iNOS, нітратредуктази, пулів NO_3^- , а також зниження активності cNOS (eNOS і nNOS), пулів NO_2^- та НМНТ. Відмінність полягала у суттєвому зростанні в серці пулів нітрат-аніона, що утворюється при розпаді пероксинітриту, і є його маркером. Значне підвищення при старінні активності неокисного ферменту – нітратредуктази, як і активності ферменту *de novo* синтезу оксиду азоту iNOS, може бути доказом регуляторної ролі не лише АФК, але і АФА в мітохондріях і серці.

Також в органелах і тканинах серця старих тварин вдвічі знижувалися пули сірководню – важливого газового трансмітера в серцево-судинній системі і регулятора активності cNOS. Це може свідчити про порушення ендogenous синтезу цього медіатора H_2S -синтезувальними ферментами – цистатіонін-γ-ліазою в цитозолі карціоміоцитів та 3-меркаптопіруватсульфотрансферазою в мітохондріях серця.

Внаслідок таких змін у мітохондріях і тканинах серця в умовах старіння суттєво ($P < 0,01$) знижувалися значення індексів спряження cNOS (рис. 3). Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину для утворення NO, а не O_2^- при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається [15], що будь-яке

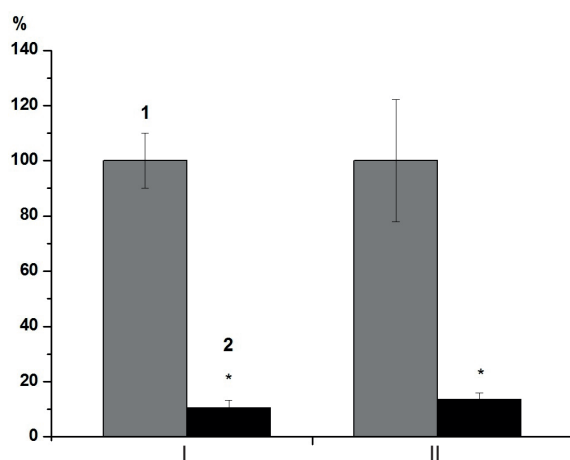


Рис. 3. Відносні значення індексів спряження конститутивних NO-синтаз у мітохондріях серця (I) та тканині серця (II) дорослих (контрольних) (1) та старих щурів (2). * $P < 0,05$ відносно контролю

підвищення генерації O_2^- (мітохондріями, ксантинооксидазою чи НАДФН-оксидазою) спричиняє неспряження eNOS. Внаслідок цього ізоферменти конститутивного *de novo* синтезу NO (eNOS і nNOS) продукують O_2^- замість NO, тим самим утворюючи замкнене коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряження cNOS. Отже, старіння характеризується неспряженим станом cNOS на тлі окисного і нітрозативного стресу. Таке неспряження cNOS було показано при гіпертензії, що супроводжувалося порушення кардіогемодинаміки [7].

У наших дослідках *in vitro* на ізольованих мітохондріях реєстрували відкриття МП у серці щурів, використовуючи природний її індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л (рис. 4, а). Показано посилення рівня спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкриття МП у серці старих щурів порівняно з контрольними. Раніше було встановлено, що відкриття МП у серці дорослих щурів повністю пригнічувалося специфічним її інгібітором циклоспорином А, а у старих тварин – лише частково. Це свідчило про те, що в мітохондріях серця старих щурів поряд з утворенням класичної МП, формується неспецифічна циклоспорин А-нечутлива пора [16]. В експериментах *in vivo* спостерігали підвищення чутливості МП до кальцію, внаслідок зменшення на два порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел (див. рис. 4, б). Зміну чутливості МП до індуктора Ca^{2+} визначали за різницею величин набухання мітохондрій при дії індуктора в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л у серці дорослих і старих щурів. Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці. Варто зазначити, що зниження порогу дії кальцію, що індукує відкриття МП, корелювало зі зниженням значень біохімічних індексів спряження cNOS у мітохондріях і тканинах серця.

Безперечно, що такі порушення у функціонуванні мітохондрій мають призводити до погіршення функціональних показників діяльності серця за старіння. Так, було виявлено діастолічну дисфункцію лівого шлуночка та порушення релаксації серця у старих щурів. Водночас суттєво зростало споживання кисню та збільшувалась ударна робота серця, що вказувало на менш ефективну діяльність серця [17].

Отже, у мітохондріях серця старих щурів суттєво зростали такі показники оксидативного стресу, як швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$, а також вміст сечовини, що характеризує активність ксантиноксидази, і ранній продукт ПОЛ – ДК. При цьому максимально підвищувалися такі показники нітрозативного стресу, а саме: активність iNOS, яка активується прозапальними цитокінами ($\cdot\text{O}_2^-$ підсилює цю індукцію), активність нітратредуктази, в основному нітрат- і нітритредуктазної активності ксантиноксидази, яка активується за гіпоксії. Водночас пули NO_2^- в органелах в умовах старіння, що утворюється за нормальної оксигенації органа, НМНТ і, головне, активність sNOS знижувались. Останнє, очевидно, зумовлено зростанням її неспряженого стану, внаслідок чого посилюється окисний стрес і спричиняє більший рівень неспряженості. Та-

кож в органелах знижувалися пули газового медіатора сірководню – важливої сигнальної молекули в серцево-судинній системі. На тлі цих процесів спостерігали підвищення на два порядки чутливості МП до кальцію у серці, що може бути важливим показником пригнічення функціонального стану органа з віком.

Нині відомо, що відкривання МП в стані високої провідності модулюється різними чинниками ендogenous та екзогенного походження. Деякі з цих модулаторів, активуючи чи інгібуючи пороутворення, можуть відігравати важливу роль у формуванні та регулюванні МП. Так, окисний стрес, високий вміст матричного Ca^{2+} та неорганічного фосфату [P_i], зростання рН тощо сприяють відкриванню цього комплексу, в той час як аденінові нуклеотиди (АТФ і АДФ), циклоспорин А і сангліферин А запобігають цьому процесу [9]. Відомо також, що пороутворення може відбуватися без збільшення концентрації Ca^{2+} в органелах, якщо один з індукторів змінюється відповідним чином. Наприклад, під час реперфузії ішемізованого серця, за якого спостерігається окисний стрес, виснаження аденінових нуклеотидів і підвищення концентрації фосфатів та рівнів рН. На різних експериментальних моделях було показано, що такі інгібітори відкривання МП, як цикло-

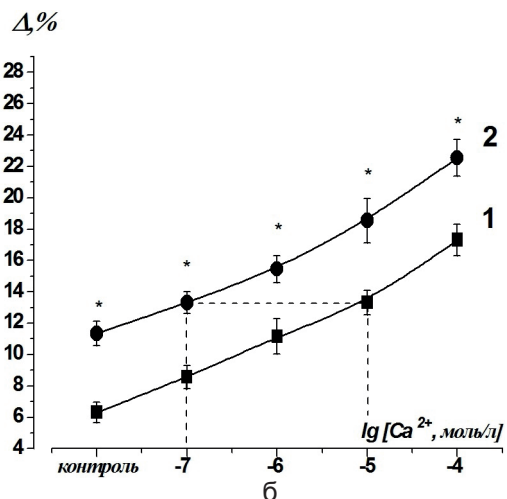
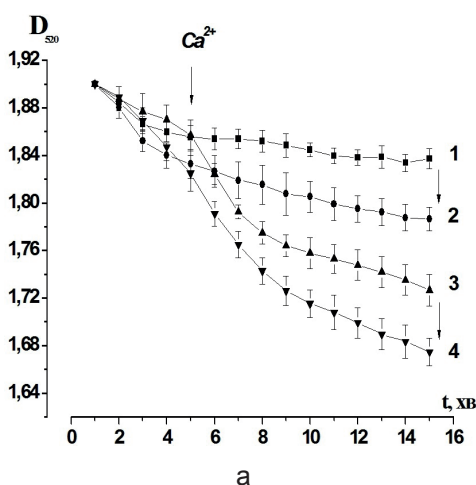


Рис.4. Відкривання мітохондріальної пори у серці: а – набухання мітохондрій серця у безкальцієвому середовищі (1, 2) та за дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) (3, 4) у дорослих (1, 3) і старих (2, 4) щурів; б – зміна чутливості мітохондріальної пори до індуктора кальцію у серці дорослих (1) і старих (2) щурів, * $P < 0,05$ порівняно з контролем дорослих щурів

спорин А і сангліферин, забезпечують захист від реперфузійних пошкоджень і зменшують тим самим розмір інфаркту міокарда. Зміна мітохондріального потенціалу може також регулювати відкритий стан МП, незалежно від поглинання органелами Ca^{2+} [9].

Досліджуючи механізми формування і регуляції пороутворення у серці за старіння, нами було показано зростання експресії генів двох основних структурних компонентів МП – потенціалзалежного аніонного каналу і транспортера аденінових нуклеотидів [18], що сприяло утворенню більшої кількості цих мегаканалів. Також було встановлено, що екзогенне введення газових медіаторів – NO і H_2S , пригнічує кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про їх протекторний вплив на пороутворення у серці [13, 19]. Тому недостатнє їх ендогенне вироблення при старінні, як ми показали у цій роботі, може бути одним з можливих факторів, що призводить до підвищення чутливості МП до кальцію і вказувати на NO- і H_2S -залежні механізми регуляції пороутворення у серці.

Розуміння механізмів виникнення мітохондріальних дисфункцій дасть змогу попередити чи усунути їх розвиток. Так, можна зробити висновок, що мітохондріальна дисфункція, яка спостерігається за старіння, реалізується через неспряження cNOS на тлі зростання вмісту АФК та АФА, порушення кальцієвого гомеостазу, зниження рівня ендогенного синтезу сірководню, що призводить до індукції високопровідної МП внаслідок зростання її чутливості до кальцію. Тому для усунення мітохондріальної дисфункції за старіння, на нашу думку, необхідним є відновлення спряженого стану cNOS з одночасним максимальним послабленням окисидативно-нітрозативного стресу і підвищенням активності cNOS та відновлення пулів сірководню, що дасть змогу знизити чутливість МП до індуктора у серці при старінні і, можливо, попередити розвиток патологічних станів організму в цілому.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів розвивався окисидативний стрес, що проявлявся у суттєвому зростанні швидкості генерації супероксидного і гідроксильного аніон-радикалів у 4 рази та 2,7 рази відповідно. Також майже на порядок зростав вміст сечовини і ранніх продуктів ПОЛ – ДК, що характеризує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів.

2. У мітохондріях серця старих щурів спостерігали зміну значень показників, що характеризують розвиток нітрозативного стресу, а саме зростання активності iNOS та нітратредуктази в 2,2 і 3,2 рази відповідно. Водночас за старіння в органелах знижувалися пули NO_2^- , що утворюються за нормальної оксигенації органа, низькомолекулярних нітрозотіолів і активність cNOS.

3. Показано суттєве зменшення індексів спряження cNOS в мітохондріях і тканинах серця, що свідчить про функціонування цього ферменту у неспряженому стані на тлі окисидативного стресу, за якого додатково генерується O_2^- і посилюється цей процес.

4. Встановлено зниження ендогенного синтезу газового медіатора сірководню у мітохондріях і тканинах серця старих тварин.

5. Підвищений вміст АФК та АФА, а також неспряження cNOS і зниження пулів ендогенного сірководню призводять до підвищення чутливості МП до кальцію, що характеризує дисфункцію мітохондрій при старінні.

N.A. Strutynska, A.V. Kotsiuruba, A.Yu. Budko,
L.A. Mys, V.F. Sagach

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE AGING HEART IS ACCOMPANIED BY CONSTITUTIVE NO-SYNTASES UNCOUPLING ON THE BACKGROUND OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS

We investigated the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to its inductor calcium, as well as indicators of oxidative and nitrosative stress in adult and old rat heart mitochondria and heart tissues. The coupling index of constitutive Ca^{2+} /calmodulin-dependent NO-synthase (cNOS)

was calculated based on experimentally found parameters. The aging is characterized by oxidative and nitrosative stress, which accompanied by a decrease of the cNOS coupling index and an increased sensitivity of MPTP to calcium. We found that in the heart mitochondria of old rats such oxidative stress indicators as the rate of generation of superoxide (O_2^-) and hydroxyl (OH) anion radicals were significantly increased (in 4 and 2,7 times respectively). Also, increased levels of urea and products of early lipid peroxidation – conjugated dienes display the intensification of oxidative stress. Such indicators of nitrosative stress as nitrate reductase and iNOS activity were also enhanced. At the same time under aging the NO_2^- pools, generated when the heart oxygenation is normal, nitrosothiols pools and the activity of cNOS were decreased. It is due to the enhanced level of cNOS uncoupling, resulting in increased oxidative stress. It was also shown the lower level of hydrogen sulfide (H_2S) in old rat heart mitochondria. Thus, we observed the increased sensitivity of MPTP to calcium, due to decreased concentration of its inhibitors nitric oxide and hydrogen sulfide and increased levels of its inducers ROS and RNS in old rat heart mitochondria.

Keywords: mitochondria; heart; cNOS uncoupling; oxidative stress; aging rats.

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

**Н.А. Струтинская, А.В. Коцюрuba,
А.Ю. Будько, Л.А. Мысь, В.Ф. Сагач**

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ В СЕРДЦЕ ПРИ СТАРЕНИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ НЕСОПРЯЖЕНИЕМ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ НА ФОНЕ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССОВ

Исследовали чувствительность митохондриальной поры (МП) к индуктору ее открытия кальцию в сердце взрослых и старых крыс, а также показатели оксидативного и нитрозативного стресса в митохондриях и тканях сердца. На основе экспериментально определенных показателей рассчитали индекс сопряжения конститутивных Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых NO-синтаз (cNOS). Показано, что при старении развивается оксидативный и нитрозативный стресс, сопровождающийся снижением индекса сопряжения cNOS и повышением чувствительности митохондриальной поры (МП) к Ca^{2+} . Установлено, что в митохондриях сердца старых крыс существенно увеличивались такие показатели оксидативного стресса как скорость генерации супероксидного (O_2^-) и гидроксильного (OH) анион-радикалов в 4 и 2,7 раза соответственно, а также содержание мочевины и ранних продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов – на порядок, что указывает на интенсификацию этих процессов. При этом наблюдалось повышение показателей нитрозативного

стресса, а именно активности iNOS и нитратредуктазы. В то же время при старении в митохондриях снижались пулы NO_2^- , образующиеся при оксигенации сердца, а также пулы низкомолекулярных нитрозотиолов и активность конститутивных NOS. Последнее обусловлено ростом несопряженного состояния cNOS, вследствие чего усиливается окислительный стресс. Также в органеллах существенно снижался уровень эндогенного регулятора сероводорода (H_2S). На фоне этих процессов наблюдалось повышение чувствительности МП к кальцию в сердце старых животных, что обусловлено снижением в митохондриях концентрации оксида азота и сероводорода, которые имеют ингибиторное влияние на МП и в то же время, повышением уровня АФК и АФА, которые являются индукторами ее открывания.

Ключевые слова: митохондрии; сердце; несопряжение cNOS; оксидативный стресс; старение; крысы.

REFERENCES

1. Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 83:1–13.
2. Zhang Yu, Tang Zh-H, Ren Zh, Qu Sh-L, Liu M-H, Liu L-Sh, Jiang Z-S. Hydrogen Sulfide, the Next Potent Preventive and Therapeutic Agent in Aging and Age-Associated Diseases. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(6):1104–13.
3. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11:298–300.
4. Lee HC, Wei YH. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942:311–27.
5. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vasc Pharm.* 2012; 57:168–72.
6. Li H, Forstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opinion in Pharm.* 2013; 13:1–7.
7. Kotsuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. NOS Uncoupling is accompanied with Induction of the Oxidative Stress and the Cardiohemodynamics Disturbances in Hypertension. *Fiziol Zh.* 2015; 61(3):3–10 [Ukrainian].
8. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *J Pharmacol and Exp Therap.* 2009; 330(3):670–8.
9. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 78:129–141.
10. Ong S-B, Samangouei P, Beikoghli SK, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 78:23–34.
11. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain

- and its correction by ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(5):3-13 [Ukrainian].
12. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(3):11-7 [Ukrainian].
13. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide Inhibits Ca^{2+} -induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Adult and Old Rat Heart. Fiziol Zh. 2011; 57(6):3-13 [Ukrainian].
14. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Amer J Kidney Diseases. 1994; 24:112-129.
15. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. Cardiovasc Res. 2006; 71(2):247-58.
16. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyns'ka NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inducers in rat heart. Fiziol Zh. 2004; 50(2): 49-63 [Ukrainian].
17. Dorofeyeva NA, Drachuk KO, Sagach VF. Cardiohemodynamics and Efficiency of Frank-Starling Mechanism during Aging. Fiziol Zh. 2015; 60(6):22-26. [Ukrainian].
18. Chorna SV, Dosenko VE, Strutynska NA, Vavilova GL, Sagach VF. Increased Expression of Voltage-dependent Anion Channel and Adenine Nucleotide Translocase and the Sensitivity of Ca^{2+} -induced Mitochondrial Permeability Transition Opening Pore in Old Rat Heart. Fiziol Zh. 2010; 56(4):19-25 [Ukrainian].
19. Akopova OV, Kotsiuruba AV, Tkachenko YuP, Sagach VF. Nitric Oxide Suppresses Permeability Transition Pore Opening and Enhances Calcium Uptake in Mitochondria in vivo. Fiziol Zh. 2005; 51(3):3-11 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 25.12.2015*

Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue

O.H. Minchenko¹, Y.M. Bashta¹, D.O. Minchenko^{1,2}, O.O. Ratushna¹

¹Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Bogomolets National Medical University, Kyiv; E-mail: ominchenko@yahoo.com

Obesity and its metabolic complications are one of the most profound public health problems and result from interactions between genes and environmental. The development of obesity is tightly connected with dysregulation of intrinsic gene expression mechanisms controlling majority of metabolic processes, which are essential for regulation many physiological functions, including insulin sensitivity, cellular proliferation and angiogenesis. Our objective was to evaluate if expression of angiogenesis related genes VEGF-A, CYR61, PDGFC, FGF1, FGF2, FGFR2, FGFR1, E2F8, BAI2, HIF1A, and EPAS1 at mRNA level in adipose tissue could participate in the development of obesity and metabolic complications. We have shown that expression level of VEGF-A, PDGFC, FGF2, and FGFR1 genes is decreased in adipose tissue of obese men with normal glucose tolerance (NGT) versus a group of control subjects. At the same time, in this group of obese individuals a significant up-regulation of CYR61, FGF1, FGFR2, E2F8, BAI2, and HIF1A gene expressions was observed. Impaired glucose tolerance (IGT) in obese patients associates with down-regulation of CYR61 and FGFR2 mRNA and up-regulations of E2F8, FGF1, FGF2, VEGF-A and its splice variant 189 mRNA expressions in adipose tissue versus obese (NGT) individuals. Thus, our data demonstrate that the expression of almost all studied genes is affected in subcutaneous adipose tissue of obese individuals with NGT and that glucose intolerance is associated with gene-specific changes in the expression of E2F8, FGF1, FGF2, VEGF-A, CYR61 and FGFR2 mRNAs. The data presented here provides evidence that VEGF-A, CYR61, PDGFC, FGF1, FGF2, FGFR2, FGFR1, E2F8, BAI2, and HIF1A genes are possibly involved in the development of obesity and its complications.

Key words: mRNA expression, VEGF-A, CYR61, FGF1, FGF2, FGFR2, E2F8, HIF1A, adipose tissue, obesity, men

INTRODUCTION

Accumulating evidence raises the hypothesis that development of obesity and its metabolic complications is tightly associated with dysregulation of mechanisms controlling majority of metabolic processes, especially in adipose tissue, which is at the center of metabolic syndrome in obese individuals [1-3]. Obesity and its metabolic complications are one of the most profound public health problems and result from interactions between genes and environmental. There is data that development of obesity is connected with dysregulation of numerous gene expressions mainly through biological

clock because biological rhythms are an integral component of essentially all aspects of life and regulate many physiological functions, including insulin sensitivity and cellular proliferation [4-7]. Molecular and cellular studies have demonstrated relationships between the dysfunction of circadian clocks and the development of obesity and metabolic abnormalities, including type 2 diabetes [8]. At the same time, metabolic processes feed-back into the circadian clock, affecting clock gene expression and timing of behavior [9].

The growing adipose tissue is associated with cell proliferation and angiogenesis like

other growing tissues including tumors [10-12]. It is well known that angiogenesis is mediated by numerous factors, but substantial evidence accumulating over the last decade has established the fundamental role of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key regulator of normal and abnormal angiogenesis evidence especially in tumors [13-15]. Importantly, VEGF is released by tumor cells and induces neovascularization in the majority of human tumors. Furthermore, VEGF is implicated in intraocular neovascularization associated with diabetic retinopathy [16]. In addition, there are factors, such as connective tissue growth factor (CTGF), which can bind VEGF and inhibits VEGF-induced angiogenesis [17]. Moreover, downregulation of CTGF by the miR-17-92 microRNA enhances neovascularization [17].

An important role in the control of angiogenesis also play cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61), brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2), platelet derived growth factor C (PDGFC), fibroblast growth factors and their receptors, and some transcription factors like hypoxia inducible factor 1 α (HIF1A), endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1/HIF2A), and E2F8 (transcription factor of E2F family) [18-25]. Thus, CYR61 and PDGFC play an important role in proliferation and angiogenesis [18, 20]. Fibroblast growth factor proteins (FGF1 and FGF2), which also known as acidic and basic fibroblast growth hormones, are mitogenic signaling molecules that have roles in angiogenesis and function as a modifier of endothelial cell migration and proliferation, but FGF2 mainly induces lymphangiogenesis [21-23]. Moreover, FGF1 is required for adaptive adipose remodeling and metabolic homeostasis and FGF2 prevents cancer cells from endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [21, 23]. Biological effect of the fibroblast growth factors is realized through the fibroblast growth factor receptors, some of which are related to VEGF signaling pathway [24, 25]. Thus, FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) interacts predominantly with FGF1 and FGF2,

but FGFR1 (fibroblast growth factor receptor-like 1) protein expression was lower in bladder tumors compared to normal tissue. Furthermore, a marked difference between FGFR1 and the other family members is its lack of a cytoplasmic tyrosine kinase domain and potentially inhibit signaling.

There is also data that transcription factor E2F8 creates complexes with other members of E2F family of transcription factors and coordinates various cellular functions through the regulation of the expression of target genes, thereby regulating cell cycle, apoptosis, and angiogenesis, including transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1 [26-28]. There is data [29] that metabolic reprogramming of cancer cells without tumor suppressor LKB1 is realized through HIF1 [29]. Furthermore, an important role in metabolic integration plays the unfolded protein response/endoplasmic reticulum stress, which activates a complex set of signaling pathways and links obesity with insulin action and contributes to the expression profile of many regulatory genes resulting in peripheral insulin resistance and diabetic complications, acting by inhibiting insulin receptor signaling [30-33].

However, detailed molecular mechanisms of the involvement of angiogenesis-related genes in the development of obesity and its complications are not clear yet and remain to be determined. The aim of this study was to investigate the expression of genes encoded key angiogenesis-related factors in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impairment glucose tolerance for evaluation of possible significance these genes in the development of obesity and its complications, particularly glucose intolerance.

METHODS

The 18 adult males participated in the study. They were divided into three equal groups: 6 lean healthy controls, 6 obese with normal glucose tolerance (NGT), and 6 obese with impaired glucose tolerance (IGT). Clinical cha-

racteristics of the study participants are shown in Table 1. All participants gave written informed consent and the studies were approved by the local research ethics committees of Institute of Experimental Endocrinology Slovak Academy of Sciences.

RNA was extracted from subcutaneous adipose tissue samples using RNasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Germany) according to manufacturer's protocol. The RNA pellets were washed with 75 % ethanol and dissolved in nuclease-free water. For additional purification RNA samples were re-precipitated with 95 % ethanol and re-dissolved again in nuclease-free water. QuaniTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis according to manufacturer protocol.

The expression levels of *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2*, *HIF1A*, and *EPAS1* genes were measured in subcutaneous adipose tissue by quantitative PCR (qPCR). The 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Absolute QPCR SYBRGreen Mix (Thermo Scientific, UK) and pair of specific primers (Sigma-Aldrich, USA) were used. For amplification all splice variants of VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) cDNA we used next forward and reverse primers: 5'-CGAAACCATGAACTTTCTGC-3' and 5'-CCTCAGTGGGCACACACTCC-3', correspondingly. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1032 – 1051 and 1333-1314 of human VEGF-A cDNA (GenBank accession number NM_003376). The size of amplified fragment is 302 bp. The amplification of VEGF-A splice variant 189 cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-CCCACTGAGGAGTCCAACAT-3' and reverse – 5'-TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1317 – 1336 and 1502 – 1483 of human VEGF-A cDNA (GenBank accession number NM_003376). The size of amplified fragment is 186 bp. For amplification of E2F8 (E2F transcription factor 8) cDNA

we used next forward and reverse primers: 5'-CCACCACAGCAAATATCGTF-3' and 5'-CTTTGGCCTCAGGTAATCCA-3', correspondingly. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 596 – 615 and 805 – 786 of human E2F8 cDNA (GenBank accession number NM_024680). The size of amplified fragment is 210 bp. The amplification of EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), also known as hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF-2 α), cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-AAGCCTTGGAGGGTTTCATT-3' and reverse – 5'-TCATGAAGAAGTCCC-GCTCT-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 788 – 807 and 1021 – 1002 of human EPAS1 cDNA (GenBank accession number NM_001430). The size of amplified fragment is 234 bp. For amplification of FGF1 (fibroblast growth factor 1) cDNA we used forward (5'-CTGCAGTAGCCTGGAGGTTC-3' and reverse (5'-GGCTGTGAAGGTGGT-GATTT-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 3 – 22 and 199 – 180 of human FGF1 cDNA (GenBank accession number NM_000800). The size of amplified fragment is 198 bp. For amplification of FGF2 (fibroblast growth factor 2) cDNA we used forward (5'-AGAGCGACCCTCACATCAAG-3' and reverse (5'-ACTGCCCAGTTC-GTTTCAGT-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 571 – 590 and 804 – 785 of human FGF2 cDNA (GenBank accession number NM_002006). The size of amplified fragment is 234 bp. For amplification of FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) cDNA we used forward (5'-GTGCTTGGCGGGTAATTCTA-3' and reverse (5'-TACGTTTGGTCAGCTTGTGC-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1325 – 1344 and 1566 – 1547 of human FGFR2 cDNA (GenBank accession number NM_001144918). The size of amplified fragment is 242 bp. For amplification of FGFRL1 (fibroblast growth factor receptor-like 1) cDNA we used forward

(5'–CAGCCTGAGCGTCAACTACA–3' and reverse (5'–CTCATCTTGGAGGGCTGTGT–3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 340–359 and 489–470 of human FGFR1 cDNA (GenBank accession number NM_021923). The size of amplified fragment is 150 bp. For amplification of PDGFC (platelet derived growth factor C), also known as VEGFE, cDNA we used forward (5'–CTCCTGGTTAAACGCTGTGG–3' and reverse (5'–TATCCTCCTGTGCTCCCTCT–3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1314–1333 and 1528–1509 of human PDGFC cDNA (GenBank accession number NM_016205). The size of amplified fragment is 215 bp. For amplification of BAI2 (brain-specific angiogenesis inhibitor 2) cDNA we used forward (5'–CATTGTCCTGGTGAACATGC–3' and reverse (5'–TGCACAGCAGTGATGACAAA–3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 3612–3631 and 3959–3940 of human BAI2 cDNA (GenBank accession number NM_001703). The size of amplified fragment is 348 bp. For amplification of CYR61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61), also known as insulin-like growth factor binding protein 10, cDNA we used forward (5'–CTCCCTGTTTTTGAATGGA–3' and reverse (5'–TGGTCTTGCTGCATTTCTTG–3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 852–871 and 1092–1073 of human CYR61 cDNA (GenBank accession number NM_001554). The size of amplified fragment is 241 bp. For amplification of HIF1A (fibroblast growth factor receptor like 1) cDNA we used forward (5'–GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG–3' and reverse (5'–TGGGTAGGAGATGGAGATGC–3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 2175–2194 and 2341–2322 of human HIF1A cDNA (GenBank accession number NM_001530). The size of amplified fragment is 167 bp. The amplification of beta-actin (ACTB) cDNA was performed using forward - 5'–GGACTTCGAGCAAGAGATGG–3' and

reverse - 5'–AGCACTGTFTTGGCGTACAG–3' primers. These primer nucleotide sequences correspond to 747–766 and 980–961 of human *ACTB* cDNA (GenBank accession number NM_001101). The size of amplified fragment is 234 bp. The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity.

An analysis of qPCR was performed using special computer program "Differential expression calculator". The values of all studied gene expressions were normalized to *ACTB* expression and represent as percent of control (100 %). Statistical analysis was performed as described previously [34]. All values are the means \pm SEM for six different samples. $P < 0.05$ was considered significant in all cases.

RESULTS

As shown in Table 1, the lean healthy control participants were individuals with mean age 44 ± 3.4 years and mean body mass index (BMI) 23 ± 0.6 kg/m². Two obese groups with normal and impaired glucose tolerance had similar age (45 ± 3.0 and 44 ± 3.2 years), but significantly higher BMI (32 ± 0.6 and 34 ± 0.6 kg/m², correspondingly; $P < 0.05$ in both cases) versus control men. Waist circumference was also increased in both obese groups versus control individuals (+31 and +32 %, correspondingly; $P < 0.05$ in both cases). In the group of obese participants with impaired glucose tolerance the levels of 2h blood glucose, insulin, and triglycerides were increased versus obese patients with normal glucose tolerance: +47%, +62%, and +60%, correspondingly; $P < 0.05$ in all cases (Table 1). Correspondingly, insulin sensitivity index T was decreased in obese patients with glucose intolerance versus obese patients with NGT (close to 2 fold; $P < 0.05$).

To test how obesity affects the expression levels of *VEGF-A* gene, strongly related to positive control of angiogenesis, we used two sets of primers: one for all alternative splice variants of this mRNA and other specific only for VEGF-A-189. Figure 1 demonstrates

Table 1. Characteristics of the study participants.

Variable	Lean, NGT	Obese, NGT	Obese, IGT
Age at visit (years)	44 ± 3.4	45 ± 3.0	44 ± 3.2
(n)	(6)	(6)	(6)
Body mass index (BMI) (kg/m ²)	23 ± 0.6	32 ± 0.6 *	34 ± 0.6 *
(n)	(6)	(6)	(6)
Fasting glucose (mmol/l)	4.5 ± 0.09	5.0 ± 0.22	5.5 ± 0.26
(n)	(6)	(6)	(6)
2h oral glucose tolerance test (OGTT) glucose (mmol/l)	5.08 ± 0.64	5.31 ± 0.88	7.83 ± 0.36 *^
(n)	(5)	(6)	(6)
Insulin sensitivity index (T; mg/kg/min)	7.9 ± 0.58	5.1 ± 0.67 *	2.7 ± 0.19 *^
(n)	(6)	(6)	(5)
Fasting triglycerides (mmol/l)	1.0 ± 0.19	1.36 ± 0.20	2.17 ± 0.44*^
(n)	(6)	(6)	(6)
Fasting insulin (μIU/ml)	8.0 ± 1.62	9.37 ± 0.92	15.2 ± 1.15 *^
(n)	(3)	(3)	(4)
Waist circumference (cm)	86 ± 4.3	113 ± 3.3 *	114 ± 3.4 *
(n)	(5)	(6)	(6)

Data are means ± SEM; NGT – normal glucose tolerance; IGT –impaired glucose tolerance; *P < 0.05 versus control (lean group); ^P < 0.05 vs obese (NGT) group.

that expression level of VEGF-A mRNA with primers, which recognize all splice variants, is decreased (-39 %) in subcutaneous adipose tissue of obese men as compared to control

individuals. The expression level of VEGF-A-189 mRNA is also down-regulated (-49 %) in this group of obese patients. At the same time, the expression level of both VEGF-A and

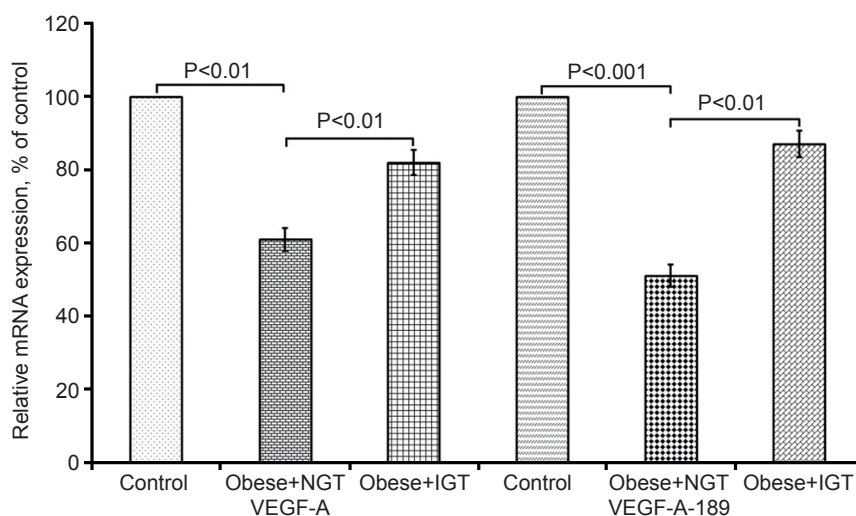


Figure 1. Expression levels of VEGF-A and its alternative splice variant VEGF-A-189 mRNA in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of VEGF-A and VEGF-A-189 mRNA were normalized to the expression of beta-actin mRNA and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean ± SEM of values from each group; n = 6

VEGF-A-189 mRNA is increased in obese men with impaired glucose tolerance as compared with group of obese individuals, which have normal glucose tolerance: +34 % and +71 %, correspondingly (Figure 1).

We next studied the expression level of PDGFC and CYR61 mRNA in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impaired glucose tolerance. As shown in Figure 2, obesity affects both of these gene expressions in opposite ways: down-regulates PDGFC mRNA level (-17 %) and strongly up-regulated the expression of CYR61 gene (+86 %).

Figure 3 demonstrate that obesity affects the expression of two different fibroblast growth factor genes in subcutaneous adipose tissue in opposite ways: induces *FGF1* gene expression (+135 %) and down-regulates the expression level of *FGF2* gene (-36 %). At the same time, the expression level of both *FGF1* and *FGF2* genes is up-regulated in subcutaneous adipose tissue of obese patients with glucose intolerance: +27 % and +67 %, correspondingly (Figure 3). Thereafter, we tested how these changes in *FGF1* and *FGF2* gene expressions correlate with the expression of FGF receptors FGFR2 and FGFR1. As shown in Figure 4, the expression

of *FGFR2* gene is up-regulated and *FGFR1* gene is down-regulated in obese men with normal glucose tolerance: +61 % and -50 %, correspondingly. Moreover, glucose intolerance decreases the expression level of FGFR2 mRNA (-20 %) and does not affect FGFR1 mRNA expression (Figure 4).

We also analyzed the expression level of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 gene in subcutaneous adipose tissue of obese men with and without glucose intolerance. As shown in Figure 5, *BAI2* gene is expressed in adipose tissue both control and obese individuals and its expression is up-regulated in obesity (+23 %). However, no significant changes were observed in the expression of this gene in subcutaneous adipose tissue of obese men with glucose intolerance as compared to group of obese men with normal glucose tolerance. At the same time, the expression of *E2F8* gene, which encoded a key transcription factor related to the control of cell proliferation and angiogenesis, is strongly increased in adipose tissue of obese men with normal glucose tolerance (+146 %) as compared to control group (Figure 5). Furthermore, development of glucose intolerance in obesity leads to additional induction of this gene

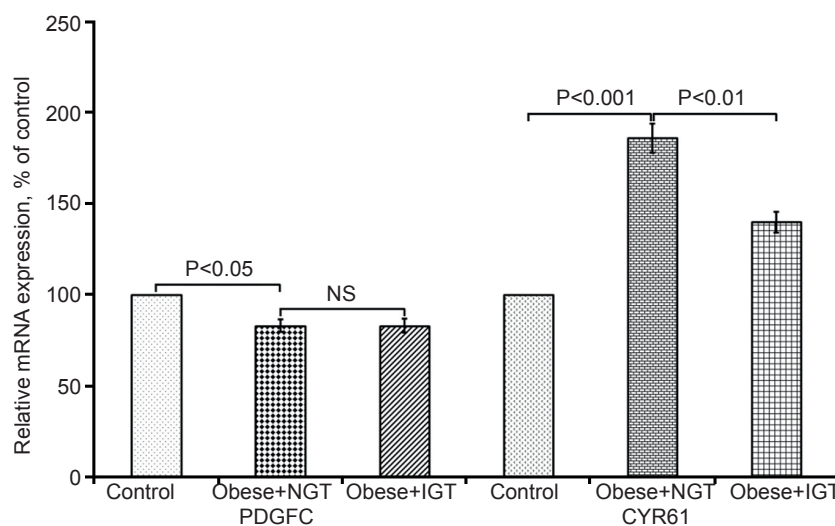


Figure 2. Expression levels of *PDGFC* and *CYR61* genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of these genes were normalized to the expression of beta-actin mRNA and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean \pm SEM of values from each group; $n = 6$

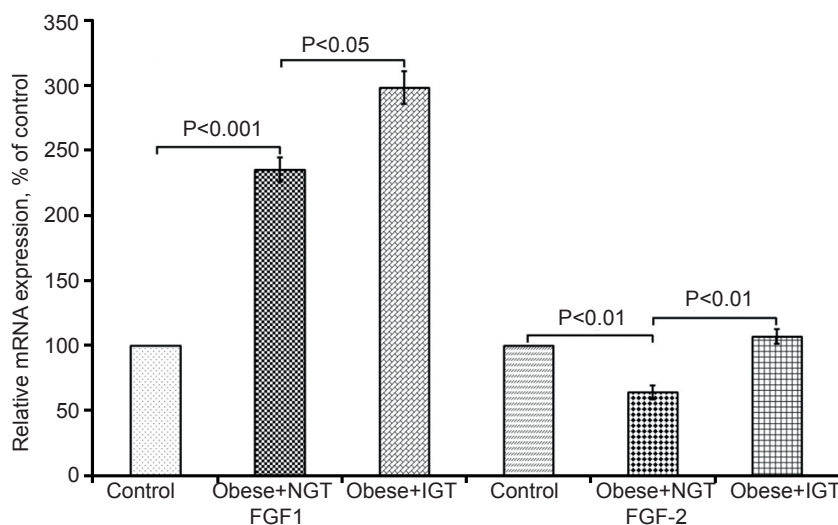


Figure 3. Expression levels of *FGF1* and *FGF2* genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of these *FGF* genes were normalized to the expression of beta-actin mRNA and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean \pm SEM of values from each group; $n = 6$

expression (+86 %) as compared to obese men with normal glucose intolerance.

Additionally, we studied how expression of transcription factors HIF1A and EPAS1/HIF2A, which mediate numerous hypoxia-induced processes including proliferation in cell-specific manner, is affected by obesity and

its complications, because there is data [24, 25] that transcription factor E2F8 can create complexes with other members of E2F family of transcription factors and in cooperation with HIF1 coordinates the regulation of the expression of target genes, thereby regulating cell cycle and angiogenesis, including transcriptional

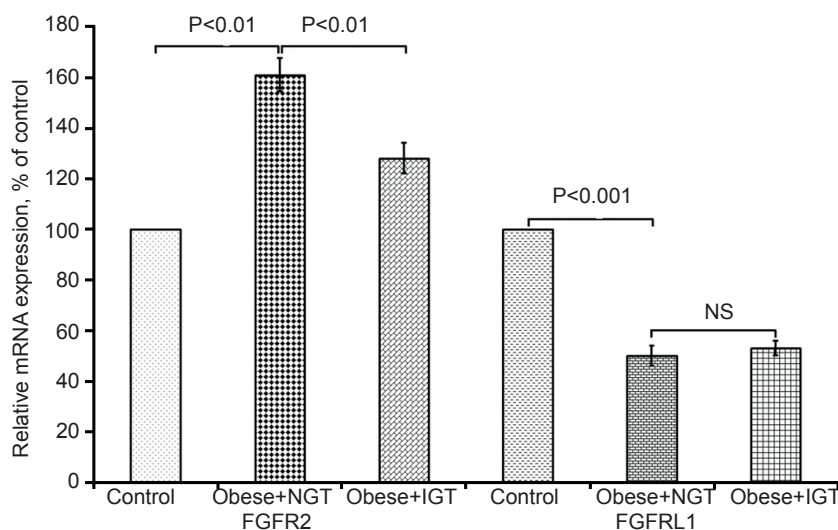


Figure 4. Expression levels of *FGFR2* and *FGFR1* genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of these *FGFR* genes were normalized to the expression of beta-actin gene and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean \pm SEM of values from each group; $n = 6$.

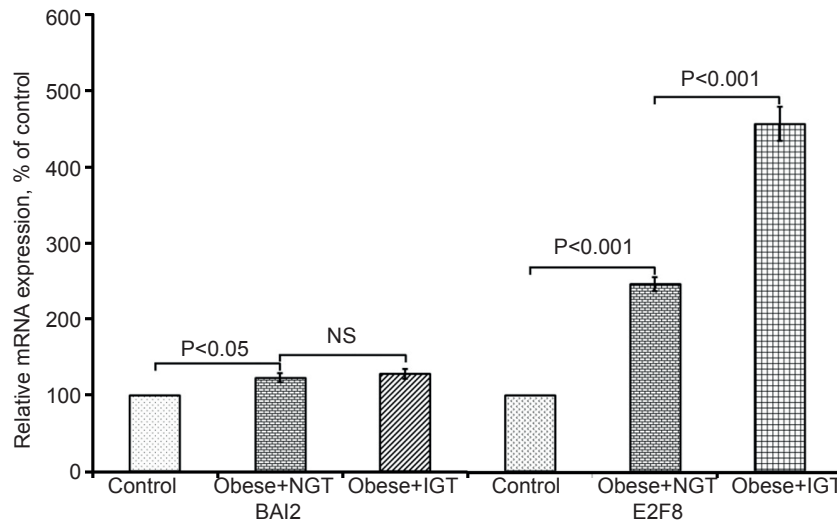


Figure 5. Expression levels of *BAI2* and *E2F8* genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of *BAI2* and *E2F8* genes were normalized to the expression of beta-actin mRNA and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean \pm SEM of values from each group; $n = 6$

activation of VEGFA. As shown in Figure 6, *HIF1A* gene expression is up-regulated in subcutaneous adipose tissue of obese individuals with NGT (+25 %) as compared to control individuals; however, glucose intolerance does not change significantly the expression of this gene as compared to obese men with NGT. Moreover, no significant changes were found in

the expression level of other HIF-alpha protein – EPAS1/HIF2A in adipose tissue of both groups of obese patients (Figure 6).

Thus, the expression almost all studied genes encoded angiogenesis-related growth factors, with the exception of EPAS1, are affected by obesity in gene-specific manner, but with development of glucose intolerance is

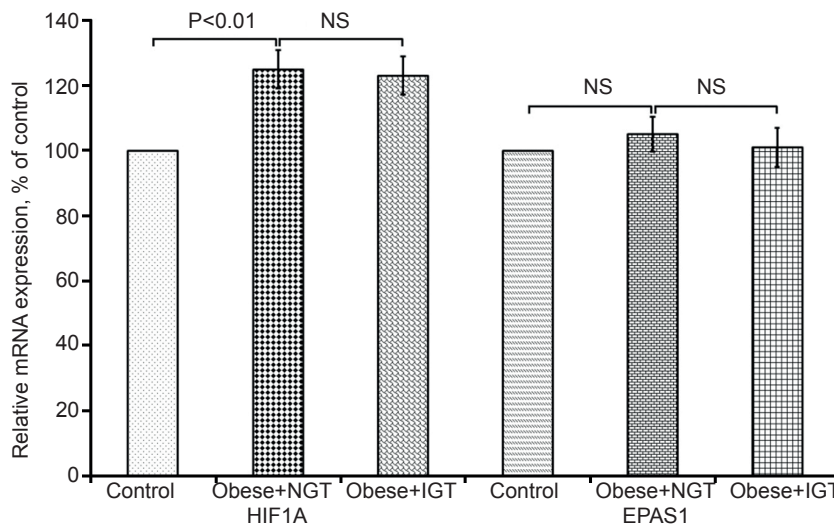


Figure 6. Expression levels of transcription factor *HIF1A* and *EPAS1* genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese individuals with normal glucose tolerance (Obese + NGT) as well as in obese patients with impaired glucose tolerance (Obese + IGT). The values of the expression of these transcription factor genes were normalized to the expression of beta-actin gene and are represented as a percent of control (100 %). Data is expressed as mean \pm SEM of values from each group; $n = 6$

associated the expression of *VEGF-A*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *E2F8*, and *CYR61* genes.

DISCUSSION

Results of this study clearly demonstrated that the expression level of almost all tested genes (*VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2*, and *HIF1A*) encoding key angiogenesis-related transcription factors, is affected in subcutaneous adipose tissue of obese men and possibly participate in the development of obesity and its complications, particularly glucose intolerance. Thus, angiogenesis should be also altered in both obesity and obesity-associated glucose intolerance, because growing adipose tissue needs neo-angiogenesis for cell proliferation like tumors [11, 13]. We have shown that the expression of pro-angiogenic genes *VEGF-A* and *PDGFC* in adipose tissue of obese men is down-regulated, but other pro-angiogenic genes such as *CYR61*, *FGFR2*, *FGF1*, *E2F8*, and *HIF1A* is up-regulated. Moreover, anti-angiogenic gene *BAI2* is also up-regulated in subcutaneous adipose tissue of obese men. It is important to note that angiogenesis is a complex network and is regulated by hundreds of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors possibly through different mechanisms in tissue-specific manner and varies in a range of pathological conditions. Furthermore, Hose et al. [35] do not show a significantly higher median number of expressed pro-angiogenic (45) or anti-angiogenic (31) genes in CD138-purified myeloma cells from 300 untreated patients, but almost all of these myeloma cells samples aberrantly express at least one of the angiogenic factors. Thus, our results concerning deregulation of the expression of different pro-angiogenic and anti-angiogenic genes in adipose tissue of obese individuals possibly reflect specificity of angiogenesis in subcutaneous adipose tissue upon obesity and argue to data Hose et al. [35]. It is also possible that in our cohort of obese men there is stabilized or slightly suppressed angiogenesis because these individuals have

increased but constant weight prolonged time and this observation correlate with decreased expression of VEGF-A as well as with increased expression of BAI2.

At the same time, development of insulin resistance and glucose intolerance in obesity significantly reprogrammed the expression of most studied angiogenesis-related genes in adipose tissue and possibly contributed to aberrant angiogenesis, which is associated with obesity complication, including type 2 diabetes and its complications. Increased expression of VEGF-A as well as FGF1 and transcription factor E2F8, which we observed in adipose tissue of obese individuals with IGT as compared to obese men with NGT, can contribute to enhancement of angiogenesis, but development of insulin resistance is also associated with vascular endothelial growth factor resistance despite the presence of functionally active VEGF receptor 1 [36]. It is important to note that the expression of FGFR2, which predominantly interacts with both FGF1 and FGF2 and responsible for enhanced angiogenesis, is up-regulated in adipose tissue of obese individuals with NGT, but slightly down-regulated in obese patients with IGT and this down-regulation is associated with additional increase of *FGF1* gene expression. At the same time, the expression of FGFRL1, another member of FGFR family, is decreased in obese tissue upon obesity and these results correlate with its biological function as potentially inhibitor of FGF signaling, because FGFRL1 does not have a cytoplasmic tyrosine kinase domain [25]. We also analyzed the expression level of two different HIF-alpha subunits (*HIF1A* and *EPAS1*) and shown that only *HIF1A* is up-regulated in adipose tissue upon obesity and that development of insulin resistance/glucose intolerance does not affect it. These results agree with data Weijts et al. [28] that HIF1 in cooperation with another transcription factors (*E2F8* and *E2F7*) promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA.

However, detailed molecular mechanisms of the involvement of angiogenesis-related genes in the development of obesity and its complications are not clear yet and remain to be determined.

CONCLUSIONS

Results of this study demonstrated that the expression of almost all studied genes encoded key angiogenesis-related factors is affected in subcutaneous adipose tissue of obese individuals with NGT in gene-specific manner. Thus, the level of *VEGF-A*, *PDGFC*, *FGF2*, and *FGFRL1* gene expressions is decreased in adipose tissue of obese men with normal glucose tolerance (NGT), but is increased of *CYR61*, *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *BAI2*, and *HIF1A* gene expressions. Impaired glucose tolerance (IGT) in obese patients associates with down-regulation of *CYR61* and *FGFR2* mRNA and up-regulations of *E2F8*, *FGF1*, *FGF2*, and *VEGF-A* mRNA expressions in adipose tissue versus obese (NGT) individuals. Thus, our data provides evidence that *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2*, and *HIF1A* genes are possibly involved in the development of obesity and its complications; however, molecular mechanisms of the regulation of proliferation-related transcription factor genes warrant further investigation for clarification the role of these genes in obesity and its complications.

Acknowledgements: We would like to thank Prof. I. Klimes (Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Republic) for interest in this work, support and for providing the biological material for this study.

**О.Г. Мінченко, Ю.М. Башта, Д.О. Мінченко,
О.О. Ратушна**

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, ЩО МАЮТЬ ВІДНОШЕННЯ ДО АНГІОГЕНЕЗУ, У ПІДШКІРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ЧОЛОВІКІВ З ОЖИРІННЯМ ТА НОРМАЛЬНОЮ ЧИ ПОРУШЕНОЮ ТОЛЕРАНТНІСТЮ ДО ГЛЮКОЗИ

Ожиріння та його метаболічні ускладнення є однією з найважливіших проблем охорони здоров'я. Розвиток ожиріння зумовлений взаємодією генів із факторами довкілля і тісно пов'язаний із дисрегуляцією тонких механізмів регуляції експресії генів, що контролюють більшість метаболічних процесів і є важливими для регуляції багатьох фізіологічних функцій, включаючи чутливість до інсуліну, пролі-

ферацію клітин та ангиогенез. Метою цього дослідження було оцінити роль експресії мРНК генів *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2*, *HIF1A* та *EPAS1*, що мають відношення до регуляції ангиогенезу, у жировій тканині в плані їх можливої участі у розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень. Показано, що рівень експресії генів *VEGF-A*, *PDGFC*, *FGF2* та *FGFRL1* знижується у жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (NGT) у порівнянні з групою контрольних суб'єктів. У той же час у цій групі чоловіків з ожирінням виявлено значне підвищення експресії генів *CYR61*, *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *BAI2* та *HIF1A*. Порушення толерантності до глюкози (IGT) у пацієнтів з ожирінням асоціюється зі зниженням експресії мРНК *CYR61* і *FGFR2* та збільшенням мРНК *E2F8*, *FGF1*, *FGF2*, *VEGF-A* і його сплайс-варіанту 189 у жировій тканині у порівнянні з групою чоловіків з ожирінням і NGT. Таким чином, отримані нами результати продемонстрували, що експресія більшості досліджених генів порушується у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і NGT і що порушення толерантності до глюкози асоціюється із гено-специфічними змінами експресії мРНК *E2F8*, *FGFR2*, *FGF1*, *FGF2*, *VEGF-A*, *CYR61* і *FGFR2*. Представлені тут результати свідчать про те, що гени *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2* та *HIF1A* можливо задіяні у розвитку ожиріння та його ускладнень.

Ключові слова: експресія мРНК, *VEGF-A*, *CYR61*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *E2F8*, *HIF1A*, жирова тканина, ожиріння, чоловіки.

**О.Г. Мінченко, Ю.М. Башта, Д.О. Мінченко,
О.О. Ратушна**

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ЧТО ИМЕЮТ ОТНОШЕНИЕ К АНГИОГЕНЕЗУ, В ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ МУЖЧИН С ОЖИРЕНИЕМ И НОРМАЛЬНОЙ ИЛИ НАРУШЕННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТЬЮ К ГЛЮКОЗЕ

Ожирение и его метаболіческие осложнения являются одной из наиболее важных проблем здравоохранения. Развитие ожирения обусловлено взаимодействием генов с факторами окружающей среды и тесно связано с дисрегуляцией тонких механизмов регуляции экспрессии генов, что контролируют большинство метаболіческих процессов и являются важными для регуляции многих физиологических функций, включая чувствительность к инсулину, пролиферацию клеток и ангиогенез. Целью этого исследования было оценить роль экспрессии мРНК генов *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2*, *HIF1A* и *EPAS1*, что имеют отношение к регуляции ангиогенеза, в жировой ткани в плане их возможной участи в развитии ожирения и его метаболіческих осложнений. Показано, что уровень экспрессии генов *VEGF-A*, *PDGFC*, *FGF2* и *FGFRL1* снижается в жировой

ткани мужчин с ожирением и нормальной толерантностью к глюкозе (NGT) в сравнении с группой контрольных субъектов. В то же время в этой группе мужчин с ожирением выявлено значительное повышение экспрессии генов *CYR61*, *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *BAI2* и *HIF1A*. Нарушение толерантности к глюкозе (IGT) у пациентов с ожирением ассоциируется со снижением экспрессии мРНК *CYR61* и *FGFR2* и увеличением мРНК *E2F8*, *FGF1*, *FGF2*, *VEGF-A* и его сплайс-варианта 189 в жировой ткани по сравнению с группой мужчин с ожирением и NGT. Таким образом, полученные нами результаты продемонстрировали, что экспрессия большинства исследованных генов нарушается в подкожной жировой ткани мужчин с ожирением и NGT и что нарушение толерантности к глюкозе ассоциируется из гено-специфическими изменениями экспрессии мРНК *E2F8*, *FGF1*, *FGF2*, *VEGF-A*, *CYR61* и *FGFR2*. Представленные здесь результаты свидетельствуют о том, что гены *VEGF-A*, *CYR61*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *BAI2* и *HIF1A* возможно задействованы в развитии ожирения и его осложнений.

Ключевые слова: экспрессия мРНК; *VEGF-A*; *CYR61*; *FGF1*; *FGF2*; *FGFR2*; *E2F8*; *HIF1A*; жировая ткань; ожирение; мужчины.

REFERENCES

- Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e25231.
- Kovac J, Husse J, Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells*. 2009; 282: 75–80.
- Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell*. 2008; 134 (1): 728–42.
- Huo Y, Guo X, Li H, Xu H, Halim V, Zhang W, Wang H, Fan YY, Ong KT, Woo SL, Chapkin RS, Mashek DG, Chen Y, Dong H, Lu F, Wei L, Wu C. Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increases fat deposition but protects against diet-induced insulin resistance and inflammatory responses. *J Biol Chem*. 2012; 287 (25): 21492–500.
- Tsushima Y, Matsuda K, Mori T, Inoue K, Nishizawa H, Tominaga M, Funahashi T, Shimomura I. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat. *PLoS One*. 2014; 9 (11): e112813.
- Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, Fujimura A. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology*. 2011; 152 (1): 1347–54.
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*. 2011; 121 (6): 2133–41.
- Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52 (1): 329–35.
- Duong HA, Robles MS, Knutti D, Weitz CJ. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. *Science*. 2011; 332 (1): 1436–9.
- Mueller MD, Vigne J-L, Minchenko AG, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors “α” and “β”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (20): 10972–7.
- Rega G, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, Kastl SP, Speidl WS, Weiss TW, Breuss JM, Furnkranz A, Uhrin P, Zaujec J, Zilberfarb V, Frey M, Roehle R, Maurer G, Huber K, Wojta J. Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27 (7): 1587–95.
- Red-Horse K, Ferrara N. Imaging tumor angiogenesis. *J Clin Invest*. 2006; 116 (10): 2585–7.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (5): 1011–27.
- Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (17): 5018–22.
- Minchenko OH, Kubaichuk KI, Minchenko DO, Kovalenska OV, Kulinich AO, Lypova NM. Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol*. 2014; 5(1): 1–22.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004; 25 (4): 581–611.
- Dews M, Homayouni A, Yu D., Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 2006; 38 (9): 1060–5.
- Barreto SC, Hopkins CA, Bhowmick M, Ray A. Extracellular matrix in obesity - cancer interactions. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015; 22 (2): 63–77.
- Zencir S, Ovee M, Dobson MJ, Banerjee M, Topcu Z, Mohanty S. Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 411 (4): 792–7.
- Wright JH, Johnson MM, Shimizu-Albergine M, Bauer RL, Hayes BJ, Surapichat J, Hudkins KL, Riehle KJ, Johnson SC, Yeh MM, Bammler TK, Beyer RP, Gilbertson DG, Alpers CE, Fausto N, Campbell JS. Paracrine activation of hepatic stellate cells in platelet-derived growth factor C transgenic mice: evidence for stromal induction of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2014; 134 (4): 778–88.
- Jonker JW, Suh JM, Atkins AR, Ahmadian M, Li P, Whyte J, He M, Juguilon H, Yin YQ, Phillips CT, Yu RT, Olefsky JM, Henry RR, Downes M, Evans RM. A PPARγ-FGF1

- axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature*. 2012; 485 (7398): 391-4.
22. Kingwell K. Obesity and diabetes: FGF1 goes long to tackle diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13 (9): 652-3.
 23. Li B, Pi Z, Liu L, Zhang B, Huang X, Hu P, Chevet E, Yi P, Liu J. FGF-2 prevents cancer cells from ER stress-mediated apoptosis via enhancing proteasome-mediated Nck degradation. *Biochem J*. 2013; 452 (1): 139-45.
 24. Ranieri D, Belleudi F, Magenta A, Torrisi MR. HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. *Int J Cancer*. 2015; 137 (1): 61-72.
 25. di Martino E, Taylor CF, Roulson JA, Knowles MA. An integrated genomic, transcriptional and protein investigation of FGFR1 as a putative 4p16.3 deletion target in bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52 (9): 860-71.
 26. Yoon H, Shin SH, Shin DH, Chun YS and Park JW. Differential roles of Sirt1 in HIF-1alpha and HIF-2alpha mediated hypoxic responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 444 (1): 36-43.
 27. Deng Q, Wang Q, Zong WY, Zheng DL, Wen YX, Wang KS, Teng XM, Zhang X, Huang J, Han ZG. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res*. 2010; 70(2): 782-91.
 28. Weijts BG, Bakker WJ, Cornelissen PW, Liang KH, Schaafsma FH, Westendorp B, de Wolf CA, Paciejewska M, Scheele CL, Kent L, Leone G, Schulte-Merker S, de Bruin A. E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J*. 2012; 31(19): 3871-84.
 29. Faubert B, Vincent EE, Griss T, Samborska B, Izreig S, Svensson RU, Mamer OA, Avizonis D, Shackelford DB, Shaw RJ, Jones RG. Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111 (7): 2554-9.
 30. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004; 306 (5695): 457-61.
 31. Bravo R1, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandro S. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013; 301: 215-90.
 32. Manié SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014; 307 (10): C901-7.
 33. Pluquet O, Dejeans N, Chevet E. Watching the clock: endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer. *Ann Med*. 2014; 46 (4): 233-43.
 34. Bochkov VN, Philippova M, Oskolkova O, Kadl A, Furnkranz A, Karabeg E, Breuss J, Minchenko OH, Mechtcheriakova D, Hohensinner P, Rychli K, Wojta J, Resink T, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via induction of VEGF, IL-8, COX-2 and ADAMTS-1 metalloprotease, implicating a novel role for lipid oxidation in progression and destabilization of atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2006; 99 (8): 900-8.
 35. Hose D, Moreaux J, Meissner T, Seckinger A, Goldschmidt H, Benner A, Mahtouk K, Hillengass J, Rème T, De Vos J, Hundemer M, Condomines M, Bertsch U, Rossi JF, Jauch A, Klein B, Möhler T. Induction of angiogenesis by normal and malignant plasma cells. *Blood*. 2009; 114(1): 128-43.
 36. Waltenberger J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37(Pt. 6): 1167-70.

Received 06.08.2015

Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі

М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: mariyka.t@gmail.com

Досліджено властивості електричної активності малих нейронів (з діаметром менше ніж 25 мкм) ганглія трійчастого нерва (ГТН) у первинній культурі. Залежно від відповіді на тривалу внутрішньоклітинну деполяризацію прямокутними поштовхами струму нейрони поділені на групи: адаптивні, тонічні та затриманої генерації потенціалів дії (ПД). Адаптивні нейрони у більшості випадків на початку стимулу генерували поодинокі ПД. Тонічні нейрони характеризувалися частотною генерацією ПД. Нейрони з затриманою генерацією відповідали поодиноким або серією ПД з затримкою на початку стимулу. Ця затримка лінійно зменшувалася зі збільшенням інтенсивності деполяризації. Нейрони з різними видами електричної активності відрізнялися електрофізіологічними та фармакологічними характеристиками. Тонічні нейрони мали відмінні відповіді на гіперполяризацію мембрани, а також найбільше значення входного опору (1104 ± 300 МОм, $n=16$) порівняно з нейронами затриманої генерації (716 ± 82 МОм, $n=6$) та адаптивними нейронами (746 ± 200 МОм, $n=10$). Нейрони з різними типами електричної активності достовірно відрізнялися за деякими показниками ПД: амплітуда ПД та слідова гіперполяризація, реобаза та поріг генерації ПД. У нейронів кожної групи помічена гетерогенність за показниками тривалості ПД, що підтверджено наявністю декількох піків у гістограмі розподілу цієї величини. Спостерігалась певна неоднорідність в частотних показниках тонічних нейронів. Це доводить гістограма розподілу максимальних частот, яка містить два піки. Аплікація тетродотоксину (ТТХ) в концентрації 500 нмоль/л призводила до повного або часткового пригнічення електричної активності, а в деякій частині клітин дія цього токсину не викликала ніяких змін. Нейрони з нечутливою до ТТХ імпульсною активністю генерували триваліший ПД ($3,6 \pm 1,1$ мс, $n=10$), ніж ті у яких спостерігалось повне пригнічення відповіді ($2,1 \pm 0,7$ мс, $n=7$). ТТХ не призводив до змін у нейронах з затриманою генерацією ($n=3$) та в більшій частині адаптивних нейронів (4 з 5). Наші експерименти показали, що ноцицепторам ГТН властиві різні види електричної активності, а одиниці, які генерують адаптивну, резистивну до ТТХ відповідь, у нативних умовах формують немієлінізовані волокна С-типу.

Ключові слова: нейрони ганглія трійчастого нерва; первинна культура; електрична активність; показники потенціалу дії; чутливість до тетродотоксину.

ВСТУП

Ганглій трійчастого нерва (ГТН) складається з сом нейронів аферентних волокон, що переносять сенсорну інформацію від механорецепторів, терморецепторів, ноцицепторів, м'язів обличчя, епітелію ротової, носової порожнини та рогівки ока [1, 2]. У роботах *in vivo* детально описано електрофізіологічні показники нейронів ГТН відповідно до типу модальності сигналу та швидкості проведення нервового імпульсу [3, 4]. Цей

© М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

ганглій, як усі сенсорні ганглії, складається з гетерогенних за морфологічними та електрофізіологічними показниками нейронів [5, 6]. Вивчення властивостей нейронів сенсорних волокон представляє великий інтерес, бо у більшості випадків порушення периферичних волокон призводять до змін в іонній провідності мембрани сом та нейритів, внутрішньоклітинних механізмах, синтезі білків та пептидів [7, 8]. Найбільше уваги приділяється ноцицепторам – нейронам,

волокна яких проводять больову інформацію. Це високопорогові немієлінізовані С- або мієлінізовані А δ -нервові волокна. Показано, що розмір клітини, показники електричної активності корелюють з модальністю сенсорного сигналу [5, 9]. Ці дані дають можливість в експериментах *in vitro* досліджувати властивості різних типів нейронів.

В електрофізіологічних дослідженнях показано, що для ноцицепторів сенсорних гангліїв характерна генерація тривалих потенціалів дії (ПД) з «горбом» на фазі реполяризації [3, 6]. Окрім електричних характеристик ноцицептори вирізняються такими фармакологічними показниками, як чутливість до капсаїцину, резистивність до тетродотоксину тощо [10–12]. Таким чином, прикладання деяких агентів є додатковими маркерами у визначенні типу нейрона.

Властивості електричної активності нейронів зручно вивчати на таких простих модельних біосистемах, як первинна культура дисоційованих клітин. Ця модель корисна для визначення повільних змін у клітинних та міжклітинних механізмах, вивчення впливу нейротропних факторів, які виконують нейротрофічну та нейропротекторну функції і, навпаки, відіграють ключову роль при невропатичних порушеннях [13, 14]. Однак для з'ясування впливу згаданих агентів потрібно дослідити електрофізіологічні показники цих нейронів у первинній культурі.

Мета нашої роботи – детально охарактеризувати електричну активність малих нейронів (діаметром менше ніж 25 мкм) та виділити ті з них, які своїми електрофізіологічними та фармакологічними показниками відповідають ноцицепторам.

МЕТОДИКА

Для приготування первинної культури нейронів виділяли ганглії однодобових щурів лінії Вістар обох статей та поміщали в розчин, що містив буфер HEPES, мінімальне середовище Ігла («Sigma», США) та ан-

тибіотики. Для ферментативної обробки використовували 0,2%-й розчин пронази («Sigma», США). Після цього етапу приготування препарат механічно дисоціювали пастерівськими піпетками різного діаметра. Клітини розвивалися при 37°C в повітряно-газовому середовищі, збагаченому CO₂ до 5%, розчин для культивування містив мінімальне середовище Ігла з додаванням 10% кінської сироватки («Gibco», США), 6 мкг/мл інсуліну («Sigma», США) 5 нг/мл фактора росту нервової тканини («Sigma», США) та антибіотиків. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на другу добу культивування цитозин-А-D-арабинофуранозиду (ARA-C) («Sigma», США) таким чином, щоб кінцева концентрація цього агента в розчині становила 7 мкмоль/л, заміну розчину здійснювали на наступну добу.

Експерименти виконували при кімнатній температурі на 15-18-ту добу культивування. Зразки культивованих клітин вміщували у камеру зі зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л.): NaCl – 140, KCl – 3, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10 (всі реактиви фірми «Sigma», США); pH 7,4 (доведено NaOH). Піпетки для відведення електричних відповідей нейронів заповнювали внутрішньоклітинним розчином, до складу якого входили (ммоль/л.): калій глюконат – 155, EGTA – 10, MgCl₂ – 2, HEPES – 10 (всі реактиви «Sigma», США); pH 7,3 (доводили KOH). Опір піпетки зі внутрішньоклітинним розчином становив 4 – 6 МОм. Для нейронів визначали середній розмір соми як середнє арифметичне значення великого і малого діаметрів.

Електрофізіологічні дослідження виконували на клітинах розміром менше ніж 25 мкм із застосуванням методу patch – clamp у конфігурації «ціла клітина». Для відведення відповідей від клітин використовували підсилювач Axopatch-1D («Axon Instruments», США). Сигнали оцифровували і записували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача DigiData 1322A і програмного

пакета pClamp 9.0 («Axon Instrumets», США) з частотою оцифровки 10 кГц. У режимі фіксації потенціалу контролювали якість контакту «мембрана – піпетка» за значенням сталої часу ємнісного струму у відповідь на прикладання коротких (10 мс) гіперполяризувальних прямокутних поштовхів напруги невеликої амплітуди (-10 мВ).

Мембранний потенціал визначали у режимі «фіксації струму» через декілька секунд після прориву мембрани за умови відсутності прикладання зовнішнього струму. У електрофізіологічні дослідження брали нейрони мембранний потенціал яких становив менше ніж -30 мВ. У відповідях на внутрішньоклітинні гіперполяризувальні поштовхи струму невеликої амплітуди (-10 – -3 пА) визначали вхідний опір та ємність мембрани. Викликану електричну активність ідентифікували у режимі «фіксації струму» за відповіддю на внутрішньоклітинні поштовхи струму тривалістю 2000 мс з інкрементом 10 пА. Деполаризацію та гіперполяризацію мембрани здійснювали від підтримуючого потенціалу -50 мВ, який досягали за допомогою пропускання через мембрану від'ємного струму.

Деякі активні показники (реобазу, поріг генерації потенціалу дії (ПД), амплітуда та тривалість ПД, амплітуда слідової гіперполяризації) обчислювали у реєстраціях, коли розпочиналася генерація поодиноких ПД. Якщо виникала серія ПД, то враховували параметри першого з них. Реобазу визначали як величину імпульсу струму, при якому починалася генерація ПД. Поріг генерації ПД – це значення потенціалу, при якому починає змінюватися похідна його за часом. Амплітуда ПД і слідової гіперполяризації дорівнювала різниці між порогом і максимальним, мінімальним відповідно значенням потенціалу. У розрахунок амплітуд не брали одиниці, які генерували патерн замість ПД. У разі генерації патерна брали тривалість ПД в середині відповіді. Для опису тонічної електричної активності аналізували зміну

середньої частоти від сили струму. Цей показник вимірювали на проміжку часу, коли частота набувала стаціонарного значення.

Для визначення впливу безкальцієвого розчину та тетродотоксину (ТТХ) використовували локальну суперфузію подачі розчинів [15]. ТТХ додавали в зовнішньоклітинний розчин таким чином, що його концентрація становила 500 нмоль/л, а безкальцієвий розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, MgCl₂ – 3, глюкоза – 10, HEPES – 10, EGTA-0,2 («Sigma», США); pH 7,4.

Результати перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро – Уїлка ($P < 0,05$) та подали як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення ($M \pm m$). Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) оцінювали за критерієм t Ст'юдента (при нормальному розподілі) та критерієм U Манна – Уїтні (при відмінності від нормального розподілення). Зміни параметрів ПД в безкальцієвому розчині порівнювали з контролем визначали за допомогою t тесту рівності/нерівності середніх у разі нерівних дисперсій ($P = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі клітини ($n = 194$) відповідно до типу електричної активності були поділені на групи: адаптивні, тонічні та затриманої генерації потенціалів дії (ПД) (рис.1). Адаптивні нейрони, кількість яких становила 38 % ($n = 74$), у відповідь на зростаючі поштовхи струму генерували декілька ПД (1 – 3). Тонічні нейрони (58 %, $n = 113$) у відповідь на деполаризувальні поштовхи струму генерували серію ПД протягом усього стимулу без помітної адаптації. У 4 % ($n = 7$) нейронів електрична активність характеризувалася затримкою генерації ПД на початку стимулу (див. рис.1). Подальша деполаризація у всіх нейронах призводила до зриву генерації ПД. Ці типи електричної активності були описані на свіжодисоційованих нейронах та в цілому організмі [3 – 5, 16].

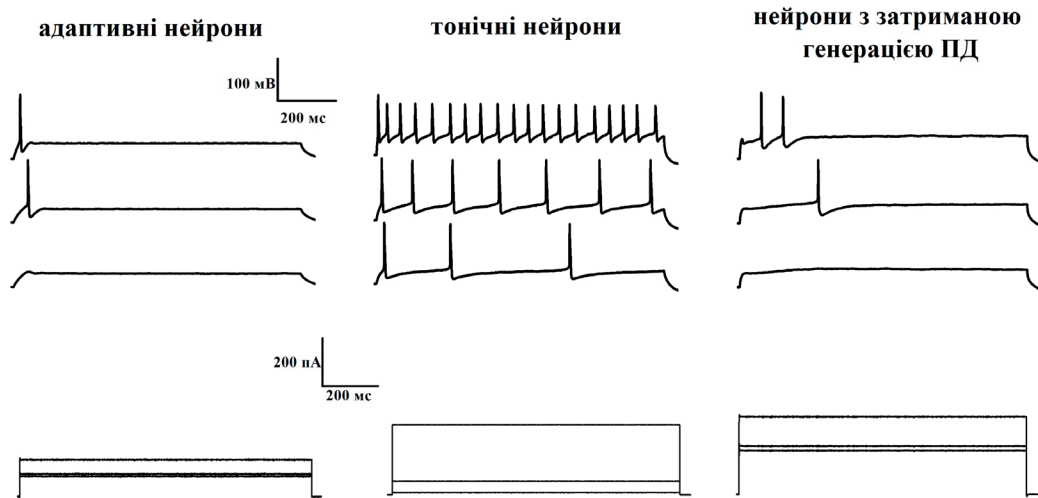


Рис. 1. Характерні відповіді на зростаючі деполаризувальні поштовхи струму, за якими поділено нейрони ганглія трійчастого нерва: адаптивні, тонічні нейрони, нейрони з затриманою генерацією потенціалів дії

Такі пасивні електричні показники, як потенціал спокою (V_m), вхідний опір (R_{in}) та ємність мембрани (C_m) наведені в табл. 1. Ці характеристики клітин з різними типами імпульсної активності помітно не відрізнялися. Лише клітини з тонічною імпульсною активністю мали найбільше значення вхідного опору, що відображалось у малому значенні реобазис (див. табл. 1, табл. 2).

У відповідь на гіперполяризувальні поштовхи струму в наших експериментах практично всі нейрони ГТН (96%, $n=190$) генерували «вигин» на початку зміни мембранного потенціалу з поверненням до стаціонарного стану (рис. 2, а). У літературних джерелах подібні відповіді на гіперполяризацію називаються аномальним випрямленням мембрани, що залежить від часу [12]. Кількісно аномальне випрямлення, що залежить

від часу, оцінювали за формулою

$$\eta = \frac{U_{peak} - U_{steady}}{U_{peak}} \cdot 100\%$$

де η - коефіцієнт аномального випрямлення, U_{peak} - мінімальне значення потенціалу у піку вигину, U_{steady} - стаціонарне значення у реєстраціях в період гіперполяризації. Під час експерименту мембрану нейрона гіперполяризували імпульсом струму амплітудою, достатньою для досягнення піку потенціалу на мембрані -120 мВ і потім продовжували гіперполяризацію з інкрементом 10 пА. Вважається, що нейронам властиве аномальне випрямлення, якщо значення його коефіцієнта більше ніж 5% за умови, що U_{peak} знаходиться в межах -120 – -100 мВ [12]. Вищеописаний коефіцієнт обчислювали при різних рівнях гіперполяризації, де U_{peak} лежало в межах: -120 – -110 мВ;

Таблиця 1. Пасивні параметри нейронів ганглія трійчастого нерва з різними типами електричної активності ($M \pm m$)

Показник	Тонічні нейрони	Адаптивні нейрони	Нейрони затриманої генерації
Вхідний опір, МОм	1104 ± 300 (n=16)	746 ± 200 (n=10)*	716 ± 82 (n=6)*
Мембранний потенціал, мВ	-42 ± 6 (n=16)	-46 ± 7 (n=10)	-44 ± 8 (n=6)
Розмір, мкм	19 ± 1 (n=16)	19 ± 2 (n=10)	20 ± 1 (n=6)
Ємність, пФ	32 ± 8 (n=16)	28 ± 7 (n=10)	27 ± 5 (n=6)
Коефіцієнт аномального випрямлення, %	44 ± 9 (n=37)	24 ± 7 (n=16)*	20 ± 7 (n=6)*

* $P < 0,05$ відносно групи тонічних нейронів.

Таблиця 2. Деякі характеристики першого потенціалу дії (ПД) у відповіді на деполяризувальний поштовх струму пораховані для підгруп тонічних нейронів, груп адаптивних нейронів та нейронів затриманої генерації ($M \pm m$)

Показники	Тонічні нейрони		Адаптивні нейрони	Нейрони з затриманою генерацією ПД
	підгрупа 1	підгрупа 2		
Реобазис, пА	17 ± 2 (n = 57)	10 (n=56)*	81 ± 28 (n=74)*, **	68 ± 14 (n=8)*, **
Поріг генерації ПД, мВ	-25 ± 7 , (n = 35)	-32 ± 5 , (n=56)*	-22 ± 7 , (n=74)*, **	-17 ± 7 (n=7)*, **, ***
Амплітуда ПД, мВ	102 ± 2 , (n = 57)	112 ± 9 , (n=45)	96 ± 11 , (n = 74)*, **	86 ± 9 , (n=8)*, **, ***
Амплітуда слідової гіперполяризації, мВ	-29 ± 6 , (n = 57)	-18 ± 6 (n=56)*	-32 ± 8 , (n=74)*, **	-40 ± 5 , (n=8)*, **, ***

* $P < 0,05$ відносно першої підгрупи тонічних нейронів; ** $P < 0,05$ відносно другої підгрупи групи тонічних нейронів; *** $P < 0,05$ відносно групи адаптивних нейронів

-110 – -100 мВ; -100 – -90 мВ; -80 – -90 мВ (див. рис. 2, б). Подібне співвідношення часток нейронів, у яких спостерігається аномальне випрямлення, показано на зрізах ГТН морської свинки [16]. Значення цього показника за умови, що пік «вигину» лежить в межах -120 – -100 мВ найбільше у тонічних нейронів (див. табл. 1). У дослідженнях *in vivo* показано, що у значній частині нейронів, більшість яких формують С-волокна, аномальне випрямлення, що залежить від часу відсутнє [4,13]. У нашій роботі показано, що

при незначній гіперполяризації мембрани «вигин» у відповідях був малопомітний для адаптивних нейронів та нейронів з затриманою генерацією (див. рис.2, б) Аномальне випрямлення, що залежить від часу в сенсорних нейронах, пояснюється експресією потенціалзалежних іонних каналів, що активуються гіперполяризацією. За літературними даними, виявлено чотири підтипи цих каналів, які відрізняються фармакологічними і кінетичними характеристиками [17]. Всі підтипи вищеописаних

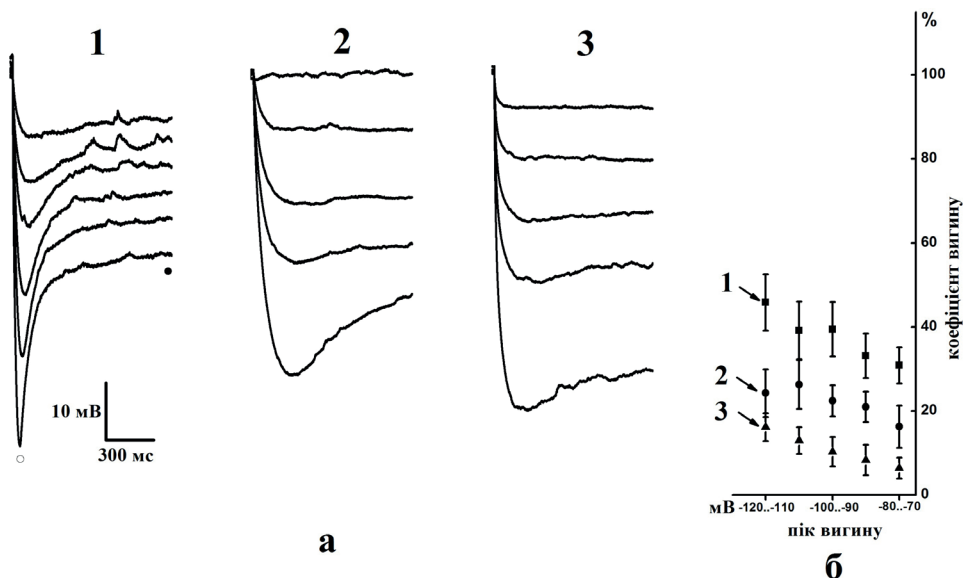


Рис.2. Зміни мембранного потенціалу у відповідь на гіперполяризувальні поштовхи струму: а - нейрони тонічні(1), адаптивні(2) та затриманої генерації(3) по різному відповідали на гіперполяризацію мембрани. Головною особливістю цих відповідей є «вигин» (○), який поступово переходить у стаціонарний стан (●); б – значення коефіцієнтів аномального випрямлення, що залежить від часу при різних рівнях гіперполяризації для 11 тонічних, 7 адаптивних та 3 нейронів затриманої генерації потенціалів дії

каналів експресуються в нейронах ГТН [18, 19]. Наявність або відсутність різних типів цих каналів спричинює відмінності у кінетиці відповідей. Відомо також, що ці канали відіграють важливу роль у генерації імпульсної активності нейронів сенсорних гангліїв [17, 18].

Більша частина нейронів генерувала ПД з «горбом» на фазі реполяризації. Це доводить наявність додаткової від'ємної компоненти у кривій похідної по часу від ПД (рис.3, а). Для нейронів кожної групи тривалість ПД (час між точками коли потенціал становив 10 % від максимального значення)

варіювалася від двох до десяти мілісекунд. При зазначеному рівні значущості такий показник розподілений не за нормальним законом. Гістограма розподілу цієї величини для адаптивних нейронів містить два піки, що свідчить про негомогенність цієї популяції (див. рис.3, б). Для тонічних нейронів спостерігалася аналогічна неоднорідність (гістограми розподілу не представлені). Вибірки показників окремого ПД клітин з різною електричною активністю означених груп достовірно описувалися законом Гаусса і середні значення відрізнялися (див. табл. 2). У тонічних нейронів зареєстровано

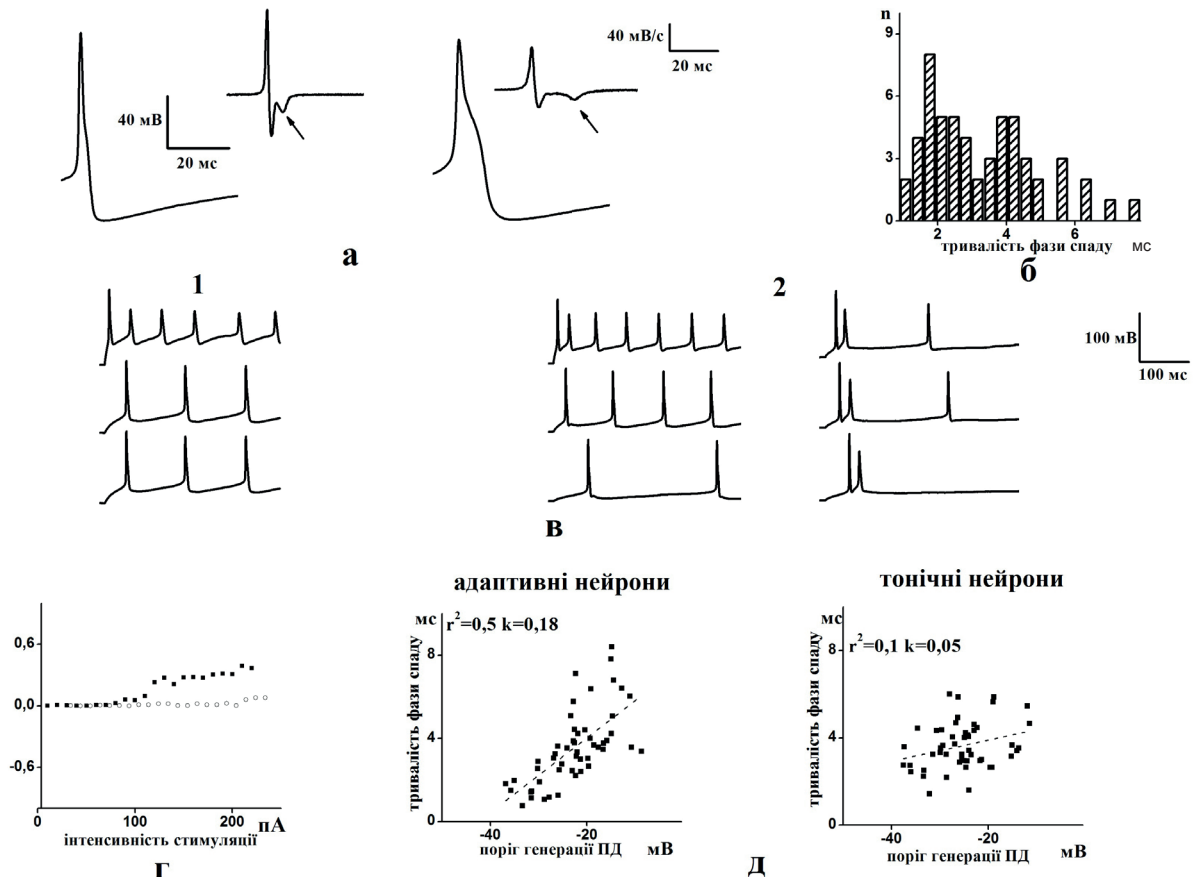


Рис.3. Особливості активних параметрів нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН): а – приклади форм потенціалів дії (ПД) для адаптивних нейронів ГТН. Для кожного прикладу ПД наведено швидкість зміни потенціалу. Стрілка вказує додаткову від'ємну компоненту, яка доводить наявність «горба» на фазі спаду; б – розподіл стаціонарних значень тривалостей ПД для адаптивних нейронів ($n=55$); в – приклади початку реєстрації відповіді тонічних нейронів на деполяризацію, за якими їх поділено на дві підгрупи 1 та 2; г – залежності коефіцієнта β від інтенсивності деполяризації мембрани для тонічних нейронів двох підгруп; д – взаємозв'язок тривалості фази спаду та порогом генерації ПД для адаптивних та тонічних нейронів. Для вищевказаних наведено графіки лінійної регресії та значення квадрата коефіцієнта регресії (r^2). Нахил для адаптивних нейронів був значно крутіший ніж для тонічних ($P = 0,05$)

два типи відповідей на деполяризацію, які мали відмінності на початку реєстрації. Тому цю групу поділено на дві підгрупи. Нейрони першої підгрупи замість першого ПД генерували патерн, який продовжувався серією однакових ПД (див. рис. 3, в). Якщо «на око» цей патерн неможливо було виділити, тоді використовували залежність

$$\beta = \frac{AP_2(I) - \langle AP \rangle(I)}{AP(I)} \cdot 100\%$$

де AP_2 , $\langle AP \rangle$ - амплітуда другого та усередненого ПД в середині реєстрації, I - сила імпульсу струму, що пропускалася через мембрану нейрона. Для першої групи ця залежність залишалася незмінною, на відмінну від другої, де спостерігалася зміна зі збільшенням струму (див. рис.3, г).

У літературних джерелах форму ПД пов'язують з типом сенсорного сигналу, а «горб» на фазі спаду слугує основною ознакою ноцицептивності. За результатами наших досліджень використання згаданої ознаки для ідентифікації типу модальності притаманного таким нейронам недостатньо. Тому в своєму аналізі ми використали іншу властивість ноцицепторів: нейронам С-волокон характерний найнижчий поріг генерації і триваліший ПД [10, 11]. Саме тому було проаналізовано залежність тривалості

фази спаду від порогу генерації ПД: нейрони з найнижчим порогом мають триваліший ПД. Ця тенденція спостерігається для всіх типів нейронів. Однак у адаптивних нейронів коефіцієнт нахилу відрізнявся від тонічних на порядок і діапазон значень тривалостей ПД був значно ширший (див. рис.3, д).

Отримані результати вказують на те, що адаптивні нейрони складаються з одиниць, які залучені до проведення різного виду сенсорного сигналу. Отже, аналіз активних показників показав гетерогенність за формою ПД в межах однієї групи або підгрупи нейронів. Ця різноманітність може бути пояснена різною модальністю сенсорного сигналу, яка властива нейронам ГТН *in vivo* або з місцем знаходження рецептивного поля. Наприклад, сомат сенсорних С- та А δ - волокон з відмінними параметрами ПД від рогівки ока характерна адаптивна відповідь на тривалу деполяризацію [4].

Важливою характеристикою для сигнальної функції нейрона є залежність «вхід-вихід», у наших експериментах – це властивості генерації ПД від сили струму. При зазначених умовах тонічних нейронів незалежно від підтипу, середня частота генерації ПД лінійно зростала до максимального стаціонарного значення, подальша деполяризація призводила до зриву генерації (рис. 4, а). Значення

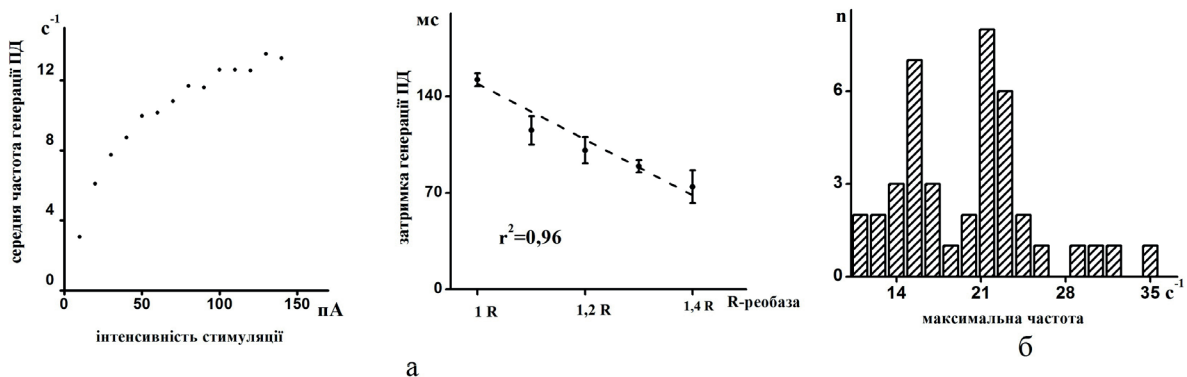


Рис.4. Властивості електричної активності тонічних та нейронів з затриманою генерацією потенціалів дії (ПД): а – залежність «вхід – вихід» для середньої частоти тонічних нейронів (1) та затримки генерації ПД для нейронів з затриманою генерацією ПД (2) від інтенсивності деполяризації. Для нейронів з затриманою генерацією ПД наведено середні значення затримки генерації ПД залежно від різних значень реобазиса (n=4); б – розподіл максимальних частот генерації ПД у тонічних нейронів (n = 42)

максимальної частоти для різних клітин становили від 8 до 21 Гц. Гістограма розподілу цього показника містить два піки, що доводить наявність декількох популяцій у множині тонічних нейронів (див. рис.4, б). Більшість адаптивних нейронів на деполяризацію генерували поодинокі ПД. У нейронів затриманої генерації ПД зменшувалася затримка на початку відповіді за лінійним законом при деполяризації мембрани (див. рис.4, в).

Перевірено дію безкальцієвого розчину на імпульсну активність 19 нейронів ГТН. Зменшення концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині помітно змінювало показники імпульсної активності. Незалежно від типу електричної активності спостерігалися комплексні зміни в показниках ПД: пригнічення «горба» на фазі спаду, зменшення амплітуди ПД, помітне пригнічення амплітуди слідової гіперполяризації (рис.5, а). Достовірні від-

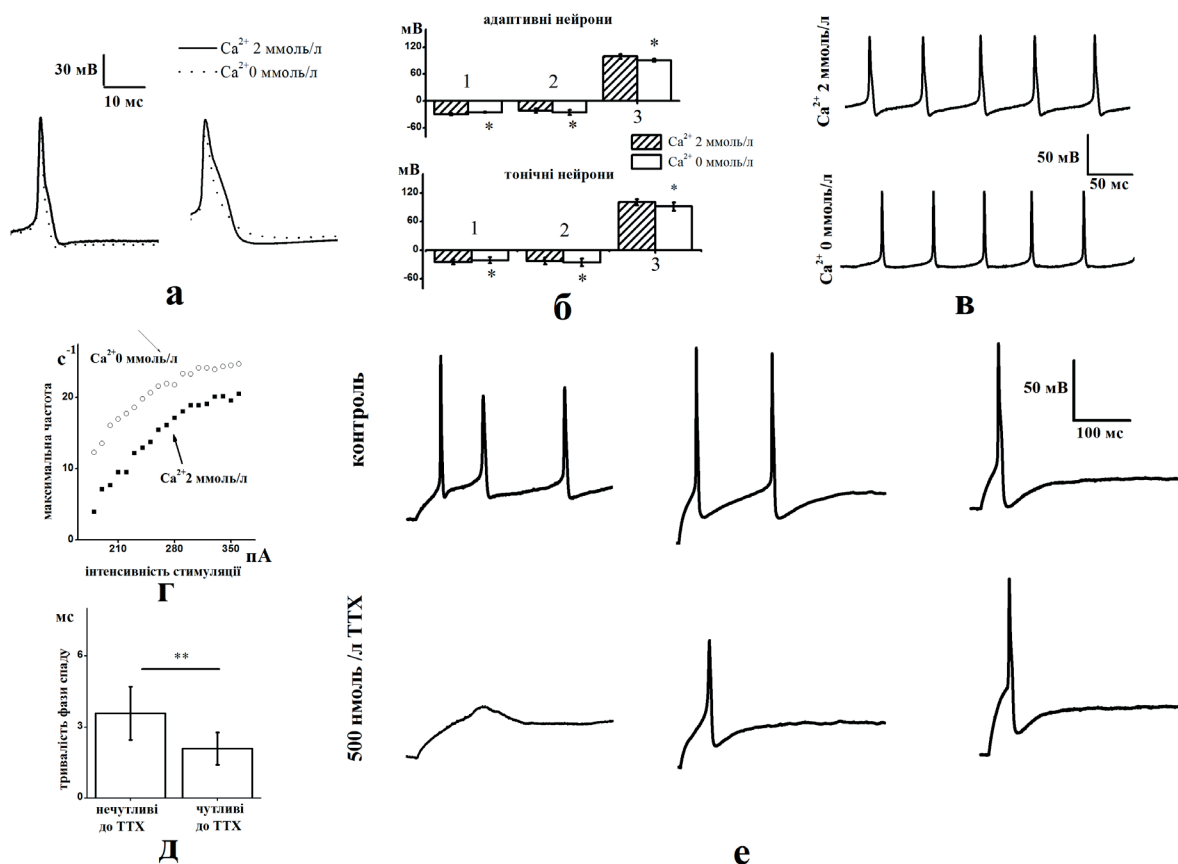


Рис.5. Дія безкальцієвого розчину та тетродотоксину (ТТХ) на електричну активність нейронів ганглія трійчастого нерва: а – зміни форми потенціалів дії (ПД), які спостерігалися при зменшенні концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині; б – порівняння деяких показників ПД адаптивних та тонічних нейронів при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л: 1 – амплітуда слідової гіперполяризації (5 адаптивних та 5 тонічних нейронів), 2 – поріг генерації ПД (7 адаптивних та 10 тонічних нейронів), 3 – амплітуда ПД (4 адаптивних та 7 тонічних нейронів); в – характерні відповіді тонічних нейронів на деполяризацію при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л; г – залежність середньої частоти від амплітуди деполяризуючого поштовху струму при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л; д – порівняння тривалостей фаз спаду ПД нейронів, у яких аплікація ТТХ не призводило до змін електричної активності або пригнічення було частковим (n=10) з тими, у яких спостерігалася повна нівеляція електричної активності (n=7); е – дія ТТХ на електричну активність нейронів ГТН. * $P = 0,05$ порівняно з відповідними показниками при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л; ** $P < 0,05$ між тривалостями фаз спаду (U тест Манна-Уїтні)

мінності визначено у зміщенні до більш негативних значень порога генерації ПД, пригнічення амплітуди слідової гіперполяризації та зменшення амплітуди ПД (див. рис.5, б). Для чотирьох з семи тонічних нейронів вплив безкальцієвого розчину проявлявся збільшенням частотних характеристик (див. рис. 5 в, г). Таким чином, зменшення концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині призводить до модуляції електричної активності нейронів ГТН. Пригнічення горба на фазі реполяризації та зниження порогу генерації свідчить про наявність низькопорогових та високопорогових кальцієвих каналів [20]. Зміни у слідовій гіперполяризації та частотних характеристиках вказують на активність кальційзалежних калієвих каналів [21].

Перевірено дію ТТХ в концентрації 500 нмоль/л на імпульсну активність 20 нейронів ГТН. Показано, що у тонічних нейронах (n=7) спостерігається повне пригнічення імпульсної активності. При дії цього токсину у таких нейронах залишається ледь помітний потенціал (див. рис.5, е). У адаптивних (n=1) та тонічних нейронах (n=5) аплікація ТТХ частково пригнічувала імпульсну активність (див. рис. 4, г). Аплікація цього токсину не змінювала електричну активність адаптивних (n=4) та нейронів затриманої генерації (n=3) (див. рис. 5, г). Помічена відмінність між нейронами з різною чутливістю до ТТХ: клітини, що повністю або частково нечутливі до цього токсину, генерували триваліший ПД, ніж ті, у яких імпульсна активність пригнічувалася його дією (див. рис.5, д). Така різниця додатково доводить, що імпульсній активності ноцицепторів властива нечутливість до ТТХ [11]. Експресія в мембрані потенціалзалежних кальцієвих та ТТХ-резистивних натрієвих каналів може бути причиною генерації відповідей за наявності ТТХ [11, 20]. Отримані результати збігаються з даними експериментів *in vivo* на нейронах ГТН миші, у яких спостерігалася повне або часткове пригнічення імпульсної активності за наявності ТТХ у сомах Аδ-

волокон. Зміни були відсутні у одиниць, що формують С-волокна [4]. Таким чином, нейрони з адаптивною, резистивною до ТТХ відповіддю, належать до групи ноцицепторів, нейрити яких формують С-волокна. Нечутливими до ТТХ виявилися також нейрони з затриманою генерацією ПД, проте дослідження на свіжодисоційованих нейронах показали, що значна частина цих клітин є нечутливими до капсаїцину, агента, який є маркером ноцицепторів [5].

Отже, маленькі нейрони – гетерогенні за електрофізіологічними властивостями та чутливістю до ТТХ. Всі типи зареєстрованої електричної активності є ідентичними тим, які зареєстровані в сомах С- та Аδ-волокон. Нейрони з одним типом імпульсної активності мають відмінні показники, що може вказувати на належність клітин до різних видів проведення сенсорного сигналу. Це підтверджується неоднаковою чутливістю до блокатора натрієвих каналів ТТХ. Наші дослідження доводять, що частина нечутливих до ТТХ адаптивних нейронів в нативних умовах формують С-волокна.

M.V. Telka, O.V. Rikhalsky, N. S.Veselovsky

EXCITABILITY PROPERTIES OF TRIGEMINAL GANGLION NEURONS

The firing properties of small neurons (with diameters of soma less than 25 μm) were investigated using patch-clamp technique in whole-cell configuration in primary culture of trigeminal ganglia (TG) of postnatal rats. TG neurons were divided into three groups according to their firing responses to long-lasting depolarizing pulses: adaptive neurons (AN) characterized by a strongly adaptive responses; tonic neurons (TN) characterized by a multiple tonic firing; neurons with a delay before initiation of AP generation, namely, NDG. AN, TN and NDG also differed in AP electrophysiological and pharmacological characteristics. TN was distinguished by responses to hyperpolarization and the greatest value of input resistance. TN, AN and NDG were characterized by different active properties (amplitude of action potential and afterhyperpolarization, reobase, threshold). Each group of neurons was characterized by heterogeneity of AP duration and of frequency properties for TN. The application of tetrodotoxin (TTX) (250 nM) resulted in full or partial inhibition of AP generation and some neurons had TTX – insensitive firing responses. Neurons that were not affected by TTX had markedly longer AP. TTX

had no effect on electrical activity of some AN and NDG. Based on sensitivity to TTX and their electrophysiological properties, AN and NDG seem to be C-fiber nociceptors.

Key words: trigeminal ganglion neurons; primary culture; types of firing response; parameters action potentials; sensitivity to tetrodotoxin (TTX).

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

**М.В. Телька, О.В. Рихальский,
Н.С. Веселовский**

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГАНГЛИЯ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА

Исследованы свойства электрической активности маленьких нейронов (диаметром меньше чем 25 мкм) ганглия тройничного нерва (ГТН) в первичной культуре. В зависимости от ответа на длительную внутриклеточную деполяризацию прямоугольными толчками тока нейроны были разделены на группы: адаптивные, тонические и задержанной генерации потенциалов действия (ПД). Адаптивные нейроны в большинстве случаев генерировали несколько ПД в начале стимула. Основная характеристика тонических нейронов - это частотная генерация ПД. Нейроны задержанной генерации отвечали одиночными или сериями ПД с задержкой в начале стимула. Эта задержка линейно уменьшалась с увеличением силы стимула. Нейроны с разной импульсной активностью отличались электрическими и фармакологическими характеристиками. Пассивными параметрами выделялись тонические нейроны. Эти клетки имели отличные от других ответы на гиперполяризацию мембраны и наибольшее значение входного сопротивления (1104 ± 300 МОм, $n = 16$) по сравнению с нейронами задержанной генерации (716 ± 82 МОм, $n = 6$) и адаптивными нейронами (746 ± 200 МОм, $n = 200$). Нейроны с разной электрической активностью достоверно отличались по некоторым параметрам ПД (амплитуда ПД и следовой гиперполяризации, реобазис и порог генерации ПД). У нейронов каждой группы наблюдалась гетерогенность за длительностью ПД, что подтверждалось наличием нескольких пиков в гистограмме распределения этой величины. Также замечена неоднородность в частотных характеристиках, это доказывается гистограммой распределения максимальных частот, которая содержала два пика. Аппликация тетродотоксина (ТТХ) в концентрации 500 нмоль/л приводила к полному или частичному угнетению электрической активности, в некоторой части нейронов не наблюдалось изменений. Нейроны с резистивной к ТТХ импульсной активностью, генерировали более длительный ПД ($3,6 \pm 1,1$, $n = 10$), чем те у которых наблюдалось полное угнетение ответа ($2,1 \pm 0,7$, $n = 7$). ТТХ не влиял на электрическую активность в большей части адаптивных нейронов (4 из 5) и во всех

нейронах задержанной генерации (3). Таким образом наши эксперименты указывают на то, что единицы, которые генерируют адаптивный резистивный к ТТХ ответ, в нативных условиях формируют немиелинизированные волокна С-типа.

Ключевые слова: нейроны ганглия тройничного нерва; первичная культура; электрическая активность; параметры потенциала действия; чувствительность к тетродотоксину.

REFERENCES

1. Darian-Smith I, The trigeminal system. In: Iggo A, editor. Handbook of sensory physiology, somatosensory system. Berlin: Springer; 1973. P. 271 – 314
2. Kruger L, Young R. F. Specialized features of the trigeminal nerve and its central connection. In Samii M, Janeta PT editors. The cranial nerves. Berlin: Springer; 1981. P. 273 – 301.
3. Boada MD. Relation between electrophysiology signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. J Neurophysiol. 2013; 109: 749-57.
4. Lopez de Armentia M, Cabanes C, Belmonte C. Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. Neuroscience. 2000; 101(4): 1109-15.
5. Catacuzzeno L, Fioretti B, Pietrobon D, Franciolini F. The differential expression of low-threshold K^+ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurons. J Physiol. 2008; 21(586): 5101 –18.
6. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurons in the rat in vivo. J Physiol. 2005; 3 (565): 927 – 943.
7. Abdulla FA, Smith PA. Ectopic α_2 -adrenoceptors couple to N-type Ca^{2+} channels in axotomized rat sensory neurons. J Neurosci. 1997; 17(5): 1633-41.
8. Takeda H, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. Molecular pain. 2011; 7(5) : 2013-20.
9. Haper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in dorsal root ganglion neurons. J Physiol. 1985; 359: 31-46.
10. Fitzgerald M, Fulton BP. The physiological properties of developing sensory neurons. In: Scott SA editor. Sensory neurons : diversity, development and plasticity New York: Oxford; 1992. P. 287-306.
11. Strassman AM, Raymond SA. Electrophysiological evidence for tetrodotoxin-resistance sodium channels in slowly conducting dorsal sensory fibers. J Neurophysiol. 1999; 81: 416-24.
12. Cabanes C, Lopez de Armentia M, Viana F, Belmonte C. Postnatal changes in membrane properties of mice trigeminal ganglion neurons. J Neurophysiol. 2002; 87: 2398-407.

13. Kitamura N, Konno A, Kuwahara T, Komagiri Y. Nerve growth factor-induced hyperexcitability of rat sensory neurons in culture. Biomedical research 2005; 26(3):123-30.
14. Passmore GM. Dorsal root ganglion neurons in culture: a model system for identifying novel analgesic targets. J Pharmacol and Toxicol Methods 2005; 51:201-8.
15. Veselosky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. Pfluger Arch. 1996; 432(2): 351-4.
16. Puil E, Spigelman I. Electrical physiological responses of trigeminal root ganglion neurons in vitro. Neurosci. 1988; 24(2):635-46.
17. Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu Rev Physiol. 2002;63: 235-57.
18. Cho HJ, Staikopoulos VS, Ivanusic JJ, Jennings EA. Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated 4(HCN4) protein is expressed in subset of rat dorsal root and trigeminal ganglion neurons. Cell tissue Res. 2009; 338: 171-7.
19. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation current: from molecules to physiological function. Annu Rev Physiol. 2007; 579:1-14.
20. Kim HC, Chung MK. Voltage-dependent sodium and calcium current in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. J Neurophysiol. 1999; 81:1123-34.
21. Louise Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contribution to neuronal function. Neuroscientist 2003; 9:181-194.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.11.2015*

Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus

O.S. Zapukhliak, V.O. Kachanovska, E.V. Isaeva, O.V. Netsyk, D.S. Isaev

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: dmytro.isaev@gmail.com*

Decreasing of surface charge screening near voltage-gated ion channels via reduction of extracellular cation divalent ions provide potent mechanism of altering cellular excitability and seizure threshold. Spontaneous field potentials were recorded from horizontal brain slices of young Wistar rats (postnatal day 10-12). Extracellular registrations were obtained from CA1 and CA3 area of hippocampus. For induction of nonsynaptic epileptiform activity slices were perfused with artificial cerebrospinal fluid with omitted Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. Effect of different Mg^{2+} concentration (1, 2, and 3 mmol/l) on initial stage of nonsynaptic epileptiform discharges was studied. Our results suggest that the change in Mg^{2+} concentration dramatically affects the probability of induction of low- Ca^{2+} seizure-like activity (SLA), providing evidence that Mg^{2+} can alter cerebral excitability by affecting the surface charge and supporting the idea that surface charge could be a pharmacological target for anti-epileptic treatment.

Key words: low- Ca^{2+} seizure-like activity; surface charge; magnesium; hippocampus.

INTRODUCTION

Epileptic seizures are characterized by the abrupt and highly synchronous discharge of the neuronal net. During the seizures large neuronal aggregates are involved into excessive highly synchronized discharges that last several seconds or minutes [1]. It is well established that excitatory synaptic connections mediate the initiation and propagation of the epileptiform discharges [2]. However, *in vitro* experiments have shown that ictal epileptiform activity can be evoked in the absence of active chemical synaptic transmission [3]. In the 1980s two reports were published, each describing a dramatic form of neuronal synchronization in hippocampal slices exposed to media containing low concentration of Ca^{2+} [4, 5]. Later it was shown that not only CA1, but under certain conditions CA3 zone of the hippocampal slices could generate large and highly synchronized discharges that could last for many seconds [6]. These experiments revealed that epileptiform activity could have nonsynaptic origin, however it remained unclear

which of the effects of reduction of extracellular Ca^{2+} can account for abnormal neuronal synchronization. Four types of nonsynaptic mechanisms are generally considered to account for neuronal synchronization: a) ephaptic transmission (between clusters of neurons with closely opposed membranes); b) field effects (during synchronous neuronal activity of large groups of neurons with a suitable, usually parallel, arrangement); c) electrotonic coupling through gap junctions; d) extracellular ions fluctuations (such as increase in K^+) [7]. Altogether these nonsynaptic mechanisms dramatically alter neuronal excitability and exert influence on seizure threshold. Field effects and ion fluctuations may have modest effects during physiological activity but have a significant impact on epileptic seizures, and can sustain them in the absence of synaptic transmission. It is known, that field effects can contribute to seizure generation *in vivo* in a number of other clinical situations [8]. Infusion of low- Ca^{2+} solutions into brains of cats and other laboratory animals causes

© O.S. Zapukhliak, V.O. Kachanovska, E.V. Isaeva, O.V. Netsyk, D.S. Isaev

seizures [9, 10]. Humans with low levels of extracellular Ca^{2+} can also develop seizures. For instance, convulsions can occur with vitamin D deficiency or hypoparathyroidism in which total blood Ca^{2+} concentration falls from its normal value [11].

At the cellular level, the hallmark feature of epileptiform activity is neuronal hyperexcitability. Surface charge on the cellular membrane produced by sialic acid, phosphates, charged lipids, charged amino acids, and other hydrophilic residues of channel proteins creates local electrical fields near the channel voltage sensor [12]. The effect of surface charge on the membrane channel can be assessed by changing extracellular concentrations of cations, which produce a screening effect on surface charge. Decreasing extracellular Ca^{2+} or increasing the amount of extracellular negatively charged polysialic acids results in a significant hyperpolarizing shift of activation of voltage-gated Na^+ -channels [12, 13, 14]. In the present study, we investigated the effect of various Mg^{2+} concentrations in the extracellular solution on the probability to evoke seizure activity, its delay time and pattern of discharges.

METHODS

Animals. Wistar rat pups of postnatal day 12 (P12) were used throughout the study and treated in accordance with the guidelines set by the Animal Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine.

Slice preparation. Animals were deeply anesthetized with sevoflurane and decapitated. Brain was rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebro-spinal fluid (aCSF). Cerebellum and frontal lobe of the brain were removed and transverse brain slices (500 μm) were cut using vibroslicer [12]. The resulting slices were then transferred to the incubation chamber and left to recover for at least one hour before the experiment at room temperature. All manipulations were performed in constantly oxygenated (95% O_2 – 5% CO_2) aCSF of the

following composition (mmol/l): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 1.25 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 11 glucose, pH=7.35. All drugs were obtained from “Sigma” (USA).

Extracellular recordings. Spontaneous field potential recordings were obtained from CA1 and CA3 pyramidal cell layers of rat hippocampus, using glass micropipettes (2–5 M Ω) filled with aCSF. For induction and record of nonsynaptic SLA slices were transferred to the submersion-type chamber and perfused with the low- Ca^{2+} solution containing (mmol/l): 115 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 1.25 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 10 glucose, pH=7.4 (oxygenated with carbogen). Recordings were amplified with a differential amplifier, digitized at 10 kHz using an analog-to-digital converter and stored using WinWCP program. All records were made at room temperature (24–25°C). A total of 57 hippocampal slices was used throughout the study. The first group of slices (n=10) was perfused with low- Ca^{2+} solution where MgCl_2 was omitted from the perfusion solution. In subsequent recordings MgCl_2 was added to the low- Ca^{2+} aCSF in concentration of 1 mM (n=24), 2 mM (n=12) and 3 mM (n=11).

Data analysis. Off-line analysis was performed using Clampfit 10.2 (Axon Instruments), Origin 8.5 (OriginLab Northampton, MA). All data was represented as means \pm Se.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study we evaluated the role of surface charge in generation of nonsynaptic epileptiform discharges. The most dramatic example of nonsynaptic synchronization in mammals is the “field burst” [4] in hippocampal slices maintained *in vitro*, after chemical synaptic transmission has been blocked by removing extracellular Ca^{2+} [4, 5, 15–17]. Both extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration affect neuronal excitability by charge screening, where divalent cations attracted to negative charges on the neuronal membrane tend to increase the electric field that is sensed by channels within

the membrane. Lowering the concentration of divalent cations reduces charge screening and reduces the field acting across the membrane that has the same effect as depolarizing the cell [7]. As we could not change Ca^{2+} concentration due to nature of the epileptic model, we altered extracellular Mg^{2+} concentration.

Perfusion hippocampal slices with low- Ca^{2+} artificial CSF resulted in occurrence of spontaneous epileptiform discharges both in

CA1 and CA3 hippocampal areas. However, the obtained probability of inducing nonsynaptic SLA in CA1 and CA3 zones was different depending on Mg^{2+} concentration in low- Ca^{2+} aCSF. Low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} solution induced nonsynaptic bursting in 50% of recorded slices (5/10) (Fig. 1). Epileptiform discharges occurred within delay time of 17 ± 5 min in CA1 and 19 ± 12 min in CA3 zones. These nonsynaptic discharges represented population spikes that either were firing continuously or were arranged in bursts that could appear in clock like manner (Fig. 1A). The frequency of population spikes in low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} solution was 0.75 ± 0.01 Hz in CA1 and 0.64 ± 0.02 in CA3 zone.

Next, we perfused hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF with 1mmol Mg^{2+} . Under these conditions nonsynaptic bursting was induced in 30% of recorded slices (6/18) (Fig. 1B) with the latency of 26 ± 4.5 min and 16 ± 3.6 min in CA1 and CA3 pyramidal layer respectively. Population spikes had frequency of 0.72 ± 0.06 Hz in CA1 and 0.7 ± 0.04 Hz in CA3 hippocampal area.

Perfusion of hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF containing 2mmol Mg^{2+} caused nonsynaptic bursting in 20% of recorded slices (2/10) (Fig. 1B). Under these conditions, population spikes were observed only in CA1 zone and had frequency of 0.59 ± 0.07 Hz.

We failed to induce spontaneous nonsynaptic bursting by perfusion hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF containing 3mmol Mg^{2+} ($n=11$).

We showed that induction of nonsynaptic bursting in CA1 pyramidal layer is less influenced by an increase in extracellular magnesium concentration. It is known that low- Ca^{2+} field bursts occur in parts of the brain with tightly laminar

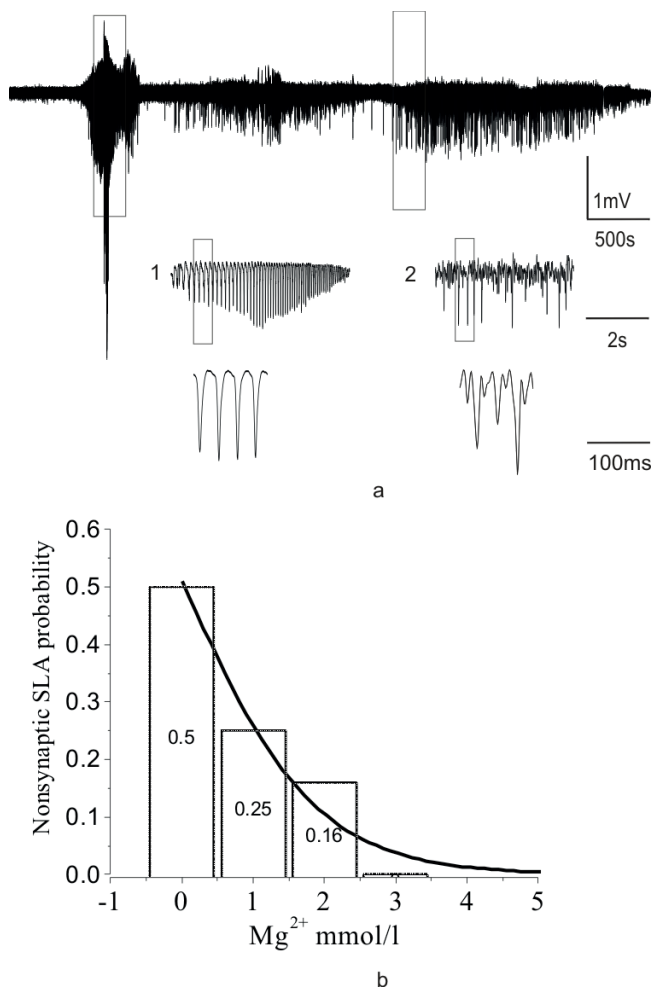


Fig.1. Manifestations of nonsynaptic epileptiform activity and probability of low- Ca^{2+} -induced SLA dependent on extracellular magnesium concentration. a – extracellular recordings of spontaneous field potentials from CA1 area of hippocampus in low- Ca^{2+} solution. Two types of nonsynaptic discharges outlined with boxes: 1 – burst of waves with clock-like fashion; 2 – continuously firing population spikes; b – cumulative histogram shows probability of induction of low- Ca^{2+} SLA under different extracellular Mg^{2+} concentrations; the curve represents theoretical probability statistically assessed with logistic regression

organization. The rodent hippocampal CA1 region is especially susceptible because its cell bodies form a very tight layer, where the geometry of a structure promotes the generation of large extracellular fields that alter the excitability of neighboring neurons [7]. Also, gap-junctions in CA1 pyramidal area are more developed especially in young animals [18]. Our data suggest that an increase in extracellular Mg^{2+} concentration significantly and progressively decreased the probability of induction of seizure like activity in low- Ca^{2+} model of epilepsy. Both cellular depolarization and hyperpolarizing shift of the voltage-gated channel activation cause similar effects on neuronal network activity due to reduced voltage difference between the resting membrane potential and potentials where Na^+ -channels are activated. Removal of Mg^{2+} ions from extracellular solution shifts leftward the half activation and facilitates the amplitude of I_{Na} compared with the 1mmol Mg^{2+} solution [12]. Our results suggest that the change in the surface charge dramatically affects the probability of induction of low- Ca^{2+} SLA, providing evidence that Mg^{2+} can reduce

cerebral excitability by screening surface charge and support the idea that lack of Mg^{2+} could cause epileptic seizures. In previous studies, it was shown that manipulations with surface charge could alter the pattern of epileptiform like activity [19]. In previous work we demonstrated that surface charge plays a crucial role in low- Mg^{2+} model of epilepsy [12].

In the next set of experiments we estimated the effect of increased Mg^{2+} concentration on the ongoing low- Ca^{2+} epileptic discharges. Increasing Mg^{2+} concentration to 1mmol in perfusion solution abolished SLA evoked in low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} aCSF in all tested slices ($n=4$) (Fig 2). Further decrease in extracellular magnesium concentration intensified low- Ca^{2+} field bursts. However, earlier studies reported that nonsynaptic bursting in the low- Ca^{2+} [15] and zero- Ca^{2+} [20] models were suppressed by higher concentrations of extracellular Mg^{2+} in hippocampal slices from adult rats. The observed increased sensitivity to extracellular magnesium concentration in the immature hippocampus may be caused by age-specific conditions for excitation and inhibition processes in developing

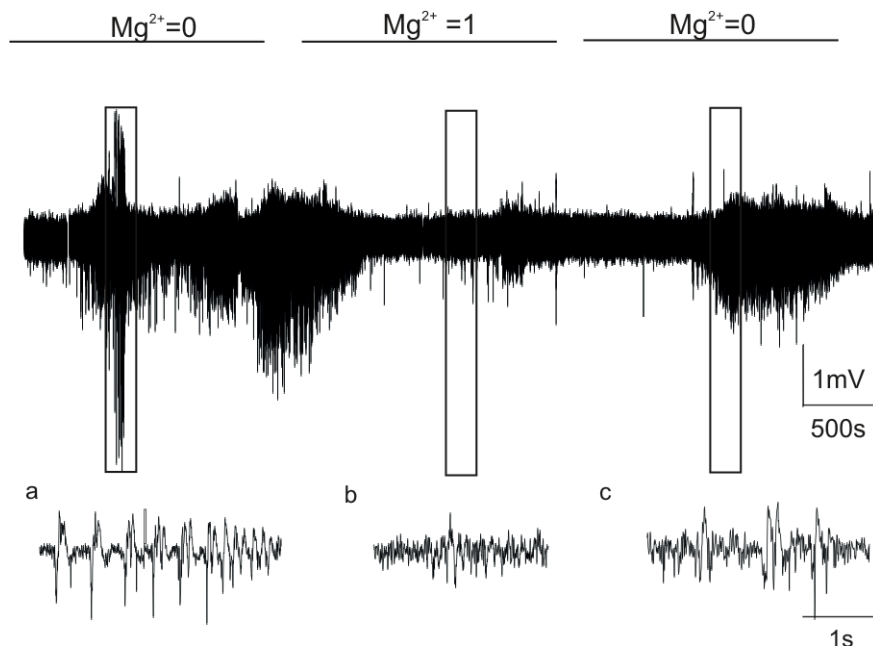


Fig 2. Effect of increasing extracellular Mg^{2+} concentration on low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} induced nonsynaptic bursting. Horizontal bars indicate Mg^{2+} concentration in low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} perfusion aCSF. Enlargements of extracellular field potentials record obtained in a – low- Ca^{2+} / low- Mg^{2+} solution, b – low- Ca^{2+} / 1mmol Mg^{2+} , c – washout

brain. Thus, surface charge has greater impact in low- Ca^{2+} model of epilepsy in developing brain.

Under the low- Ca^{2+} conditions synaptic transmission is almost completely blocked from presynaptic side so our observations are different from other seizure models and demonstrate that manipulation with surface charge could significantly alter seizure susceptibility even under conditions of nonsynaptic neuronal synchronization. This study further suggests that surface charge may represent a potential therapeutic target in the treatment of epilepsy.

CONCLUSIONS

1. Low- Ca^{2+} -induced nonsynaptic discharges in hippocampal slices characterized by population spikes that either were firing continuously or were arranged in field bursts that could appear in clock like manner.

2. Probability to trigger nonsynaptic SLA in low- Ca^{2+} model of epilepsy with preferential initiation in CA1 pyramidal layer of hippocampus intensified by lowering extracellular magnesium concentration.

3. Screening of the surface charge of the neuronal membranes through increasing of extracellular magnesium concentration abolished nonsynaptic field bursts induced by low- Ca^{2+} aCSF.

О.С. Запыхляк, В.О. Качановська, Е.В. Исаева, О.В. Нецык, Д.С. Исаев

ВПЛИВ ІОНІВ МАГНІЮ НА НЕСИНАПТИЧНІ ЕПІЛЕПТОПОДІБНІ ЯВИЩА В ГІПОКАМПІ ЩУРІВ

Зниження поверхневого заряду поблизу потенціалкеро-
ваних іонних каналів через зменшення позаклітинної
концентрації двовалентних катіонів впливає на клітинну
збудливість та поріг епілептиформної активності. Гори-
зонтальні зрізи мозку молодих щурів лінії Вістар були
використані для запису спонтанних польових потенціалів.
Зовнішньоклітинні реєстрації отримано з зон CA1 та CA3
гіпокампа. Для індукції несинаптичних епілептоподіб-
них явищ зрізи перфузували штучним спинномозковим
розчином без додавання іонів магнію та кальцію. Нами
було досліджено вплив різних концентрацій магнію (1,

2, 3 ммоль/л) на початкову стадію несинаптичних епілеп-
топодібних явищ у гіпокампі щура. Отримані результати
показали, що зміна концентрації Mg^{2+} впливає на ймо-
вірність виникнення низькокальцієвих епілептиформних
явищ. Іони магнію беруть участь у створенні поверхневого
заряду мембрани і, як наслідок, змінюють збудливість
нейронів, що дає підставу розглядати поверхневий заряд
мембрани як фармакологічну мішень у лікуванні епілепсії.
Ключові слова: епілептиформні явища викликані у роз-
чині з низькою концентрацією Ca^{2+} ; поверхневий заряд;
магній; гіпокамп.

О.С. Запыхляк, В.А. Качановская, Е.В. Исаева, О.В. Нецык, Д.С. Исаев

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МАГНИЯ НА НЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫЕ РАЗРЯДЫ В ГИПОКАМПЕ КРЫС

Снижение поверхностного заряда вблизи потенциалуправ-
ляемых ионных каналов путем уменьшения внеклеточной
концентрации двухвалентных катионов влияет на клеточ-
ную возбудимость и порог эпилептиформной активности.
Горизонтальные срезы мозга молодых крыс линии Вистар
были использованы для записи спонтанных внеклеточных
полевых потенциалов. Регистрации были получены из
зон CA1 и CA3 гиппокампа. С целью индукции несинап-
тических эпилептиформных явлений срезы перфузировали
искусственным спинномозговым раствором без добавле-
ния ионов магния и кальция. В данной работе было ис-
следовано влияние различных концентраций магния (1, 2,
3 ммоль/л) на начальную стадию несинаптической эпилеп-
тиформной активности в гиппокампе крысы. Полученные
результаты показали, что изменение концентрации магния
влияет на вероятность возникновения низькокальциевых
эпилептиформных явлений. Ионы магния участвуют в со-
здании поверхностного заряда мембрани и, как следствие,
влияют на возбудимость нейронов, что дает основание
рассматривать поверхностный заряд мембрани в качестве
фармакологической мишени в лечении эпилепсии.

Ключевые слова: эпилептиформные явления вызванные
в растворе с низкой концентрацией Ca^{2+} ; поверхностный
заряд; магний; гиппокамп.

REFERENCES

1. Dichter MA, Herman CJ, Selzer M. Silent cells during interictal discharges and seizures in hippocampal penicillin foci. Evidence for the role of extracellular K^{+} in the transition from the interictal state to seizures. Brain Res. 1972;48:173-83.
2. Prince DA, Connors BW. Mechanisms of interictal epileptogenesis. Adv Neurol. 1986; 44:275-99.
3. Bikson M, Baraban SC, Durand DM. Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of

- hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 2002; 87: 62-71.
4. Jefferys JG, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature.* 1982; 300(5891): 448-50.
5. Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science Wash.* 1982; 218(4574): 810-12.
6. Snow RW, Dudek FE. Synchronous epileptiform bursts without chemical transmission in CA2, CA3 and dentate areas of the hippocampus. *Brain Res.* 1984; 298(2):382-5.
7. Jefferys JG. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol Rev.* 1995; 75 (4): 689-723.
8. Traub RD, Dudek FE, Snow RW, Knowles WD. Computer simulations indicate that electrical field effects contribute to the shape of the epileptiform field potential. *Neuroscience.* 1985; 15(4): 947-58.
9. Kaczmarek LK, Adey WR. Extracellular release of cerebral macromolecules during potassium- and low-calcium-induced seizures. *Epilepsia.* 1975; 16(1): 91-7.
10. Feng Z, Durand DM. Low-calcium epileptiform activity in the hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 2003; 90(4): 2253-60.
11. Oki JI, Takedatsu M, Itoh J, Yano K, Cho K, Okuno A. Hypocalcemic focal seizures in a one-month-old infant of a mother with a low circulating level of vitamin D. *Brain Dev.* 1991; 13(2): 132-4.
12. Isaev D, Ivanchick G, Khmyz V, Isaeva E, Savrasova A, Krishtal O, Holmes GL, Maximyuk O. Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 2012; 107: 417-23.
13. Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR. Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J Gen Physiol.* 1997; 109(3): 327-43.
14. Isaeva E, Lushnikova I, Savrasova A, Skibo G, Holmes GL, Isaev D. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2010; 32(11): 1889-96.
15. Haas HL, Jefferys JGR. Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J Physiol Lond.* 1984; 354: 185-201.
16. Konnerth A, Heinemann U, Yaari Y. Slow transmission of neural activity in hippocampal area CA1 in absence of active chemical synapses. *Nature.* 1984; 307(5946): 69-71.
17. Taylor CP, Dudek FE. Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. *J Neurophysiol.* 1984; 52(1): 143-55.
18. Perez-Velazquez JL, Valiante TA, Carlen PL. Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J Neurosci.* 1994; 14(7): 4308-17.
19. Isaev D, Isaeva E, Shatskih T, Zhao Q, Smits NC, Shworak NW, Khazipov R, Holmes GL. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2007; 27(43): 11587-94.
20. Bikson M, Ghai RS, Baraban SC, Durand DM. Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero-Ca(2+) model of epileptiform activity. *J Neurophysiol.* 1999; 82(5): 2262-70.

Received 09.11.2015

Модуляція моносинаптичних рефлекторних розрядів у щурів після децеребрації під впливом гідрокситриптофану

І.В. Верещака¹, Н.В. Булгакова¹, В.В. Корнєєв¹, К.А. Чайковський²,
А.В. Мазниченко¹

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; e-mail: maznychenko@biph.kiev.ua

Досліджували зміни моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР) спінальних мотонейронів у щурів після децеребрації до та після внутрішньоочеревинного введення попередника серотоніну 5-гідрокситриптофану (5-ГТФ). МСР мотонейронів викликали за допомогою електричної стимуляції дорсальних корінців 5-го поперекового сегмента, а реєстрували від вентральних корінців. Під час стимуляції тваринам внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин або 5-ГТФ. У тварин, яким були зроблені ін'єкції 5-ГТФ, зареєстровано значне зростання амплітуд МСР (+169 % та +172 %, $P < 0,001$) порівняно з середньою амплітудою контрольних МСР. Отже, вивільнення серотоніну після системного застосування 5-ГТФ значно посилює збудливість мотонейронів у поперековому відділі спинного мозку, що, можливо, пов'язано з послабленням гальмівного контролю інтернейронів у шляхах передачі збуджувальних впливів від м'язових аферентів до мотонейронів та з позними (антигравітаційними) рефлекторними реакціями, необхідними для ініціації локомоторних рухів. Ключові слова: серотонін; 5-гідрокситриптофан; мотонейрон; моносинаптичні рефлекторні розряди.

ВСТУП

Модуляція передачі сигналу між первинними аферентами та премоторними інтернейронами має потужний вплив на рефлекторну діяльність через їх пряму збуджувальну або гальмівну дію на мотонейрони. [1]. Одна з нейронних систем, задіяних у таку модуляцію – моноамінергічна – діє завдяки вивільненню серотоніну, норадреналіну або дофаміну нейронами низхідного тракту [2, 3].

Відомо, що низхідні сигнали від мозкових моноамінергічних систем відіграють суттєву роль у контролі діяльності спінальних локомоторних центрів у різних регіонах спинного мозку [4–6], а серотонін (5-гідрокситриптамін, (5-ГТ)) є одним із головних нейромедiatorів/модуляторів, який активує спінальні нейрони, в тому числі і ті, які розташовані в центральному спінальному генера-

© І.В. Верещака, Н.В. Булгакова, В.В. Корнєєв, К.А. Чайковський, А.В. Мазниченко

торі. Серотонінергічні аксони дають проекції в усі ділянки сірої речовини спинного мозку і особливо у поверхневі шари дорсального рога, комісуральну ділянку та вентральний ріг [7]. Важливо, що локомоторна активність викликає вивільнення серотоніну в дорсальному [8] та вентральному рогах [9] спинного мозку. Показано, що у головному та спинному мозку людини і тварин 5-ГТ активує різні типи рецепторів серотоніну, які підрозділяють на 7 типів (5-ГТ₁ – 5-ГТ₇), а деякі типи на підтипи [10]. Також відомо, що при пошкодженні спинного мозку виникає порушення низхідних серотонінергічних проекцій до спінальних моторних ділянок і, як наслідок, виснаження 5-ГТ, порушення його експресії, підвищення чутливості та аутоактивація специфічних 5-ГТ-рецепторів. Послаблення функції серотонінергічної

системи може призводити до різного ступеня локомоторної дисфункції, навіть викликати параліч [11].

Літературі дані стосовно ролі серотоніну в регуляції мотонейронної активності та його дії на спинний мозок досить суперечливі. Так, деякі автори [12, 13], з одного боку, реєстрували пряму деполяризовальну дію серотоніну на спінальні мотонейрони, посилення їх збудливості [14–16] та пригнічення рефлекторних відповідей, викликаних стимуляцією дорсальних корінців під час впливу серотоніну та його агоністів (5-метоксидиметилтриптамін (5-MeO-DMT) та 8-гідрокси-2-(ди-N-пропіламіно)тетралін (8-OH-DPAT)) [17, 18], а з іншого – полегшення рефлекторних відповідей, викликаних стимуляцією ядер шва, та блокаду цього ефекту при введенні антагоністів 5-ГТФ [15]. Тож питання щодо залучення серотоніну до модулювання мотонейронної активності залишається ще детально не вивченим. Треба відмітити, що серотонін не проникає через гематоенцефалічний бар'єр на відміну від його попередника – 5-гідрокситриптофану (5-ГТФ).

Мета роботи – дослідити зміни амплітуди моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР), викликаних подразненням дорсальних корінців спинного мозку у нормі та після внутрішньоочеревиного введення прекурсору серотоніну – 5-ГТФ.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на двох групах щурів-самців лінії Вістар масою 350 – 400 г: 1-ша група (n=3) – тварини, яким під час електричної стимуляції дорсальних корінців спинного мозку внутрішньоочеревино вводили фізіологічний розчин. Щурам 2-ї групи (n=6) за тих самих умов була зроблена внутрішньоочеревино ін'єкція попередника серотоніну 5-гідрокситриптофану – 5-ГТФ (30 мг/кг, «Sigma», США). При такому дозуванні 5-ГТФ не відбувалося помітних

змін амплітуди електрокардіограми та частоти серцевих скорочень. Усі експериментальні процедури проводили згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р (86/609/ЕЕС) та відповідно до Закону України від 21.02.2006, № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

При підготовці до експерименту тваринам була проведена операція, яка включала в себе: внутрішньоочеревино наркотизацію сумішшю кетаміну (100 мг/кг «Pfizer», США) та ксилазіну гідрохлориду (10 мг/кг, «Interchemie», Голландія), трахеотомію та підключення до апарату штучної вентиляції легенів, децеребрацію на інтерколікулярному рівні, ламінектомію поперекових сегментів та виділення вентральних і дорсальних корінців спинного мозку на рівні 5-го поперекового сегмента (L5). Після операції щурів закріплювали у стереотаксичному верстаті та встановлювали платинові дрітчасті біполярні електроди для стимуляції та запису отриманих реакцій. Одна серія стимуляції складалася із 12 парних електричних імпульсів прямокутної форми тривалістю 0,2 мс і перервою між стимулами 30 с. Проводили одну контрольну і дві тестові серії стимулів (з введенням фізіологічного розчину або 5-ГТФ) з проміжками між серіями по 15 хв. Моносинаптичні рефлекторні розряди відводилися від вентральних корінців з одночасною реєстрацією потенціалів дорсальної поверхні (ПДП). Будь-які полісинаптичні рефлекси, що виникали під час стимуляції, ідентифікувалися за тривалістю їх затримки та вилучали під час обробки результатів.

Моносинаптичні рефлекторні розряди та потенціали дорсальної поверхні спинного мозку надходили до АЦП-ЦАП («Power 1401», Cambridge Electronic Design, Англія) і записувалися за допомогою програми «Spike 2». МСР та ПДП усереднювали за 12 стимуляціями. Середні значення амплітуд МСР порівнювали за допомогою однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA). Якщо міжгру-

пові відмінності були знайдені ($P < 0,001$), застосовували апостеріорний критерій Бонферроні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час стимуляції дорсальних корінців середні значення амплітуд МСР були визначені в одному контрольному (безін'єкційному) та двох післяін'єкційних періодах часу (серіях стимуляції) у щурів обох груп. У щурів 1-ї групи достовірної різниці між амплітудами моносинаптичних рефлекторних розрядів мотонейронів у контрольному періоді та двох періодах після внутрішньоочеревинного введення фізіологічного розчину зареєстровано не було (рис. 1, а). У тварин 2-ї групи через 15 хв після ін'єкції 5-ГТФ було зареєстровано значне зростання амплітуд МСР (+169 та +172 %, $P < 0,001$) порівняно з середньою амплітудою контрольних МСР (до введення 5-ГТФ) (див. рис. 1, б). На рис. 2 показані усереднені оригінальні МСР (за 15 хв до введення та після двох серій стимуляції з внутрішньоочеревинною інфільтрацією 5-ГТФ). З рисунку видно, що контрольні значення амплітуди МСР були на рівні $2,6 \pm 0,1$ мВ, а потім стрімко зростали до $4,41 \pm 0,5$ та $4,49 \pm 0,3$ мВ відповідно.

Треба відмітити, що збільшення амплітуд МСР не було пов'язане зі змінами інтенсивності подразнення корінців, оскільки змін амплітуди потенціалу дорсальної поверхні виявлено не було.

Фармакологічна модуляція серотонінових рецепторів із залученням специфічних агоністів 5-ГТ-рецепторів або застосуванням попередника серотоніну 5-ГТФ призводить до загальної активації 5-ГТ-рецепторів. Стимуляція цих рецепторів при травмах спинного мозку збуджує локомоторний спінальний генератор нижче місця пошкодження та полегшує або покращує якість та частоту рухів, особливо в концепції активації інших моноамінергічних систем або в поєднанні з електричною стимуляцією [11]. За даними деяких авторів [19, 20], в експериментах *in vitro* на спинному мозку новонароджених щурів під впливом серотоніну було зареєстровано пригнічення амплітуди МСР мотонейронів. Однак дослідження *in vivo* на тваринах після децеребрації та деякі експерименти *in vitro* на зрізах спинного мозку демонструють протилежні результати. Так, у праці Jankowska та співавт. [21] показано збільшення амплітуди МСР інтернейронів у спінальних рефлекторних шляхах аферентів груп I та II, а

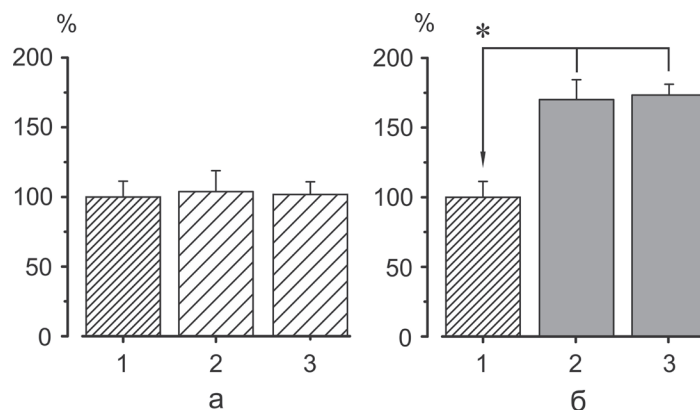


Рис. 1. Зміна амплітуд моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР) мотонейронів, викликаних електричною стимуляцією дорсальних корінців 5-го поперекового сегмента спинного мозку щурів після децеребрації в результаті внутрішньоочеревинного введення фізіологічного розчину (а) або 5-гідрокситриптофану (б): 1 – контрольна стимуляція без введення речовини (середня амплітуда МСР прийнята за 100 %). 2, 3 – перша та друга серії стимуляції після ін'єкцій фізіологічного розчину на (а) та 5-гідрокситриптофану (б) відповідно. * $P < 0,001$ відносно контролю

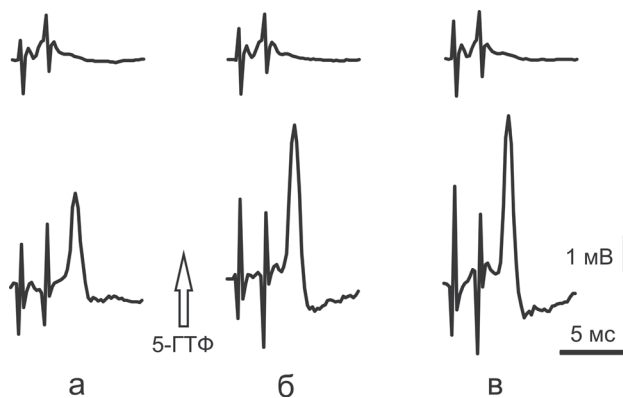


Рис. 2. Моносинаптичні рефлекторні розряди (МСР) мотонейронів 5-го поперекового сегмента щурів після децеребрації, які виникали в результаті електричної стимуляції у контролі (а) та через 15 і 30 хв після внутрішньоочеревинного введення 5-гідрокситриптофану (б, в). Верхній ряд – усереднені потенціали дорсальної поверхні спинного мозку щурів, нижній ряд – усереднені МСР мотонейронів

в експериментах інших авторів [22–25] відмічалося зростання амплітуди МСР мотонейронів в результаті дії агоністів серотоніну (DOI та квіпазіну). Тобто, попередні дослідження показали, що застосування серотоніну може викликати як пригнічення, так і збудження спінальних інтернейронів [21] та мотонейронів [11, 25, 26], а характер впливів залежить не тільки від типу активованих рецепторів та їх розташування на нейронах, а й від пропорції їх розміщення на мембрані [10, 21].

Одержані нами результати свідчать про те, що викликане вивільнення серотоніну після системного застосування 5-ГТФ активує мотонейрони у поперековому відділі спинного мозку, що, можливо, пов'язано з активацією серотонінових рецепторів другого типу [24, 25]. Збільшення активності вказаних нейронів може відбуватись як у результаті прямої дії серотоніну на мотонейрони, так і завдяки послабленню гальмівного контролю інтернейронів у шляхах передачі збуджувальних впливів від м'язових аферентів до мотонейронів. Як відомо [27], у поперековому сегменті L5 розташовані переважно численні ядра мотонейронів м'язів-розгиначів, тому виявлені зміни МСР під впливом 5-ГТФ вказують на причетність мозкової серотонінергічної системи до розвитку позних (антигравітаційних)

рефлекторних реакцій як одного із важливих компонентів, потрібних для ініціації локомоторних рухів.

**И.В. Верещака, Н.В. Булгакова, В.В. Корнеев,
К.А. Чайковский, А.В. Мазниченко**

МОДУЛЯЦИЯ МОНОСИНАПТИЧЕСКИХ РЕФЛЕКТОРНЫХ РАЗРЯДОВ У КРЫС ПОСЛЕ ДЕЦЕРЕБРАЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОКСИТРИПТОФАНА

Исследовали влияние серотонина на моносинаптические рефлекторные разряды (МСР) спинальных мотонейронов крыс после децеребрации в контроле и после внутрибрюшинного введения предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ). МСР мотонейронов спинного мозга получали с помощью электрической стимуляции дорсальных корешков 5-го поясничного сегмента. Во время стимуляции животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор или 5-ГТФ. У животных, которым были сделаны инъекции 5-ГТФ, зарегистрирован значительный рост амплитуд МСР (+169% и +172%, $P < 0,001$) по сравнению со средней амплитудой контрольных МСР. Таким образом, вызванное высвобождение серотонина после системного применения 5-ГТФ значительно усиливает возбудимость мотонейронов в поясничном отделе спинного мозга, что, возможно, связано с ослаблением тормозного контроля интернейронов в путях передачи возбуждающих влияний от мышечных афферентов к мотонейронам, а также с позными (антигравитационными) рефлекторными реакциями, необходимыми для инициации локомоторных движений.

Ключевые слова: серотонин; 5-гидрокситриптофан; мотонейрон; моносинаптические рефлекторные разряды.

**I.V. Vereshchaka¹, N.V. Bulgakova¹, V.V. Kornieiev¹,
K.A. Chaikovskii², A.V. Maznychenko¹**

MODULATION OF THE MONO-SYNAPTIC REFLEX POTENTIALS IN THE DECEREBRATED RATS UNDER THE INFLUENCE OF HYDROXYTRYPTOPHAN

We studied the serotonin effect on monosynaptic reflex potentials (MSR) of spinal motorneurons in the decerebrated rats in control and after intraperitoneal administration of serotonin precursor – 5-Hydroxytryptophan (5-HTP). MSR of motorneurons in the lumbar spinal cord were registered using electrical stimulation of dorsal root of the 5th lumbar section. During stimulation physiological saline or 5-hydroxytryptophan was injected intraperitoneally. In comparison with average amplitude of the control MSR there were registered significant increase in amplitudes of the MSR (169% and +172%, $P < 0,001$) in animals with injection 5-HTP. These data suggest that serotonin release after 5-HTP administration leads to activation of motorneurons in the lumbar spinal cord. The mechanism of this activation may be related to the weakening of the inhibitory control of interneurons in the transmission pathways of the excitatory influences from muscle afferent to motorneurons and to the postural (antigravity) reflex reactions which necessary for the initiation of locomotion.

Key words: serotonin; 5-Hydroxytryptophan; motorneurons; monosynaptic reflex potential.

¹*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

²*Kyiv Taras Shevchenko National University*

REFERENCES

1. Rudomin P, Romo R, Mendell L. Presynaptic inhibition and neural control. New York: Oxford University Press. 1998.
2. Calvillo O, Ghignone M, Madrid J. Effects of alpha 1 adrenoceptor activation on the excitability of primary afferent terminals of the sural nerve in the spinal cord of the cat. *Synapse*. 1988;2:326-28.
3. Lopez-Garcia JA, King AE. Pre- and post-synaptic actions of 5- hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur J Neurosci*. 1996;8:2188-97.
4. Musienko P, van den Brand R, Märzendorfer O, Roy RR, Gerasimenko Y, Edgerton V, Courtine G. Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries. *J Neurosci*. 2011;31(25):9264-78.
5. Noga BR, Johnson DM, Riesgo MI, Pinzon A. Locomotor-activated neurons of the cat. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT7, 5-HT2A, and 5-HT1A receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *J Neurophysiol*. 2009;102:1560-76.
6. Schmidt BJ, Jordan LM. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*. 2000;53(5):689-710.
7. Marlier L, Teilhac JR, Cerruti C, Privat A. Autoradiographic mapping of 5-HT1, 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res*. 1991;550: 15-23.
8. Gerin C, Teilhac JR, Smith K, Privat A. Motor activity induces release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett*. 2008;436(2):91-5.
9. Gerin CG., Hill A, Hill S, Smith K, Privat A. Serotonin release variations during recovery of motor function after a spinal cord injury in rats. *Synapse*. 2010;64(11):855-61.
10. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71:533-54.
11. GhoshM, PearseDD. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neural Circuits*. 2015;8:151.
12. Wang MY, Dun NJ. 5-hydroxytryptamine responses in neonate rat motoneurons in vitro. *J Physiol*. 1990;430:87-103.
13. Elliott P, Wallis DI. The action of 5-hydroxytryptamine on lumbar motoneurons in neonatal rat spinal cord in vitro. *J Physiol*. 1990;426(suppl):54.
14. Ahlman A, Grillner S, Udo M. The effect of 5-htp on the static fusimotor activity and the tonic stretch reflex of an extensor muscle. *Brain Res*. 1971;27:393-6.
15. Barasi S, Roberts MHT. The modification of lumbar motoneurone excitability by stimulation of a putative 5-hydroxytryptamine pathway. *Br J Pharmacol*. 1974;52:339-48.
16. Roberts MHT, Davies M, Girdlestone D, Foster GA. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists and antagonists on the responses of rat spinal motoneurons to raphe obscurus stimulation. *Br J Pharmacol*. 1988;95:437-48.
17. Saito K, Ito S, Kitazawa T, Ohga A. Selective inhibition by methysergide of the monosynaptic reflex discharge in the isolated spinal cord of the newborn rat. *Brain Res*. 1982;251:117-25.
18. Nagano N, Ono H, Fukuda H. Functional significance of subtypes of 5-ht receptors in the rat spinal reflex pathway. *Gen Pharmacol*. 1988;19:789-93.
19. Crick H, Wallis DI. Inhibition of reflex responses of neonate rat lumbar spinal cord by 5-hydroxytryptamine Br *J Pharmacol*. 1991;103:1769-75.
20. Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S. Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT2A and 5-HT3 receptors. *Eur J Pharmacol*. 2013;702:149-57.
21. Jankowska E, Hammar I, Chojnicka B, Hedén CH. Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents. *Eur J Neurosci*. 2000;12(2):701-14.
22. Gajendiran M. In vivo evidence for serotonin 5-HT2C receptor-mediated long-lasting excitability of lumbar spinal reflex and its functional interaction with 5-HT1A receptor in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*.

- 2008;75(5):674-80.
23. Machacek DW, Garraway SM, Shay BL, Hochman S. Serotonin 5-HT₂ receptor activation induces a long-lasting amplification of spinal reflex actions in the rat. *J Physiol.* 2001;537(Pt 1):201-7.
24. Shay BL, Sawchuk M, Machacek DW, Hochman S. Serotonin 5-HT₂ receptors induce a long-lasting facilitation of spinal reflexes independent of ionotropic receptor activity. *J Neurophysiol.* 2005;94(4):2867-77.
25. Chopek JW, MacDonell CW, Gardiner K, Gardiner PF. Daily passive cycling attenuates the hyperexcitability and restores the responsiveness of the extensor monosynaptic reflex to quipazine in the chronic spinally transected rat. *J Neurotrauma.* 2014;31(12):1083-7.
26. Gackière F, Vinay L. Serotonergic modulation of post-synaptic inhibition and locomotor alternating pattern in the spinal cord. *Front Neural Circuits.* 2014;8:102.
27. Vejsada R, Palecek J, Hník P. Permanent alterations of spinal cord reflexes following nerve lesion in newborn rats. *Physiol Res.* 1999;48(6):483-9.

*Матеріал надійшов до
редакції 02.09.2015*

Індукція оксидативного та нітрозативного стресу в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах

Н.В. Богдановська¹, А.В. Коцюруба², А.В. Голубенко¹

¹Запорізький національний університет, Запоріжжя;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: 020190@ukr.net

Вивчали особливості розвитку оксидативного та нітрозативного стресу у практично здорових осіб під впливом довготривалих фізичних навантажень значного обсягу та інтенсивності. Показано, що для юнаків, які систематично виконують м'язову роботу, характерні високий вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала, активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та нітрозативного стресу. Збільшення ступеня несприятливого впливу на організм інтенсивних тренувальних і змагальних навантажень супроводжується вираженими адаптивними змінами в ієрархії окисного індукційного de novo синтезу оксиду азоту (збільшення у 3 рази), а також неокисного реутилізаційного його синтезу (зростання у 3 рази). Деадаптація організму юнаків наприкінці змагального періоду виражається у підвищенні вмісту продуктів розпаду пуринових нуклеотидів у 2 рази, зростанні рівнів генерації активних форм кисню (супероксидного радикалу у 3,5 раза та перекису водню у 2,5 раза), а також у підвищенні вмісту нітрат-аніона у 2,5 раза. Ключові слова: індукція; оксидативний стрес; нітрозативний стрес; адаптація; фізичні навантаження.

ВСТУП

Згідно із загальноприйнятим на сьогодні визначенням, оксидативний стрес являє собою порушення балансу про- – антиоксидантних речовин у бік перших, серед яких ключове місце займають активні форми кисню та азоту, вивченню шляхів утворення та метаболізму яких присвячені численні дослідження [1, 2]. Зокрема, показано значення оксидативного та нітрозативного стресу у виникненні таких патологічних станів, як аутоімунні (системні) [3], серцево-судинні [4] захворювання, цукровий діабет [5] тощо. Вивчені особливості розвитку оксидативного стресу за різних стресових станів, до яких можна віднести іонізуючу радіацію, хімічні речовини [6] та ін. Однак очевидним є те, що особливе місце в активізації метаболічних змін займають фізичні навантаження,

які відіграють ключову роль у функціонуванні антиоксидантної системи. Дійсно, дослідженню змін, що відбуваються у антиоксидантній системі під впливом фізичних навантажень різної інтенсивності, тривалості присвячена численна кількість праць, проте вони обмежуються лише констатацією вмісту певних метаболітів здатних або чинити пошкоджувальний вплив на системи організму [2], або ж сприяти певній стабілізації балансу про- – антиоксидантних речовин [7]. Важливо відмітити, що у вітчизняних і зарубіжних дослідженнях не було приділено належної уваги вивченню оксидативного та нітрозативного стресу за умов тривалих фізичних і психоемоційних навантажень, зокрема відсутні дані, які б дали змогу виявити такі особливості у юнаків-спортсменів високої кваліфікації.

Вперше утворення вільних радикалів у м'язах, що інтенсивно скорочуються, було

© Н.В. Богдановська, А.В. Коцюруба, А.В. Голубенко

зафіксоване Davies зі співавт. [2]. Нині встановлено, що оптимальний окисно-відновний баланс (вміст активних форм кисню та азоту – АФК та АФА відповідно) у крові відіграє важливу роль у регулюванні скорочувального апарату сили м'язів. З іншого боку, внаслідок розвитку окисного стресу пошкодження структури м'язів позначається на продуктивності їх функціонування. Причини утворення вільних радикалів, АФК та АФА у процесі тренування досі не виявлені остаточно. Хоча різноманітні механізми вже достатньо досліджені і описані, залишається невизначеним сумарний вклад, який вносить кожен із них у загальний стрес, адже ці механізми можуть діяти синергічно, і різні режими навантажень, ймовірно, активують різні шляхи утворення вільних радикалів. На наш погляд, різноманітні метаболічні зрушення, що виникають в організмі спортсменів при інтенсивних фізичних і психоемоційних навантаженнях, мають свої особливості, тому це питання вимагає більш детального вивчення.

Метою нашого дослідження було вивчення особливостей індукції оксидативного та нітрозативного стресу в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах.

МЕТОДИКА

У дослідженні взяли участь нетреновані студенти (контрольна група) та спортсмени-волейболісти (основна група). Всього було проведено 765 обстежень. Юнаки основної групи протягом 11 міс (річний термін навчально-тренувального циклу спортсменів) систематично виконували м'язову роботу великого обсягу та інтенсивності: перші 3 міс (підготовчий етап) – вправи в аеробному режимі загальнорозвиваючого, спеціального характеру з частотою серцевих скорочень (ЧСС) 125–155 хв⁻¹ і спеціальний біг та ігри у змішаному анаеробно-аеробному режимі при ЧСС яка становила 140–185 хв⁻¹. Загальна кількість годин на цьому етапі була 268. В на-

ступні 8 міс (змагальний етап) тренувальні навантаження – 25–30% від загального обсягу підготовчого етапу, проводили паралельно зі змаганнями за календарним планом команди.

У плазмі крові досліджували біохімічні показники. Для характеристики інтенсивності розвитку оксидативного стресу нами були визначені: вміст тромбоксану B₂ (TxB₂), лейкотрієну C₄ (LtC₄), сечової кислоти, арахідонової кислоти, продуктів деградації пуринових нуклеотидів, швидкість генерації супероксидного радикала (в умовних одиницях), гідроксильного радикала, вміст перекису водню, дієнових кон'югантів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), негемового заліза – активатора утворення в реакції Фентона ·ОН-радикала, що є ініціатором перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Інтенсивність розвитку нітрозативного стресу оцінювали, визначаючи сумарну активність конститутивних синтаз оксиду азоту (cNOS=eNOS+iNOS), активність індукційної синтази оксиду азоту (iNOS), сумарну активність НАДФН-залежних нітратредуктаз (Red), активність аргінази (Arg), вміст сірководню (H₂S), нітрат-аніона (NO₃⁻).

Визначення вмісту ейкозаноїдів, TxB₂ та LtC₄ проводили в спиртових екстрактах плазми крові за допомогою радіоімунного методу «Beckman» (Німеччина), користуючись стандартними наборами реактивів фірми «Amersham» (Англія). Вміст сечової кислоти вивчали колориметрично в аліквотах плазми крові за допомогою набору реактивів фірми «Філісит-Діагностика» (Україна), вміст вільної арахідонової кислоти – в ліпідному гептан-ізопропанольному екстракті плазми крові спектрофотометричним методом [8]. Визначення продуктів деградації пуринових нуклеотидів проводили загальновживаним колориметричним методом [9].

Швидкість генерації супероксидного радикала (·O₂⁻) в плазмі крові оцінювали за зміною екстинції при окисненні цитохрому С («Sigma», США) [10]. Спектрофотометрично визначали швидкість генерації ·ОН-радикала

і перекису водню (H_2O_2) проводили [11, 12], а також вміст ДК і МДА [8, 13]. Вміст заліза в пробах визначали фотометричним методом з використанням набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Вивчення активності NO-синтаз (Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної) використовували комбінацію класичного метода [14] та сучасну його модифікацію [15], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Для цього у 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і активність ферменту визначали з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз до існуючого (базального) рівня. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

Для визначення вмісту сірководню, застосовували раніше описаний спектрофотометричний метод [16] із застосуванням дипіридилдісульфату (N,N-DPD, («Sigma», США) FeCl_3 (х.ч., Україна).

Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) вимірювали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом [17]. Загальну нітратредуктазну активність визначали в плазмі крові за наявності надлишку НАДФН («Reanal», Угорщина) та нітрат-аніона (NO_3^- , ч.д.а.) [18].

Базальну аргіназну активність вивчали за утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс-HCl («Calbiochem») буфері (pH = 8,0) [19, 20].

Вміст сечовини в плазмі крові досліджували колориметричним методом у безбілкових розчинах за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Вміст білка в плазмі крові визначали загальноновживаним методом Лоурі [21] з використанням вітчизняного реактиву Фоліна.

Розраховували також відносні зміни (Δ , %) біохімічних показників щодо певного дослідженого періоду або контролю за такою формулою: $\Delta = 100 \cdot (X_i - X_n) / X_n$, де

X_i – кінцеве значення; X_n – вихідне значення показника.

Усі біохімічні показники досліджували в збагаченій лейкоцитами плазмі крові нетренованих юнаків контрольної групи на початку дослідження, а у тренуваних юнаків основної групи тричі: після закінчення підготовчого періоду, в середині й наприкінці змагального періоду. У процесі підготовчого періоду (3 міс), фізичні навантаження виконували за відсутності факторів психологічного стресу, а в періоді змагань (8 міс) здійснювали як у тренувальному безстресовому режимі, так і в стресових умовах відповідальних змагань.

Обрана схема визначення вказаних біохімічних показників ґрунтувалася на тому, що ми спробували оцінити інтенсивність окисного стресу наприкінці підготовчого періоду (на піку фізичної форми, досягнутої під час тренувальних занять), в середині змагального (через 7 міс після початку тренувань або через 4 міс після початку змагань) і наприкінці змагального періоду (через 11 міс після початку тренувань або через 8 міс після початку змагань).

Обробку отриманих результатів проводили, використовуючи традиційні статистичні методи з вираховування відносних значень, середньої арифметичної, помилки репрезентативності та середнього квадратичного відхилення. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007» та «StatisticSoft 6.0».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було проведене попереднє визначення досліджуваних показників у групах нетренованих і тренуваних юнаків. Для останніх початок дослідження збігався із закінченням підготовчого етапу навчально-тренувального циклу та початком змагального етапу, що супроводжується поєднанням інтенсивних фізичних та психоемоційних навантажень.

Відомо, що генерація реактивних сполук відбувається двома шляхами, а саме оксида-

тивним (класичним), ключовими сполуками якого є АФК та нітрозативним (новим), провідне місце в якому займають АФА. Взаємодія шляхів відбувається під час реакцій між цими активними сполуками, що призводить до активації каскаду ланцюгових реакцій, так званого перекисного окиснення ліпідів. Зважаючи на провідну роль у функціонуванні антиоксидантної системи супероксидного радикала (СОР), як ключового метаболіту, з якого починається каскад генерації активних метаболітів кисню, вважаємо за необхідне дослідити різні шляхи його утворення. Відзначимо, що під дією фосфоліпази A_2 з фосфоліпідного пулу клітинних мембран відщеплюється арахідонова кислота, яка, в свою чергу, може по циклооксигеназному шляху перетворюватися на простагландини і стабільний TxB_2 , що є, в цілому, маркером інтенсивності циклооксигеназного шляху, а по ліпоксигеназному – в лейкотрієни, в тому числі пептидолейкотрієн LtC_4 , що є маркером його інтенсивності. У табл. 1 представлені результати первинного визначення вмісту маркерів оксидативного стресу. Встановлено, що у групі тренуваних юнаків вміст

TxB_2 та LtC_4 виявився вищим у 3 рази. Але, враховуючи практично однакові значення співвідношень (1,3) цих метаболітів у групі тренуваних та нетренуваних юнаків, встановити переважання одного з шляхів генерації СОР на початку дослідження не вдалося.

Нами розглянутий інший шлях генерації СОР, за участю ксантиноксидази, під час роботи якої в процесі деградації пуринових нуклеотидів одночасно утворюються $\cdot O_2^-$ і сечова кислота. Таким чином, ксантиноксидаза – ключовий фермент глибокої деградації макроергічних сполук. Під час окиснення гіпоксантину до ксантину, а останнього до сечової кислоти, ксантиноксидаза одночасно генерує два радикали $\cdot O_2^-$. Отже, сечова кислота є одночасно маркером генерації $\cdot O_2^-$ ксантиноксидазою, і ступеня деградації пуринових нуклеотидів. У групі тренуваних юнаків процеси глибокого розпаду макроергічних сполук були більш вираженими, що підтверджується втричі вищим ($P<0,05$) вмістом продуктів деградації пуринових нуклеотидів та сечової кислоти ($P<0,01$).

Відносно високий вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала

Таблиця 1. Показники оксидативного стресу в плазмі нетренуваних і тренуваних юнаків на початку дослідження ($M \pm m$)

Показники	Юнаки		Відносна різниця між показниками тренуваних і нетренуваних юнаків, %
	Нетренувані	Тренувані	
Тромбоксан B ₂ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,74±0,36	5,4±0,75***	+210,34
Лейкотрієн C ₄ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,33±0,27	4,34±0,81**	+226,32
Сечова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	3,3±0,57	9,36±1,57**	+183,64
Продукти деградації пуринових нуклеотидів, нмоль·мг ⁻¹ білка	1,63±0,06	4,73±1,32*	+190,18
Арахідонова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	11,26±1,71	16,17±3,6	+43,61
Швидкість генерації, ум.од. ·O ₂ ⁻	1,89±0,24	5,46±0,91**	+188,89
	·OH ⁻	1,22±0,26	8,9±1,71**
Перекис водню, пмоль·мг ⁻¹ білка	5,01±0,82	2,96±0,32*	-40,92
Негемове залізо, пмоль·мг ⁻¹ білка	2,28±0,25	4,24±0,81**	+85,96
Дієнові кон'югати, нг·мг ⁻¹ білка	3,71±0,42	11,1±2,64*	+199,19
Малоновий діальдегід, нмоль·мг ⁻¹ білка	14,8±2,4	40,7±6,8**	+175,00

Примітка: тут і в табл. 2: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ порівняно із нетренуваними юнаками.

у тренуваних юнаків спричинив збільшення ($P<0,001$) швидкості його генерації майже втричі вже наприкінці підготовчого періоду (початок дослідження). Вірогідне збільшення майже у 2 рази пулу вільного заліза у плазмі крові тренуваних юнаків може бути причиною вищої ($P<0,001$) у цій групі швидкості утворення гідроксидного радикала, що є ініціатором ліпопероксидації. Не виключено, що саме більш низький рівень вільного заліза поряд із вищим вмістом перекису водню ($P<0,05$) у групі нетренованих юнаків зумовлює і значно меншу інтенсивність проходження реакції Фентона, а, отже, і генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала (у 7 разів) і, як наслідок, процесу перекисного окиснення ліпідів (див. табл. 1). Відомо, що інтенсивна генерація АФК, а саме гідроксидного аніона [22] посилює перекисне окиснення ліпідів, що підтверджується також результатами, отриманими при визначенні вмісту маркерів ліпопероксидації; відповідно до чого на початку дослідження у групі тренуваних юнаків були вищими у 3 рази вміст ДК ($P<0,05$) та МДА ($P<0,01$).

Враховуючи тісний взаємозв'язок АФК і АФА, а також зважаючи на важливу роль NO у пристосуванні організму до фізичних навантажень [23] ми визначили значення показників, які характеризують інтенсивність розвитку нітрозативного стресу у юнаків обох груп (табл. 2). Наші результати узгоджуються із даними, отриманими раніше

[23]. В процесі систематичних тренувальних навантажень активізується система синтезу оксиду азоту (зростає синтез NO de novo), що може призвести до збільшення вмісту АФА із утворенням особливо небезпечного пероксинітриду, оскільки при відсутності L-аргініну або кофактора тетрагідробіоптерину NO-синтаза здатна генерувати супероксидний аніон-радикал [1].

Встановлено, що на початку дослідження вміст аргінази був однаковим у представників обох груп. При цьому у тренуваних юнаків порівняно із нетренованими активність iNOS посилюється у 3 рази ($P<0,01$), що має значно більшу продуктивність синтезу NO, ніж cNOS і за умов підвищення вмісту $\cdot\text{O}_2^-$ (див. табл. 1) може призводити до утворення пероксинітриду та подальшої активації процесів нітрозативного стресу у тренуваних юнаків. Крім цього виявлено, що реутилізаційний синтез NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриду, а останнього нітритредуктазою до оксиду азоту) переважав у спортсменів, що підтверджується вищою ($P<0,01$) майже втричі нітрат-редуктазою активністю у основній групі порівняно з контролем.

Відомо, що біологічно активний газовий трансмітер сірководень (H_2S) відіграє суттєву роль у фізіологічних реакціях, вступаючи в реакції з АФК та АФА [24], і є важливим регулятором de novo синтезу NO. Оскільки він

Таблиця 2. Показники нітрозативного стресу в плазмі нетренованих і тренуваних юнаків на початку дослідження ($M\pm m$)

Показники	Юнаки		Відносна різниця між показниками тренуваних і нетренованих юнаків, %
	Нетреновані	Треновані	
NO-синтаза, $\text{пмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка			
конститутивна	43,4 \pm 4,2	84,2 \pm 15,4*	+94,01
індуцибельна	19,35 \pm 2,1	59,3 \pm 10,5**	+206,46
Сірководень, $\text{пмоль}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка	2,15 \pm 0,59	6,88 \pm 0,88***	+220,00
Нітрат-аніон, $\text{нмоль}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка	5,38 \pm 0,97	7,78 \pm 0,82	+44,61
Н-редуктаза, $\text{нмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка	2,53 \pm 0,49	7,1 \pm 1,16**	+180,63
Аргіназа, $\text{нмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка	1,11 \pm 0,28	1,03 \pm 0,12	-7,21

має антиоксидантні властивості, зумовлені його здатністю до взаємодії з пероксинітрином, вірогідне зростання пулу H_2S втричі в основній групі (див. табл. 2) може бути підтвердженням значного утворення пероксинітриду, і, таким чином, свідченням розвитку нітрозативного стресу у спортсменів вже наприкінці підготовчого періоду.

Отже, у юнаків, які регулярно інтенсивно тренувалися протягом 3 міс, на початку дослідження вірогідно більш високими були значення практично всіх вивчених біохімічних показників, ніж у нетренованих юнаків. Це свідчить про важливість дослідження особливостей оксидативного та нітрозативного стресу для процесу адаптації організму спортсменів до тривалих і значних фізичних навантажень. Отримані результати узгоджуються з даними досліджень цілої низки авторів, які показали важливу роль участі АФК і АФА у пристосуванні організму до фізичних навантажень [23, 25]. У зв'язку із цим ми оцінили зміни значень досліджуваних показників на різних етапах тренувальної та змагальної діяльності тренуваних юнаків, тобто в динаміці адаптації до зміни характеру та обсягу зовнішнього впливу на їх організм

у вигляді м'язової роботи та психоемоційних навантажень, притаманних змагальному періоду.

На другому етапі дослідження, що збігався з серединою змагального періоду, ми повторно визначили біохімічні показники у тренуваних юнаків (табл. 3). Слід відмітити, що змінився вміст маркерів шляхів генерації супероксидного радикала, але вірогідна різниця була відзначена лише для вмісту арахідонової кислоти (збільшення на 66%; $P<0,05$) та сечової кислоти (зменшення на 57%; $P<0,01$). Передумовою синтезу простагландинів (зокрема, визначених нами TxB_2 та LtC_4) є наявність вільної арахідонової кислоти, яка відщеплюється від фосфоліпідного шару мембрани під дією фосфоліпази A_2 . Оскільки вірогідний приріст вказаної поліненасиченої жирної кислоти відмічений нами у середині змагального періоду, було висунуте припущення про можливість збільшення вмісту TxB_2 та LtC_4 до кінця змагального періоду. Відносна сталість кількості продуктів деградації пуринових нуклеотидів при достовірному зменшенні вмісту сечової кислоти може свідчити про адаптивні зміни, що виникають у спортсменів при систематичних

Таблиця 3. Показники оксидативного стресу в плазмі тренуваних юнаків під час змагального періоду ($M \pm m$)

Показники	Вихідний стан	Змагальний період	
		середина	кінець
Тромбоксан B_2 , $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$5,4 \pm 0,75$	$3,74 \pm 0,51$	$6,28 \pm 1,22$
Лейкотрієн C_4 , $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$4,34 \pm 0,81$	$3,52 \pm 0,46$	$4,6 \pm 0,72$
Сечова кислота, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$9,36 \pm 1,57$	$4,01 \pm 0,47^{**}$	$12,27 \pm 1,8$
Продукти деградації пуринових нуклеотидів, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$4,73 \pm 1,32$	$4,64 \pm 0,41$	$10,24 \pm 1,58^*$
Арахідонова кислота, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$16,17 \pm 3,6$	$26,88 \pm 2,16^*$	$29,98 \pm 3,42^*$
Швидкість генерації, ум.од. $\cdot O_2^-$	$5,46 \pm 0,91$	$6,99 \pm 1,02$	$19,3 \pm 1,34^*$
$\cdot OH^-$	$8,9 \pm 1,71$	$4,26 \pm 0,61^*$	$10,5 \pm 1,46$
Перекис водню, $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$2,96 \pm 0,32$	$3,35 \pm 0,36$	$7,76 \pm 0,82^*$
Негемове залізо, $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$4,24 \pm 0,81$	$2,07 \pm 0,37^*$	$13,6 \pm 1,8^*$
Дієнові кон'югати, $\text{нг} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$11,1 \pm 2,64$	$9,64 \pm 1,1$	$12,64 \pm 1,65$
Малоновий діальдегід, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$40,7 \pm 6,8$	$21,34 \pm 4,4^*$	$46,52 \pm 3,48^*$

Примітка: тут і табл. 4 * $P<0,05$; ** $P<0,01$ порівняно з вихідним станом.

тренувальних та змагальних навантажень.

У плазмі крові тренуваних юнаків швидкість генерації гідроксидного радикала знизилася на 52% ($P < 0,05$). При цьому вміст негемового заліза також зменшився на 51% ($P < 0,05$). Це свідчить про зниження інтенсивності реакції Фентона, що, ймовірно, повинно сприяти зменшенню активності процесів ліпопероксидації у середині змагального періоду (див. табл. 3). Таке припущення підтверджено результатами відповідно до яких у середині змагального періоду нами було зафіксоване вірогідне зменшення майже вдвічі вмісту МДА.

Беручи до уваги значимість дослідження маркерів окисного NO-синтазного й аргіназного обміну аргініну, як і окисного *de novo* та неокисного реутилізаційного синтезу оксиду азоту для процесу адаптації організму юнаків до тривалих і значних фізичних навантажень [23, 25], ми визначили показники, що характеризують інтенсивність нітрозативного стресу у спортсменів у середині змагального періоду (табл. 4). Встановлено, що вірогідна відмінність зафіксована для активності iNOS, значення якої знизилася на 48%. Це свідчить про адаптивні зміни у системі синтезу оксиду азоту, зокрема окисного *de novo*, під впливом тривалих фізичних і психоемоційних змагальних навантажень. Зазначимо, що за іншими показниками нітрозативного стресу у середині змагального періоду достовірних відмінностей зафіксовано не було.

Відомо, що закінчення змагального сезону у спортсменів характеризується потужним наростанням природного стомлення організму, зниженням фізичної працездатності та функціональної підготовленості [23]. Разом з тим необхідність продовження змагальної діяльності, виконання фізичних навантажень на високому рівні вимагає мобілізації функціональних резервів організму й формування нових фізіологічних механізмів його адекватної адаптації до систематичної м'язової роботи. Відповідно до цього, досить передбачуваними виявилися результати, отримані нами на третьому етапі дослідження, що відповідали закінченню змагального періоду.

Зміни фізіологічних показників, що відбулися наприкінці дослідження знайшли своє відображення у біохімічних показниках, які також зазнали суттєвих змін. Закінчення змагального періоду супроводжувалося збільшенням швидкості генерації супероксидного радикала (у 3,5 раза; $P < 0,001$), що, можливо, пов'язано зі значним збільшенням вмісту продуктів деградації пуринових нуклеотидів та арахідонової кислоти ($P < 0,05$) як джерел продукції $\cdot O_2^-$, а також активацією інших механізмів його утворення, наприклад, за участю НАДФН-оксидази, котра є однією з основних генераторів АФК під час виконання фізичних навантажень (див. табл. 3).

Відомо, що напруження механізмів антиоксидантного захисту на фоні фізичних навантажень високого обсягу та інтенсив-

Таблиця 4. Показники нітрозативного стресу в плазмі тренуваних юнаків під час змагального періоду ($M \pm m$)

Показники	Вихідний стан	Змагальний період	
		середина	кінець
NO-синтаза, $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка			
конститутивна	$84,2 \pm 15,4$	$50,1 \pm 11,52$	$66,93 \pm 17,31$
індуцибельна	$59,3 \pm 10,5$	$30,6 \pm 3,5^*$	$56,52 \pm 6,21$
Сірководень, $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$6,88 \pm 0,88$	$6,04 \pm 0,92$	$5,26 \pm 0,92$
Нітрат-аніон, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$7,78 \pm 0,82$	$6,04 \pm 0,73$	$19,95 \pm 2,74^*$
Н-редуктаза, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$7,1 \pm 1,16$	$5,69 \pm 0,73$	$10,89 \pm 1,65$
Аргіназа, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$1,03 \pm 0,12$	$1,18 \pm 0,15$	$2,72 \pm 0,16^*$

ності може викликати накопичення перекису водню [26]. Нами встановлено, що у плазмі крові спортсменів у кінці змагального періоду збільшується майже у 3 рази ($P < 0,001$) вміст перекису водню та негемового заліза, цим зумовлені зміни у процесах перекисного окислення ліпідів, про що свідчить збільшення на 14% вмісту МДА ($P < 0,001$; див. табл. 3). Отримані результати повністю узгоджуються з літературними даними.

Вивчення показників нітрозативного стресу в обтяженому психологічним стресом режимі спортивних змагань дало змогу встановити (див. табл. 4), що у кінці змагального періоду майже 2,5 рази ($P < 0,001$) збільшилися вміст нітрат-аніона та активність аргінази. Нетоксичний нітрат-аніон містить атоми кисню, що походять із обох (оксидативного – класичного та нітрозативного – нового) шляхів метаболізму кисню і є основним циркулюючим метаболітом оксиду азоту. Таким чином, підвищений вміст NO_3^- є достатнім маркером для встановлення наявності і оксидативного, і нітрозативного стресу у спортсменів.

Отже, проведені нами дослідження дали змогу констатувати, що необхідний рівень адаптації організму спортсменів до тривалого інтенсивного фізичного навантаження, обтяженого психологічним стресом під час змагального періоду та відсутній у тренувальний період, забезпечувався і за рахунок неокисного шляху метаболізму L-аргініну, який проходить з утворенням сечовини та орнітину, з якого в суміжних реакціях утворюється путресцин і інші поліаміни, необхідні для підтримки проліферативних процесів, особливо синтезу ДНК.

ВИСНОВКИ

1. Наприкінці тренувальних занять у підготовчий період для юнаків, які систематично виконують м'язову роботу, характерні високі концентрації АФК і АФА. Адаптації організму до тривалих і значних фізичних навантажень відповідає висока активність

cNOS та достовірно вищий вміст сірководню – скавенджеру пероксинітриду.

2. Збільшення ступеня несприятливого впливу на організм інтенсивних тренувальних (фізичних) і змагальних (як фізичних, так і психологічних) навантажень проходить на фоні виражених адаптивних змін в ієрархії окисного конститутивного (зниження) *de novo* синтезу оксиду азоту, а також неокисного реутилізаційного його синтезу (підвищення) і окисної деградації L-аргініну (збільшення).

3. Дезадаптація організму юнаків наприкінці змагального періоду супроводжується значним зростанням рівнів генерації АФК, що спричиняє інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів, а також підвищенням вмісту NO_3^- , котрий є маркером для встановлення наявності і оксидативного, і нітрозативного стресу у спортсменів.

Н.В. Богдановская, **А.В. Коцюрба**,
А.В. Голубенко

ИНДУКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА У ЮНОШЕЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ В ТРЕНИРОВОЧНОМ И СОРЕВНОВАТЕЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Изучали особенности развития оксидативного и нитрозативного стресса у практически здоровых лиц под влиянием длительных физических нагрузок большого объема и интенсивности. Показано, что для юношей, которые систематически выполняют мышечную работу, характерны высокое содержание маркеров различных путей генерации супероксидного радикала, активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и нитрозативного стресса. Увеличение степени неблагоприятного воздействия на организм интенсивных тренировочных и соревновательных нагрузок сопровождается выраженными адаптивными изменениями в иерархии окислительного индуцибельного *de novo* синтеза оксида азота (увеличение в 3 раза), а также неокислительного реутилизационного его синтеза (увеличение в 3 раза). Дезадаптация организма юношей в конце соревновательного периода выражается в повышении содержания продуктов распада пуриновых нуклеотидов в 2 раза, в росте уровней генерации активных форм кислорода (супероксидного радикала в 3,5 раза и перекиси водорода в 2,5 раза), а также в повышении содержания нитрат-аниона в 2,5 раза.

Ключевые слова: индукция; оксидативный стресс; нитрозативный стресс; адаптация; физические нагрузки.

**N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba,
A.V. Golubenko**

INDUCTION OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS IN BOYS IN ADAPTING TO PHYSICAL STRESS DURING TRAINING AND COMPETITIVE PERIODS

We studied the features of development of oxidative and nitrosative stress in otherwise healthy individuals under the influence of prolonged exercise of high volume and intensity. It is shown that young men who systematically performed muscular work have a high content of markers of different ways of generation of superoxide radical, a reactive oxygen species for products of lipid peroxidation and markers of nitrosative stress. The increase in the degree of adverse effects on the body intensive training and competitive loads is accompanied by pronounced adaptive changes in the hierarchy of oxidizing constitutive de novo synthesis of nitric oxide, as well as its nonoxide reutilization synthesis (in 3 times higher). Disadaptation of the organism of boys at the end of the competition period is reflected in growing levels of generation of ROS (superoxide radical: 3,5 times higher, hydrogen peroxide: 2,5 times higher). The products of purine nucleotides degradation were 2 times higher, and the increase in the content of the nitrate anion was 2,5 times higher.

Key words: induction; oxidative stress; nitrosative stress; adaptation; physical activity.

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

REFERENCES

1. Martinovich GG, Cherenkevich SN. Oxidation-reduction processes in cells: Monograph. Mn.: BSU, 2008. 159 P. [Russian].
2. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107:1198-05.
3. Andras Perl Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9 (11):674-86.
4. Thomas J, Grahame and Richard B. Schlesinger Grahame Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9: 9-21.
5. Dario Pitocco, Manfredi Tesaro, Rizzi Alessandro, Giovanni Ghirlanda, and Carmine Cardillo Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. *Int J Mol Sci.* 2013; № 14(11):21525–50.
6. Dvorschenko KO. The effect of ionizing radiation and hydrogen peroxide on the performance of oxide - antioxidant balance and energy metabolism in thymocytes and hepatocytes in vitro. *Kiev national University of Taras Shevchenko.* 2004; 20 [Ukrainian].
7. Gomez-Cabrera M, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008;44 (2): 126-31.
8. Gavrilov VB., Gavrilova AG. The Measurement of diene conjugates in plasma blood by UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *The lab. case.* 1988; 2:60-3.
9. Biochemical research methods in the clinic. Guide. *Medicine.* 1969:652.
10. McCord J., Fridovich I.A. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem. J.* 1982; 203(3): 551–8.
11. Conte D., Narindrasorasa KS., Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *Eur. J. Biochem.* 1996; 271(9):5125–30.
12. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalic degradation of hydrogen peroxide in lactoperoxidase iodide system. *Eur. journal Biochemistry.* 1984; 1:69-4.
13. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test *Anal. Biochem.* 1978; 86 (1):271-8.
14. Salter M., Knowles RG., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide syntases. *FEBS Lett.* 1991;291 (1):145-9.
15. So Yeon Chin, kailash n. Pandey, Shang-Jin Shi, Hiroyuki Kobori, Carol Moreno, And L. Gabriel Navar. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer. J. Physiol.* 1999;277 (5 Pt. 2):797-4.
16. Svenson AA. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Method for Determination of Hydrogen Sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem.* 1980;107:51-5.
17. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats. *Am J. Physiol.* 1996; (270)5:840-5.
18. Alikulov ZA., Lviv NP., Kretovich VL. Nitrate and nitrite is activity of milk. *BioChem.* 1980;45(9):1714-8 [Russian].
19. Shugaley VS, Kozina AS. The content of urea and arginase activity in the organs of rats during acclimatization to cold // *Fiziol Zh. USSR.* 1977; 8:1199-2.
20. Garganta CL, Bond JS. Assay and kinetics of arginase *Anal Biochem.* 1982;126 (1):131-8.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–75.
22. Gutteredge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry.* 1995;41:1819-28.
23. Bogdanovska NV, Kotsuruba AV, Malikov MV. Features of metabolism of arginine and nitric oxide synthesis in young men during adaptation to physical stress during training and competitive periods *Fiziol Zh.* 2011;57:45-54 [Ukrainian].

24. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. *Mol Cell Biochem.* 2012;360:61-9.
25. Green D, Maiorana A, Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans *J. Physiol.* 2004; 561(1):1-25.
26. Rakhmanov RS, Troshin VV, Blinova TV, Strakhova LA. Correction of immunodeficiency States and antioxidative status during strenuous exercises products with a high content of biologically active substances. *Med Almanac.* 2012;3:156-8 [Russian].

*Матеріал надійшов до
редакції 08.12.2015*

Вплив різного тиреоїдного статусу на електрофізіологічні та міографічні показники скорочення скелетного м'яза (*m. Tibialis anterior*) білих щурів

Т.І. Станішевська, І.П. Аносов

Мелітопольський державний педагогічний університет ім. Богдана Хмельницького;
e-mail: stanisch@ukr.net

*На білих щурах із експериментальним трийодтироніновим гіпертиреозом (15 мкг/кг впродовж 4 діб внутрішньочеревинно) і тиреотоксикозом (25 мкг/кг впродовж 4 діб) в умовах in situ вивчали основні параметри функціонального стану скелетного м'яза (*m. tibialis anterior*) при викликаному скороченні. Ступенем вираженості гіпертиреозу були ректальна температура, величина споживання кисню і тахікардії, маса тіла і концентрація циркулюючого вільного трийодтироніну. Показано, що у разі гіпертиреозу легкого ступеня вираженості (ректальна температура $38,5 \pm 0,1$ °C) передньогомілковий м'яз щурів набуває високих функціональних можливостей. Це проявляється в скороченні латентного періоду генерації «М-відповіді» (-32 %), зменшенні часу розвитку її висхідної позитивної хвилі (-22 %) і латентного періоду метричного скорочення м'яза (-23 %). За експериментального тиреотоксикозу (ректальна температура $39,4 \pm 0,2$ °C), сформованому екзогенними ін'єкціями щурам трийодтироніну (25 мкг/кг протягом 4 діб), розвиваються виражені патофізіологічні негативні зміни у функціональному стані передньогомілкового м'яза: подовжується латентний період генерації «М-відповіді» (+21 %), збільшується час розвитку її висхідної позитивної хвилі (+54 %), а також латентний період метричного скорочення м'яза (+14 %). Робиться висновок щодо різноспрямованих змін функціонального стану скелетного м'яза щурів за експериментального гіпертиреозу і вираженого тиреотоксикозу.*

Ключові слова: тиреоїдні гормони; скелетний м'яз; «М-відповідь»; латентний період скорочення м'яза.

ВСТУП

Вивчення механізмів гормональної регуляції стану нервово-м'язової системи, як і раніше, залишається предметом численних досліджень [1–3]. Особливе місце в нейрогуморальній регуляції функціонального стану скелетного м'яза належить тиреоїдним гормонам. Нині відомо про роль гормонів щитоподібної залози у функціонуванні іонних насосів в м'язовому волокні [4, 5], процесах нервово-м'язової передачі [6, 7], а також регуляції ерготропної і теплотворної функції скелетного м'яза [8–10]. Так, зокрема, розкрито механізми дії тиреоїдних гормонів на теплову вартість скоротливого акту, мо-

© Т.І. Станішевська, І.П. Аносов

більність та працездатність скелетного м'яза, обґрунтовано положення щодо різноспрямованого ефекту гіпер- і тиретоксикозу на базові характеристики енергетики м'яза [10, 11]. Однак багато аспектів проблеми тиреоїдного контролю скоротливого акту залишаються недостатньо дослідженими. Зокрема, становить значний науковий інтерес питання про характер впливу гіпертиреозу різного ступеня вираженості на функціональні параметри м'яза, що відображають перші моменти розвитку його збудження і скорочення [2].

Найбільш інформативний підхід при дослідженні зазначеної проблеми, з позиції фізіології та патофізіології скелетного м'яза, пов'язаний з використанням електрофізіоло-

гічних та міографічних методів [9, 12]. Існують експериментальні докази, що свідчать про неоднозначну зміну характеру амплітудно-частотної залежності «М-відповіді» від ступеня вираженості експериментального гіпертиреозу [1], латентного періоду потенціалу дії і його амплітуди [6], максимально можливої швидкості скорочення, його силових характеристик та інших показників, що відображають реактивність скелетного м'яза [2, 9].

Таким чином, порушення тиреоїдного статусу спричиняє численні зміни у різних ланках нервово-м'язового апарату, які не завжди носять деструктивний характер. Ця теза потребує додаткових доказів, зокрема видається важливим дослідження стану функціональних параметрів м'яза у початковій стадії його скорочення залежно від ступеня вираженості експериментального гіпер- і тиреотоксикозу.

Метою нашої роботи було проведення в умовах *in situ* порівняльної оцінки характеру впливу індукованого трийодтироніном стану експериментального гіпер- і тиреотоксикозу на латентний період генерації М-відповіді скелетного м'яза щурів і латентний період його метричного скорочення.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 30 дорослих безпорідних білих щурах-самцях, яких було поділено на 3 групи по 10 тварин у кожній. У тварин 1-ї групи викликали експериментальний гіпертиреоз підшкірним введенням водного розчину трийодтироніну (15 мкг/кг протягом 4 діб), 2-ї трийодтиронін вводили також впродовж 4 діб, але у дозі 25 мкг/кг (експериментальний тиреотоксикоз). Контрольною була 3-тя група тварин. У всіх тварин за умов *in situ* вимірювали латентний період генерації М-відповіді і латентний період метричного скорочення переднього великогомілкового м'яза (*m. tibialis anterior*).

У ненаркотизованих тварин за умов термонейтральної зони при 28 – 30 °С вимірю-

вали ректальну температуру (цифровий датчик Dallas DS18B20), споживання кисню (електронний газоаналізатор «Radiometer», Данія) і частоту серцевих скорочень (метод реєстрації R-зубця електрокардіограми). Потім тварин наркотизували (тіопентал натрію в дозі 100 мг/кг), фіксували у верстаті установки і препарували малогомілковий нерв. Цей нерв іннервує передній великогомілковий м'яз, скорочення якого викликає згинання стопи задньої лапки щура. До стопи останньої підвішували вантаж масою 50 г, а власне лапка з'єднувалася за допомогою сталевий нитки з датчиком переміщення (потенціометром), що дало змогу надалі реєструвати метричне скорочення м'яза (міограму).

Згодом у передній великогомілковий м'яз вводили два металевих голчастих електроди з міжелектродною відстанню 1 мм, з'єднані з біопідсилювачем (диференційний операційний підсилювач PGA870, «Texas Instruments»). Це дало змогу реєструвати викликану електроміографічну відповідь («М-відповідь») у вигляді сумарного біоелектричного потенціалу м'яза при подразненні нерва і виміряти надалі латентний період його збудження.

Для посилення біопотенціалів м'яза застосовувався диференційний операційний підсилювач PGA870 («Texas Instruments»), режекторний гіраторний фільтр (50 Гц), цифровий осцилограф з пам'яттю (TDS2004C фірми «Tektronix») і комп'ютер.

Під час проведення дослідів спочатку вимірювали латентний період генерації «М-відповіді» м'яза за умов поодиноких короткочасних ізотонічних скорочень. На цьому етапі малогомілковий нерв подразнювали надпороговими електричними імпульсами тривалістю 0,15 мс кожний з частотою 4 Гц протягом 3 с. Амплітуду імпульсів електростимулятора обирали заздалегідь і встановлювали на рівні двопорогових значень. На другому етапі дослідів малогомілковий нерв подразнювали імпульсами тривалістю 0,5 мс з частотою 80 Гц; тривалість подразнення

становила 9 с. Міограму у форматі CSV-файла записували до пам'яті осцилографа, що дало змогу надалі за допомогою пакета аналізу Excel обчислити латентний період метричного скорочення м'яза.

Після вимірювання базових значень досліджуваних показників, тварин декапітували і в крові визначали вміст вільного трийодтироніну за допомогою імуноферментного аналізу з використанням системи "ThermoLabsystems" і стандартних наборів реагентів «ТироїдІФА-трийодтиронін вільний» (Росія).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакетів аналізу Excel і Statistica 7.0. Для оцінки вірогідності відмінностей між центральними тенденціями порівнюваних груп (контрольною і дослідних) використали критерій t Стьюдента, заздалегідь переконавшись в тому, що розподіл значень у досліджуваних варіаційних рядах близький до нормального (W-тест Шапіро – Уїлка). Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично вірогідні. Обчислені показники виражали у вигляді середнє \pm стандартна похибка.

Усі експерименти були виконані відповідно до «Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин» (публікація Національного інституту здоров'я № 85-23, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з оцінкою ступеня вираженості головних симптомів зміненого тиреоїдного статусу

[13, 14], можна дійти висновку, що експерименти було проведено на тваринах з двома типами індукованого гіпертиреозидизму – легкого ступеня виразності (гіпертиреоз, 1-ша група) і важкого (тиреотоксикоз, 2-га група). Це було зроблено на основі визначення ректальної температури, швидкості споживання кисню, частоти серцевих скорочень, маси тіла і концентрації циркулюючого вільного трийодтироніну. При нашій моделі гіпертиреозу ректальна температура у тварин 1-ї групи становила $38,5 \pm 0,1$ °C (у контролі $37,8 \pm 0,1$ °C), споживання кисню збільшувалося на +21 % ($P < 0,05$), а тахікардія була помірною 448 ± 5 хв⁻¹, тобто була на 46 ± 6 хв⁻¹ більшою, ніж у щурів контрольної групи (табл. 1).

Використана модель тиреотоксикозу (2-га група) характеризувалася ректальною температурою $39,4 \pm 0,2$ °C і швидкістю споживання кисню $32,7 \pm 0,8$ млкг⁻¹хв⁻¹ (+65 %, $P < 0,05$). Ступінь тахікардії сягав 465 ± 7 хв⁻¹, тобто був на 66 ± 11 хв⁻¹ більше ($P < 0,05$). Виражені відмінності спостерігалися і з боку маси тіла (табл. 1).

Результати вимірювання вмісту циркулюючого вільного трийодтироніну засвідчили, що попереднє екзогенне введення гормону викликало закономірне підвищення його концентрації: збільшення на 157 і 320 % у 1-й і 2-й групах відповідно. Отже, експерименти були виконані на тваринах із чіткими ознаками стану експериментального індукованого трийодтироніном гіпертиреозу (1-ша група) та експериментального тиреотоксикозу (2-га група).

Таблиця 1. Характеристика деяких фізіологічних показників у білих щурів за різного тиреоїдного статусу ($M \pm m$; $n=10$)

Група тварин	Ректальна температура, °C	Споживання кисню, мл/кг/хв	Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	Маса тіла, г
Гіпертиреоз (1-ша група)	$38,5 \pm 0,1$ (+0,7 \pm 0,14)*	$28,7 \pm 0,56$ (+21 %)*	445 ± 5 (+12 %)*	267 ± 4 (-5 %)*
Тиреотоксикоз (2-га група)	$39,4 \pm 0,2$ (+1,6 \pm 0,22)*	$32,7 \pm 0,8$ (+38 %)*	465 ± 7 (+17 %)*	259 ± 5 (-8 %)*
Контроль	$37,8 \pm 0,1$	$23,7 \pm 0,23$	399 ± 4	281 ± 3

Примітка: * $P < 0,05$ тут і табл. 2, 3 відносно значень у щурів контрольної групи.

Після попереднього вимірювання показників, що характеризують рівень загального обміну, проводили реєстрацію «М-відповіді» та запис міограми для визначення латентних періодів збудження та скорочення м'яза. Нагадаємо, що латентний період генерації «М-відповіді» визначали обчисленням часу за період від початку подразнення нерва до появи виразної сумарної відповіді нейромоторної одиниці переднього великогомілкового м'яза білих щурів. Як видно з табл. 2 і рис. 1, латентний період збудження м'яза істотно залежить від тиреоїдного статусу. Так, у тварин контрольної групи його середнє значення становило $2,60 \pm 0,056$ мс, а за умов експериментального гіпертиреозу легкого ступеня вираженості (1-ша група) тривалість латентного періоду для «М-відповіді» скорочувалося до $1,76 \pm 0,075$ мс, що було на 32 % менше ($P < 0,05$), ніж у щурів контрольної групи.

Графік записів-оригіналів (див. рис. 1) дає загальне уявлення про форму і часові показники кривої «М-відповіді» у тварин контрольної та дослідних груп. Так, на запису чітко простежується, що латентний період для кожної «М-відповіді» був різним. Точне значення визначалося після простих арифметичних обчислень оцифрованої кривої, що представлена 2500 точками з квантуванням 4 мкс.

При формуванні стану експериментального тиреотоксикозу спрямованість зміни з боку тривалості латентного періоду збудження передньомілкового м'яза ставала прямо

протилежною. Дійсно, у тварин з експериментальним тиреотоксикозом він становив $3,15 \pm 0,087$ мс, що було на 21 % більше ($P < 0,05$) за значення показника у контрольних тварин.

Слід відмітити, що початкова фаза формування «М-відповіді» для м'яза тварин з експериментальним тиреотоксикозом виглядає більш пологою, ніж в інших випадках (див. рис. 1). У табл. 3 наведено цифрові значення цього параметра. Так, у щурів із експериментальним гіпертиреозом час формування піка «М-відповіді» був на 22% меншим, ніж у контролі. Водночас у тварин з експериментальним тиреотоксикозом була інша закономірність – розвиток максимальної амплітуди «М-відповіді» відбувався протягом тривалішого терміну (+ 54%). Останнє свідчить про збільшення порога збудження окремих волокон м'яза і наростання його варіабельності, що призводить до погіршення ступеня синхронізації цілісного процесу і зменшення максимальної амплітуди «М-відповіді» [1].

Другим важливим показником, що характеризує функціональний стан скелетного м'яза щурів при різному тиреоїдному статусі, є латентний період метричного скорочення м'яза (табл. 2). Видно, що ступінь порушення тиреоїдного статусу визначала характер спрямованості змін з боку латентного періоду скорочення скелетного м'яза. Дійсно, за експериментального гіпертиреозу легкого ступеня вираженості (1-ша група) цей показник значно знижувався (-23 %, $P < 0,05$); а за експериментального тиреотоксикозу він, навпаки, подовжувався (+14 %, $P < 0,05$).

Таблиця 2. Значення латентного періоду «М-відповіді» та латентного періоду метричного укорочення передньомілкового м'яза білих щурів за різного тиреоїдного статусу ($M \pm m$; $n=10$)

Група тварин	Латентний період генерації «М-відповіді», мс	Різниця відносно контролю	Латентний період метричного скорочення м'яза, мс	Різниця відносно контролю
Гіпертиреоз (1-ша група)	$1,76 \pm 0,075$	$-0,84 \pm 0,093$ (-32 %)*	$22,9 \pm 0,99$	$-6,9 \pm 1,34$ (-23 %)*
Тиреотоксикоз (2-ша група)	$3,15 \pm 0,087$	$+0,55 \pm 0,104$ (+21 %)*	$33,9 \pm 1,04$	$+4,1 \pm 1,38$ (+14 %)*
Контроль	$2,60 \pm 0,056$	-	$29,8 \pm 0,91$	-

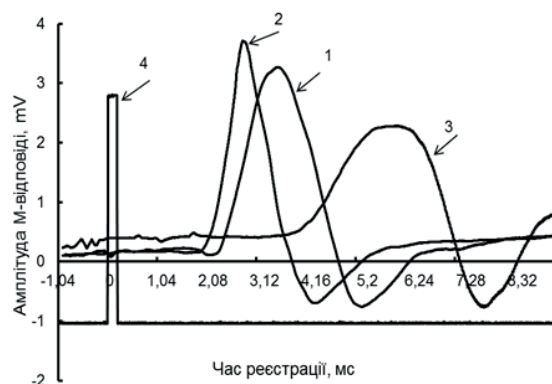


Рис. 1. Записи-оригінали «М-відповідей» переднього-м'язу щурів з різним тиреоїдним статусом: 1 – еутиреоз (контроль), 2 – гіпертиреоз, 3 – тиреотоксикоз, 4 – електричний імпульс подразнення

Отже характер впливу трийодтироніну на функціональні показники скоротливого акту різноспрямовано змінювалися залежно від ступеня вираженості експериментального гіпертиреозу. Пояснення отриманих результатів може бути зроблено з урахуванням наявних у літературі даних щодо спрямованості дії тиреоїдних гормонів на морфологічні, електрофізіологічні та біохімічні показники скелетного м'яза. Так, є відомості щодо позитивного впливу гіпертиреоїдного стану на щільність натрієвих каналів у плазматичній мембрані [5, 18], тривалість перебування їх у відкритому стані в момент деполяризації мембрани м'язового волокна [5, 16], а також на активність і концентрацію Ca^{2+} -АТФази в мембранах саркоплазматичного ретикула, спорідненість м'язового волокна до Ca^{2+} [4, 19], синтез міофібрілярних білків, активність АТФази міозину, що визначає тип м'язового волокна і його швидкісні характеристики [20].

Таким чином, якщо припустити ймовірність здійснення будь-яких із вищезгаданих модульовальних ефектів тиреоїдних гормонів на різні ланки нервово-м'язового апарату, то можна очікувати поліпшення мобільних характеристик скелетної мускулатури під впливом фізіологічних і підвищених концентрацій йодтиронінів. Цілком можливо, що якийсь один або навіть декілька з цих механізмів реалізуються за експериментального гіпертиреозу і проявляються у скороченні латентного періоду генерації «М-відповіді» і латентного періоду скорочення м'яза, тобто з точки зору функціональної характеристики проявляють позитивний ефект.

У основі феномена подовження латентного періоду генерації «М-відповіді» при важкій формі тиреотоксикозу може лежати ефект тиреоїдних гормонів на тривалості латентного періоду і моносинаптичної відповіді, а також латентного періоду потенціалу дії і його амплітуди при непрямому подразненні м'яза [6]. На думку деяких авторів, порушення процесу нервово-м'язової передачі під впливом надлишкових концентрацій тиреоїдних гормонів в організмі, а отже і генерації «М-відповіді», може виникати через якісні або кількісні зміни у холінорецепторній системі [21], нестачу ацетилхоліну в пресинаптичних терміналах або утруднення його викиду, а також зміни активності холінестерази [7, 21].

Таким чином, як позитивні, так і негативні зміни з боку функціональних параметрів скелетного м'яза за експериментального гіпертиреозу і тиреотоксикозу можуть бути пов'язані зі здатністю трийодтироніну відповідно модулювати значну кількість механізмів реалізації процесу збудження скелетного

Таблиця 3. Час розвитку максимальної амплітуди позитивної хвилі «М-відповіді» у білих щурів за різного тиреоїдного статусу ($M \pm m$; $n=10$)

Група тварин	Час, мс	Різниця до контролю
Гіпертиреоз (1-ша група)	$0,89 \pm 0,016$	$-0,25 \pm 0,032$ (-22 %)*
Тиреотоксикоз (2-га група)	$1,76 \pm 0,038$	$+0,62 \pm 0,038$ (+54 %)*
Контроль	$1,14 \pm 0,028$	-

м'яза на різних етапах нервово-м'язової передачі.

ВИСНОВКИ

1. При індукованому трийодтироніном (15 мкг/кг протягом 4 діб) експериментальному гіпертиреозі легкого ступеня вираженості (ректальна температура $38,5 \pm 0,1$ °C) передньомілковий м'яз щурів в умовах *in situ* набуває високих функціональних можливостей, що проявляється в скороченні латентного періоду генерації «М-відповіді» (-32 %), зменшенні часу розвитку її висхідної позитивної хвилі (-22 %) і значному зниженні латентного періоду метричного скорочення м'яза (-23 %).

2. При експериментальному тиреотоксикозі (ректальна температура $39,4 \pm 0,2$ °C), сформованому екзогенними ін'єкціями щурів трийодтироніну (25 мкг/кг протягом 4 діб), в умовах *in situ* розвиваються виражені патофізіологічні негативні зміни у функціональному стані передньомілкового м'яза: подовжується латентний період генерації «М-відповіді» (+21 %), збільшується час розвитку її висхідної позитивної хвилі (+54 %), а також подовжується латентний період метричного скорочення м'яза (+14 %).

3. Робиться висновок щодо різноспрямованих змін функціонального стану скелетного м'яза щурів за експериментального гіпертиреозу і вираженого тиреотоксикозу.

Т.И. Станишевская, И.П. Аносов

ХАРАКТЕР ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНОГО ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СОКРАЩЕНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ (*M. TIBIALIS ANTERIOR*) БЕЛЫХ КРЫС

На белых крысах с экспериментальным трийодтирониновым гипертиреозом (15 мкг/кг в течение 4 сут внутривенно) и тиреотоксикозом (25 мкг/кг в течение 4 сут) в условиях *in situ* изучали основные параметры функционального состояния скелетной мышцы (*m. tibialis anterior*) при вызванном сокращении. Показателем степени выраженности гипертиреоза служили ректальная температура,

потребление кислорода, степень тахикардии, масса тела и концентрация свободного трийодтиронина крови. Показано, что при экспериментальном гипертиреозе легкой степени выраженности (ректальная температура $38,5 \pm 0,1$ °C) мышца приобретает высокие функциональные способности, что выражается в укорочении латентного периода генерации «М-ответа» (-32%), времени развития его восходящей положительной волны (-22%) и уменьшении (-23%) латентного периода метрического укорочения мышцы при одиночном изотоническом сокращении. При экспериментальном тиреотоксикозе (ректальная температура $39,4 \pm 0,2$ °C) наступают выраженные патофизиологические негативные изменения в функциональном состоянии скелетной мышцы: удлиняются латентный период генерации «М-ответа» (+21%), время развития его восходящей положительной волны (+54%) и латентный период метрического укорочения (+14%). Делается заключение о разнонаправленном изменении функционального состояния скелетной мышцы крыс при экспериментальном гипертиреозе и выраженном тиреотоксикозе.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны; скелетная мышца; «М-ответ»; латентный период сокращения мышцы.

T.I. Stanishevskaya, I.P. Anosov

THE INFLUENCE OF DIFFERENT THYROID STATUS ON ELECTROPHYSIOLOGICAL AND MYOGRAPHICAL PARAMETERS OF SKELETAL MUSCLES CONTRACTION IN WHITE RATS

In experiments on white rats the character of effect of experimental hyperthyroidism was studied on the skeletal muscle (*m. tibialis anterior*) of white rats. It is shown that at experimental hyperthyroidism (rectal temperature of $38,5 \pm 0,1$ °C) a muscle acquires high functional capabilities. It is shown that the latent period of generation and the time of development of positive wave "M-responses" are (-32%) and (-22%). The latent period of shortening of muscle diminishes (-23%) at single contraction. During experimental thyrotoxicosis (rectal temperature of $39,4 \pm 0,2$ °C) we observed physiopathological changes in the functional state of skeletal muscle: the lengthening of the latent period of generation of "M-responses" (+21%), an increase in the time of development of positive wave (+54%) and of latent period of shortening of muscle (+14%). It is concluded that in experimental hyperthyroidism and thyrotoxicosis the functional state of skeletal muscle changed in different directions. Keywords: thyroid hormones; skeletal muscle; "M-responses"; the latent period of muscle contraction.

Bogdan Khmelnsky Melitopol State Pedagogical University

REFERENCES

1. Sobolev VI, Trush VV, Litvyak KA, Morozova IN. Frequency Dependence of Parameters of the M Response of the Rat M. Tibialis in the Norm and in Experimental Hyperthyroidism and Hypercorticism. *Neurophysiology*. 2015; 47(1):53-60.
2. Stanishvskaya TI, Sobolev VI. Characterization of the latent period of excitation and shortening of anterior tibial muscle of white rats depending on the blood level of triiodothyronine. *Fiziol Zh*. 2012; 58(1):68-75. [Ukrainian].
3. Rodinskiy OG, Guz VA, Guz LV. Overview of efferent brand excitability of spinal reflex arcs under conditions of model hyperthyroidism. *Fiziol Zh*. 2010; 56(2):48-9. [Ukrainian].
4. Connelly TJ, Hayek R, Ukhareva SM. L-thyroxine activates the intracellular Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem Mol Biol Int*. 1994; 32(3):441-8.
5. Harrison AP, Clausen T. Thyroid hormone-induced upregulation of Na^{+} channels and Na^{+} -K $^{+}$ pumps: implications for contractility. *Am J Physiol*. 1998; 274(5):R864-R867.
6. Nerush PA, Makii EA, Rodinsky AG. Age features of functioning of nervous - muscular system of rats in conditions hyperthyroidism. *Fiziol Zh*. 2001; 47(5):12-7. [Ukrainian].
7. Rodynskiy OG. Analysis of activity of cholinergic receptors in skeletal muscle conditions of experimental hyperthyroidism. *Odessa Med J*. 2001; 68(6):33-5. [Ukrainian].
8. Sobolev VI, Moskalets TV. Influence of experimental athyreosis on energy isometric contraction of the muscles of white rats (reaceach of in situ). *Fiziol Zh*. 2007; 53(5):86-90. [Ukrainian].
9. Kmetko IL, Sobolev VI. Characteristic performance of skeletal muscle of white rats during development of experimental hyper- and thyrotoxicosis (research in situ). *Bull Exp Biol Med*. 2012; 94(3):236-40. [Ukrainian].
10. Sobolev VI, Makhsudov MS, Merkhelevich LG, Rabo Hemedo, Dakoshta M Influence of 2,4-dinitrophenol on the temperature effect of muscle contraction in experimental hyperthyroidism. *I.M. Sechenov Physiol J*. 1995; 81(3): 80-4. [Russian].
11. Stanishvskaya TI. The dependence of thermal cost of muscular contraction of white rats from level of circulatory triiodothyronine after highest limit of physiological norme. *Bull Exp Biol Med*. 2012; 1(94):247-52. [Ukrainian].
12. Gecht B.M. Theoretical and clinical electromyography. Leningrad: Science; 1990. [Russian].
13. Halbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol rev Cambridge Phil Soc*. 2000; 75(4):519-631.
14. Valdina EA. Thyroid disease. SPb.: Peter; 2006. [Russian].
15. Brodie C, Sampson SR. Characterization of thyroid hormone effects on Na-K pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes. *Endocrinology*. 1988; 2:891-7.
16. Harris DR, Green WL, Craelius W. Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1991; 1095(2):175-1.
17. Marzoev A.Y., Rubezhov B.V., Klebanov G.Y. Thyroxin action on the function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Bull Exp Biol Med*. 1980; 5:541-2. [Russian].
18. Brodie C, Sampson SR. Characterization of thyroid hormone effects on Na^{+} channel synthesis in cultured skeletal myotubes: role of Ca^{2+} myotubes. *Endocrinology*. 1989; 2:842-9.
19. Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Endocr Res*. 1989; 15:651-82.
20. Valiullin VV. Neurotrophic control of skeletal muscle in hyperthyroid animals. *Questions of Neurobiology (scientific papers)*. Kazan. 1987; 68:48-53. [Russian].
21. Rodynskiy OG. Mechanisms of functioning of the components of spinal reflex arcs under the conditions of hyperthyrosinemia. *Med Perspective*. 2009; 14(2):8-17. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 02.06.2015*

Омега-3 поліненасичені жирні кислоти нормалізують функцію мітохондрій, ферментів про- та антиоксидантної системи та експресію цитохрому P450 2E1 при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця

О.С. Панасюк, А.М. Шиш, **О.О.Мойбенко**

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: panasiuk@biph.kiev.ua

Досліджено вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот (ω -3 ПНЖК) на функціонування інтерфібрилярної та субсарколемальної фракцій мітохондрій міокарда щурів, зміни рівня експресії цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) та активність ферментів антиоксидантного захисту за умов ізопротереноліндукованого ураження міокарда. У досліджах із застосуванням ω -3 ПНЖК (препарат епадол 0,1 мл/100г протягом 4 тиж) при пошкодженні серця (ізопротеренол 60 мг/кг двічі на добу, підшкірно) було показано зменшення набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій (на 54,84 та 65,52 % відповідно), що свідчить про попередження порушення функції. Встановлено, що ω -3 ПНЖК за умов ураження міокарда запобігають зниженню активності ферментів антиоксидантного захисту каталази та супероксиддисмутази (у 2,6 та 7,1 раза відповідно). Виявлений нами розвиток оксидативного стресу при ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда може бути спровоковано значним підвищенням експресії цитохрому P450 2E1 (на 73,3%), що попереджується при застосуванні ω -3 ПНЖК.

Ключові слова: субсарколемальні, інтерфібрилярні мітохондрії; ізопротеренол; ω -3 поліненасичені жирні кислоти; малоновий діальдегід; супероксиддисмутаза; каталаза; цитохром P450 2E1.

ВСТУП

Нині доведено, що важливою ланкою в патогенезі серцево-судинних захворювань є розвиток мітохондріальної дисфункції [1]. В ізопротереноловій моделі пошкодження міокарда важливе значення відводиться погіршенню функціонування дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів, дії вільних радикалів, які утворюються в результаті процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [2]. Важливу роль у порушенні різних клітинних функцій відіграє кальційзалежна циклоспоринчутлива мітохондріальна пора (МП) [1, 3], яка вважається потужним фармакологічним об'єктом при корекції хвороб, пов'язаних з мітохондріальною дисфункцією

та індукцією клітинної смерті [2, 4–6].

У кардіоміоцитах є дві функціонально відмінні субпопуляції мітохондрій, локалізованих у різних регіонах клітини: субсарколемальні (ССМ), розташовані під сарколемою, та інтерфібрилярні (ІФМ), розташовані між міофібрилами [4, 7]. Відрізняються вони білковим і ліпідним складом, біохімічними властивостями та функціями [4]. Хоча ІФМ-фракція сягає 80% загального мітохондріального вмісту [4], більшість досліджень на ізольованих мітохондріях виконано на субпопуляції ССМ. Оскільки мітохондрії є основними продуцентами активних форм кисню (АФК), то ці органели являють собою важливі мішені для нових терапевтичних засобів. Водночас лишається

© О.С. Панасюк, А.М. Шиш, **О.О.Мойбенко**

недослідженим ефект ω -3 ПНЖК на ССМ-та ІФМ-фракції мітохондрій серця при ізопротереноловому ураженні серця.

ω -3 ПНЖК відіграють надважливу структурно-функціональну роль, формуючи фосфоліпідну складову біомембран, забезпечують нормальний трансмембранний транспорт і функціонування комплексів мембрано-асоційованих ензимів [8, 9], контролюють транскрипцію багатьох генів у клітинах. Раніше нами було показано на суспензії мітохондрій, що при застосуванні ω -3 ПНЖК знижувалася швидкість генерації супероксид-аніона, а також спостерігалось ослаблення вільнорадикальних процесів за умов цукрового діабету [10].

Вважають, що при адренергічному пошкодженні важливим механізмом патогенезу є оксидативний стрес, який розвивається внаслідок дисбалансу про- та антиоксидантних процесів у клітинах різних органів. Одним з визначальних факторів, що регулюють такий баланс у клітинах є цитохром P450 2E1 [11]. Зміни рівня його експресії можуть призводити до порушення функціонування організму як на клітинному, так і на системному рівнях [12]. Підвищення за певних умов експресії цитохрому P450 2E1 спричиняє надлишкове утворення АФК та їхніх метаболітів, що може викликати виснаження системи антиоксидантного захисту, посилення пероксидних процесів та розвитку оксидативного стресу в клітині [11, 12]. Тому питання про можливість регуляторного впливу на процеси оксидативного стресу лишається актуальним. Зокрема, не з'ясовано, чи мають захисний вплив ω -3 ПНЖК на оксидативні процеси та цитохром P450 2E1 при ізопротереноловому ураженні серця.

Метою нашої роботи було дослідити вплив ω -3 ПНЖК на ССМ та ІФМ за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда щурів та оцінити зміни експресії цитохрому P450 2E1, активність ферментів антиоксидантної системи супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження були проведені на 24 самцях щурів лінії Вістар масою 280–300 г, віком 4 міс. У роботі використовували 3 групи щурів: І - контрольні (n=7), ІІ - щури, яким вводили підшкірно розчин ізопротеренолу («Sigma», США) в дозі 60 мг/кг двічі з інтервалом 24 год (n=7), ІІІ - тварини, яким давали препарат епадол у дозі 0,1 мл/100 г протягом 4 тиж, а потім вводили ізопротеренол, як і у ІІ групі (n=10). Епадол (Київський вітамінний завод) містить не менш ніж 43% ω -3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру).

Дві субпопуляції мітохондрій серця виділяли відповідно до методу, описаного Palmer [7]. Серця промивали льодовим 0,9%-м NaCl та подрібнювали в буфері А (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НCl – 20; рН 7,2, який містив 1 ммоль/л EGTA, 0,5% бичачого сивороваткового альбуміну. Подрібнену тканину розтирали тefлоновим гомогенізатором. Гомогенат центрифугували при 700g і 2°C, з супернатанту виділяли ССМ методом диференційного центрифугування. Осад, що залишився, ресуспендували в буфері А, і обробляли протеазою Nagarse («Sigma Chemical Co.», США) в концентрації 2,5 мг/г тканини і гомогенізували. Гомогенат розводили в 2 рази буфером А і з нього виділяли ІФМ диференційним центрифугуванням.

Дослідження набухання мітохондрій проводили методом спектрофотометричної ресстрації, часовий хід визначали в низько-кальцієвому розчині (без EGTA дистильована вода містить $(1-3) \cdot 10^{-5}$ моль/л вільних іонів кальцію) та при дії високих (кінцева концентрація 10^{-4} моль/л CaCl_2) концентрацій кальцію, як циклоспорин А-чутливе набухання. Мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl - 120, тріс-НCl - 10, KH_2PO_4 - 10, сукцинат Na - 10; рН 7,2, і реєстрували зниження оп-

тичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda = 520$ нм протягом 10 хв. Результати представлені як ΔD – різниця між показником оптичної густини на n -й хвилині та значенням на 1-й хвилині. Розчин CaCl_2 додавали на 5-й хвилині інкубації. Концентрація білка становила 0,1 мг/мл.

Вміст білка P450 2E1 у серці визначали методом імуноблотингу, використовуючи специфічні поліклональні антитіла: анти-P450 2E1 (раніше отримані у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України) та анти- β -актин («Sigma», США). Тотальний білок кожного зразка (по 50 мкг) розділяли за допомогою електрофорезу у 12% -му поліакриламідному гелі за наявності 0,1% додецилсульфату натрію [13]. Імуноблотинг із застосуванням антитіл до P450 2E1 та β -актину проводили згідно з рекомендаціями фірми виробника («Sigma», США). Результати візуалізовували та обраховували за допомогою спеціального обладнання ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software («Bio-Rad», США). Вміст білка P450 2E1 у серці тварин вираховували як відношення кількості досліджуваних білків до білка β -актину в одному і тому самому зразку. Білок β -актин було використано як внутрішній контроль завантаження тотального білка до гелю.

Біохімічними методами у плазмі крові тварин визначали вміст продуктів ПОЛ малонового діальдегіду (МДА) [14] та активність антиоксидантних ферментів СОД [14] та каталази [15]. Обчислювали антиоксидантний коефіцієнт (АК), який визначали як співвідношення активності СОД•каталаза/МДА [14].

Для оцінки відмінності між показниками, отриманими у досліджуваних групах, використовували критерій t Стьюдента. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як вірогідні. Результати представлено у вигляді середніх значень для $n = 7-10$ із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При порівнянні фракцій ССМ та ІФМ у тварин I та II групи спостерігалось вірогідне зменшення світлопоглинання за відсутності дії індуктора від $0,06 \pm 0,01$ і $0,08 \pm 0,01$ до $0,31 \pm 0,03$ і $0,29 \pm 0,03$ відповідно (рис. 1). Максимальний рівень зниження світлопоглинання в II групі, незалежний від дії кальцію, зростав в 3,5 раза для ІФМ та в 5,16 раза для ССМ. Але вірогідної різниці в реакції між фракціями ССМ та ІФМ не виявлено. Слід зазначити, що в фракції ІФМ ступінь набухання був меншим порівняно з ССМ за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда. У разі навантаження контрольних мітохондрій кальцієм рівень набухання зростав до $0,33 \pm 0,05$ для ССМ та $0,37 \pm 0,66$ для ІФМ.

Надалі було виявлено, що при попередньому застосуванні ω -3 ПНЖК при пошкодженні міокарда рівень кальцій-незалежного набухання мітохондрій дійсно є меншим на 54,84% для ССМ та на 65,52% для ІФМ порівняно з II групою. Значення ΔD знижується до $0,14 \pm 0,02$ та $0,1 \pm 0,03$ відповідно (див. рис. 1). Встановлено, що при застосуванні ω -3 ПНЖК фракція ІФМ менш чутлива до набухання порівняно з ССМ в умовах пошкодження міокарда.

У результаті біохімічних досліджень виявлено зростання інтенсивності перекисних процесів у плазмі крові тварин за умов ураження міокарда. Так, показано, що у II групі концентрація МДА у плазмі крові була на 84% вищою щодо контролю (таблиця). Встановлено, що розвиток пошкодження серця призводив до зниження активності каталази у 1,46 раза та СОД у 8 разів ($P < 0,05$) порівняно з групою контролю. Застосування ω -3 ПНЖК за умов ураження міокарда попереджує зниження активності ферментів антиоксидантного захисту. Зокрема, активність каталази і СОД внаслідок модифікації жирнокислотного складу клітинних мембран була вищою в 2,65

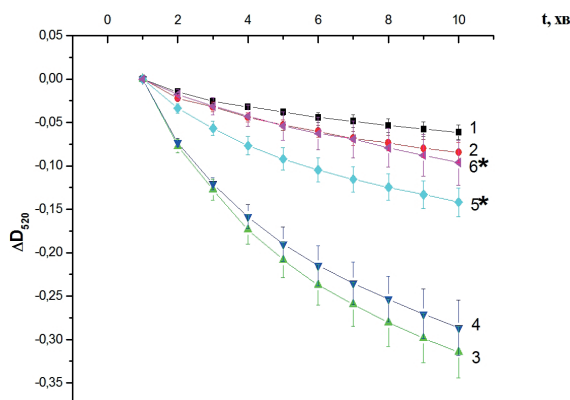


Рис. 1. Часова залежність світлопоглинання суспензії мітохондрій виділених з сердець тварин, яким вводили ізопротеренол: 1 – субсарколемальні мітохондрії (контроль); 2- інтерфібрилярні мітохондрії (контроль); 3– субсарколемальні мітохондрії, виділені з пошкодженого міокарда; 4- інтерфібрилярні мітохондрії виділені з пошкодженого міокарда; 5 - субсарколемальні мітохондрії, виділені з пошкодженого міокарда за впливу ω -3 ПНЖК; 6 - інтерфібрилярні мітохондрії, виділені з пошкодженого міокарда за впливу ω -3 ПНЖК; * $P<0,5$ вірогідно порівнянню з відповідною контрольною групою

($P<0,05$) та 7,1 ($P<0,05$) разів порівняно з II групою. Об'єктивним показником зміни про- та антиоксидантної рівноваги є інтегральний показник – фактор антиоксидантного стану або АК, який свідчить про підсилення окисних процесів чи активацію ферментів антиоксидантного захисту. Встановлено, що при ізопротереноліндукованому ураженні міокарда АК був знижений (оскільки активність СОД знижувалася, а вміст МДА, навпаки, підвищувався). За умов застосування ω -3 ПНЖК він підвищувався та наближався до значень контрольної групи (див. таблицю).

Виявлений нами розвиток оксидативного

стресу за умов пошкодження міокарда може бути спровоковано значним підвищенням експресії цитохрому P450 2E1 – одного з найпотужніших прооксидантів клітин. Так, дійсно в II групі рівень експресії білка P450 2E1 збільшився на 73,3% порівняно з контролем (рис. 2). Застосування ω -3 ПНЖК за умов пошкодження міокарда призводило до зниження вмісту білка цитохрому P450 2E1 (рис. 2). Це могло бути спричинено змінами експресії гена ферменту на всіх етапах регуляції його біосинтезу, зокрема на транскрипційному рівні. Аналіз літературних даних показав, що ω -3 ПНЖК активують PPAR α (від англ. peroxisome proliferator-activated receptor), що

Вплив застосування ω -3 ПНЖК на про- та антиоксидантні процеси в плазмі крові щурів при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця ($M \pm m$; $n=10$).

Показники	Контроль (I група)	Ізопротеренол (II група)	Ізопротеренол на фоні дії ω -3 ПНЖК (III група)
Малоновий діальдегід, мкмоль \cdot мг $^{-1}$ білка	0,94 \pm 0,02	1,73 \pm 0,15*	1,71 \pm 0,26
Супероксиддисмутаза, ум.од. \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка	3,84 \pm 0,75	0,47 \pm 0,8*	3,34 \pm 0,42**
Каталаза, ммоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка	30,46 \pm 5,89	20,82 \pm 3,5	55,28 \pm 4,8**
Антиоксидантний коефіцієнт, ум.од.	124,43	5,65	107,97

* $P<0,05$ порівняно з контролем; ** $P<0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили ізопротеренол.

призводить до індукції експресії генів ензимів мітросомного окиснення жирних кислот [9]. Разом з цим ω -3 ПНЖК можуть модулювати вміст ферменту і на посттрансляційному рівні регуляції його експресії. Також показано, що ці речовини є ефективними альтернативними субстратами у шляхах цитохром-залежного метаболізму арахідонової кислоти у клітинах. При цьому цитохром P450 2E1 окиснює ω -3 навіть більш ефективно, ніж ω -6 ПНЖК [16]. Такі зміни експресії ферменту не призводили до зрушення гомеостазу, а саме порушення балансу про- та антиоксидантних процесів в клітинах досліджуваного органа. Пошкодження мітохондріального метаболізму відіграє важливу роль при серцевій недостатності [8, 17, 18]. Новизною нашої роботи є те, що було порівняно ступінь пошкодження двох фракцій мітохондрій при дії ізопротеренолу, а також виявлено рівень захисного впливу ω -3 ПНЖК. Варто зазначити, що ці кислоти однаково вбудовуються в мембрану кожної субпопуляції [18], тобто виявлена нами різниця в ефекті зумовлена властивостями самих фракцій мітохондрій. Так, показано, що ССМ мають вищий вміст кардіоліпіну, а ІФМ - вищу експресію ключових компонентів пори, зокрема, потенціалзалежного аніонного каналу і циклофіліну D, крім того, вищий вміст цитохрому c [4].

Серед можливих механізмів негативної дії ізопротеренолу на мітохондрії може бути також те, що катехоламіни спричиняють

вивільнення вільних жирних кислот, які в свою чергу діють як роз'єднувачі окисного фосфорилювання та індують відкриття мітохондріальної пори, знижуючи мембранний потенціал нижче від порогового рівня чи прямо взаємодіючи з компонентами пори, зокрема з аденіннуклеотидтранслоказом [6]. Водночас ω -3 ПНЖК знижують вміст вільних жирних кислот [8]. Тим не менш, чи відрізняються в чутливості дві фракції мітохондрій до індукції мітохондріальної пори при їх дії, даних нема.

Хоч і високий мембранний потенціал мітохондрій більш вигідний щодо попередження відкриття МП, але встановлено прямий зв'язок між рівнем мембранного потенціалу та продукцією АФК. І, дійсно, ССМ, які мають вищий рівень продукції АФК, мають і вищий потенціал [4]. ω -3 ПНЖК, в свою чергу, знижують мітохондріальний мембранний потенціал [19].

Показано, що ω -3 ПНЖК знижують також вміст мітохондріального кальцію [20], водночас ізопротеренол підвищує внутрішньоклітинну його концентрацію [21]. Наші попередні дані [5] та інших авторів вказують, що застосування ω -3 ПНЖК зменшує кальційіндуковане відкриття МП [10]. Все вищесказане може свідчити що така захисна дія ω -3 ПНЖК опосередковується, принаймні, частково через мітохондріальні механізми.

Суперечливі літературні дані щодо порівняння чутливості двох фракцій мітохонд-

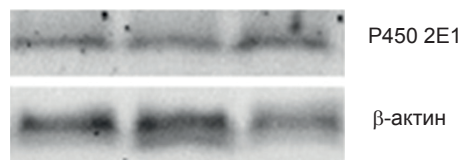
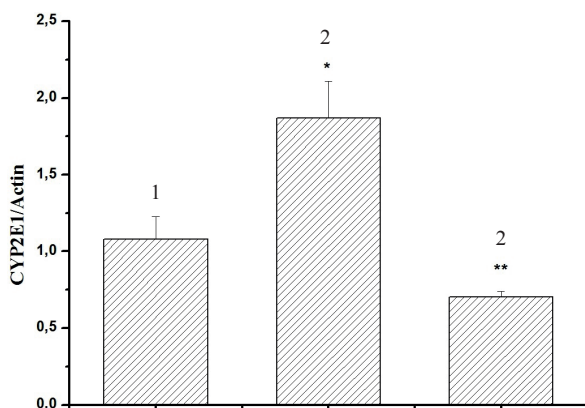


Рис. 2. Експресія білка цитохрому P450 2E1 у тканині серця шурів за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда при застосуванні ω -3 ПНЖК: 1- контроль; 2 - ізопротереноліндуковане пошкодження міокарда; 3 - пошкодження міокарда за впливу ω -3 ПНЖК. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили ізопротеренол

рій до підвищеного вмісту кальцію. Palmer та співавт. [22], вважають, що ІФМ мають більшу стійкість до навантаження кальцієм, а за даними Adhietty та співавт. [4], ССМ більш стійкі. Згідно з результатами нашої роботи, ці дві фракції не відрізняються за чутливістю до високих концентрацій кальцію. ω -3 ПНЖК більш ефективно захищають фракцію ІФМ, що узгоджується з отриманими раніше даними про протекторний вплив знову таки на цю фракцію при ізопротереноловому пошкодженні міокарда [5].

Відомо що дія ізопротеренолу викликає оксидативний стрес, тоді як застосування антиоксидантів попереджує таке пошкодження [2]. Також відомо, що вільні радикали полегшують відкривання пори при дії кальцію та, можливо, самі індують її відкривання [3]. Тобто пошкоджувальна дія ізопротеренолу на мітохондрії може бути зумовлена саме оксидативним стресом. Одні автори вважають, що ω -3 ПНЖК чутливі до ПОЛ [10], хоча інші стверджують, що вони обмежують оксидативний стрес посиленням антиоксидантного захисту, зокрема підвищуючи вміст мітохондріальної СОД2 та гемоксигенази-1 [23]. Виявлений нами захисний ефект ω -3 ПНЖК при ізопротереноловому пошкодженні, що був у різному ступені виражений між фракціями, може бути пояснено станом про- та антиоксидантної системи. Відомо, що дві фракції мітохондрій мають різний рівень утворення АФК – ССМ в 2,7 раза більше виробляють АФК, ніж ІФМ [4]. За патологічних умов у ССМ підвищується рівень утворення H_2O_2 , в той час як в ІФМ він не змінюється [17]. З іншого боку, є дані, що рівень експресії антиоксидантного ферменту Mn-СОД не відрізняється між субпопуляціями [4].

Раніше нами також було показано, що одним з кардіопротекторних механізмів ω -3 ПНЖК може бути істотне зменшення пошкоджувального впливу вільних радикалів, продуктів ПОЛ за умов ішемії-реперфузії [24]. Вже підтверджено, що ці кислоти підвищують стійкість клітинних мембран до дії стресорних факторів [8, 23]. Аналізуючи

літературні дані і отримані результати, можна припустити, що ω -3 ПНЖК попереджують набухання мітохондрій пригніченням вільнорадикальних процесів і проявів стресу ендоплазматичного ретикулума в міокарді. Відомо, що підвищена продукція АФК в мітохондріях та розвиток оксидативного стресу призводять до зростання утворення пероксинітриту. Зважаючи на це можна передбачити, що при ізопротереноліндукованому ураженні міокарда також спостерігається дисбаланс у неферментній ланці системи антиоксидантного захисту, а саме у системі глутатіону, на що вказують інші праці [24]. Все вищесказане свідчить про протекторний ефект ω -3 ПНЖК та не викликає сумніву у перспективності подальших досліджень і розробок з впровадження ω -3 ПНЖК у клінічну практику.

Таким чином, застосування ω -3 ПНЖК запобігає набухання мітохондрій в серці за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда, особливо фракції ІФМ. У разі застосування ω -3 ПНЖК знижується вміст білка цитохрому P450 2E1 та запобігає зниженню активності ферментів антиоксидантного захисту. ω -3 ПНЖК попереджують розвиток дисфункції мітохондрій та можуть бути рекомендовані як компонент лікарської терапії хворих, які перенесли інфаркт міокарда.

**О.С. Панасюк, А.М. Шиш,
А.А. Мойбенко**

ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ НОРМАЛИЗИРУЮТ ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ, ФЕРМЕНТОВ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОХРОМА P450 2E1 ПРИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЦА

Исследовано влияние ω -3 полиненасыщенных жирных кислот (ω -3 ПНЖК) на функционирование интерфибриллярной и субсарколеммальной фракций митохондрий миокарда крыс, изменение уровня экспрессии цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) и активность ферментов антиоксидантной защиты при изопротеренолиндуцированном повреждении миокарда. В экспериментах

с применением ω -3 ПНЖК (препарат эпaдол 0,1 мл/100 г в течение 4 нед) при повреждении сердца (изопроterenол 60 мг/кг/день дважды подкожно) было показано уменьшение набухания субсарколеммальной и интерфибриллярной фракций митохондрий на 54,84 и 65,52 % соответственно, что свидетельствует об уменьшении повреждения функций митохондрий сердца. Было установлено, что применение ω -3 ПНЖК при повреждении миокарда предупреждает снижение активности ферментов антиоксидантной защиты каталазы и супероксиддисмутазы (2,65 и 7,1 раза соответственно). Выявленное нами развитие оксидативного стресса при изопротеренолиндуцированном повреждении миокарда может быть вызвано значительным повышением экспрессии цитохрома P450 2E1 (на 73,3%), что предотвращается применением ω -3 ПНЖК.

Ключевые слова: субсарколеммальные, интерфибриллярные митохондрии; изопроterenол; ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты; малоновый диальдегид; супероксиддисмутаза; каталаза; цитохром P450 2E1.

O.S. Panasiuk, A.M. Shysh, O.O. Moibenko

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS NORMALIZE THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA, ACTIVITY OF ENZYMES OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM AND THE EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 2E1 AFTER ISOPROTERENOL-INDUCED MYOCARDIAL INJURY

We have studied the influence of dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) on the functioning of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial fractions of rat myocardium, changes in expression of cytochrome P450 (CYP2E1) and the activity of enzymes of prooxidant-antioxidant system after isoproterenol-induced myocardial injury. It has been found that in vivo administration of ω -3 PUFA (Epadol 0.1 ml/100 gr of weight for 4 weeks) significantly reduced the swelling of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial fractions by 65.52% 54.84% respectively, pointing for a decrease of damage of the mitochondrial function evoked by in vivo administration of isoproterenol. In vivo administration of ω -3 PUFAs prevents a decrease in the activity of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase (2.65 and 7.1-fold, respectively) after isoproterenol-induced myocardial injury. We suggest that the development of oxidative stress after isoproterenol-induced myocardial injury can be caused by a significant increase in the expression of cytochrome P450 2E1 (73.3%), and administration of ω -3 PUFAs prevents such changes.

Key words: mitochondria; subsarcolemmal; interfibrillar; isoproterenol; ω -3 polyunsaturated fatty acid; malondialdehyde; superoxide dismutase; catalase; cytochrome P450 2E1.

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

REFERENCES

1. Shimanskaia TV, Strutinskaia NA, Vavilova GL, Goshovskaia IuV, Semenikhina EN, Sagach VF. Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor. *Ros Fiziol Zh im I M Sechenova*. 2013 Feb 99(2):261-72. [Russian].
2. Izem-Meziane M, Djerdjouri B, Rimbaud S, Caffin F, Fortin D, Garnier A, Veksler V, Joubert F, Ventura-Clapier R. Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 302:665-74.
3. Galindo MF, Jordán J, González-García C, Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol*. 2003 139:797-804.
4. Adhithetty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, Hood DA. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Oct;289(4):C994-C1001.
5. Panasiuk O, Shysh A, Bondarenko A, Moibenko O. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca²⁺-induced injury. *Exp Clin Cardiol* 2013 18.-e60-e64.
6. Wieckowski MR, Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*. 1998 423:339-42.
7. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem*. 1977 Dec 10;252(23):8731-9.
8. De Caterina R. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med*. 2011 364:39-50.
9. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):242-7.
10. Zhukovska AS, Shysh AM, Moibenko OO. Study of the impact of omega-3 PUFA on fatty acid composition of heart, respiration and swelling of mitochondria of the heart in diabetes. *Fiziol Zh*. 2012;58(2):16-26. [Ukrainian]
11. Cederbaum AI. Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Subcell Biochem*. 2013 67:105.
12. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res*. 2005 Jan 6;569(1-2):101-10.
13. Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680.
14. Stephanov OV. editor. Preclinical studies of drugs. Kyiv: Avicena: 2001. [Ukrainian]
15. Koroliuk M, Ivanova L, Maiorova I, Tokarev V. A method of determining catalase activity. *Lab Delo*. 1988;(1):16-9. [Russian]
16. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3

- long-chain polyunsaturated fatty acids. Pharmacol Rep. 2010 May-Jun;62(3):536-47.
17. Chen Q, Lesnefsky EJ. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. Free Radic Biol Med. 2006 Mar 15;40(6):976-82.
 18. Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. Biochim Biophys Acta. 1994 Oct 21;1227(1-2):53-9.
 19. Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. Lipids 2002 Feb;37(2):193-9.
 20. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. Am J Physiol 1999 276.-P.149-58.
 21. Takuwa Y, Takuwa N, Rasmussen H. The Effects of Isoproterenol on Intracellular Calcium Concentration. J Biol Chem 1988 263:762-8.
 22. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. Am J Physiol. 1986 May;250(5 Pt 2):H741-8.
 23. Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 4;430(1):225-30.
 24. Shysh AM, Kukoba TV, Tumanov's'ka LV, Moïbenko OO. Phospholipid membrane modification as a protection factor of the myocardium during stress injury. Fiziol Zh. 2005;51(2):17-23. [Ukrainian]

*Матеріал надійшов до
редакції 21.08.2015*

Порівняльна характеристика активності апоптотичних процесів у корі різних часток великих півкуль при експериментальній ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету

Т.М. Бойчук, Т.І. Кметь

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці; e-mail: kmet.taras@bsmu.edu.ua

Досліджено вплив цукрового діабету (ЦД) на динаміку інтенсивності апоптозу нейроцитів і гліоцитів кори лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку щурів за умов його ішемічно-реперфузійного пошкодження. Встановлено, що після 20-хвилинної каротидної ішемії з одногодинною реперфузією у тварин без ЦД рівень апоптотичних процесів в нейро- та гліоцитах кори лобової частки залишався незмінним; у корі тім'яної частки активувався апоптоз нейроцитів, у корі скроневої частки – нейро- і гліоцитів. ЦД впродовж 3 міс посилював апоптоз нейронів і гліальних клітин кори лобової та скроневої часток, нейронів кори тім'яної частки та знижував – гліоцитів. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із порушенням вуглеводного обміну активність апоптотичних процесів не змінювалася в КЛЧ і КСЧ та знижувалася – в КТЧ за рахунок гліальних клітин. На 12-ту добу у щурів без ЦД спостереження в корі скроневої частки зростала активність апоптотичних процесів у нейроцитах і знижувалася – в гліоцитах, у корі лобової та тім'яної часток зменшувалася в гліоцитах. У нейроцитах низька концентрація білка p53 відмічалася на тлі зростання щільності p53⁺-клітин. У щурів із діабетом у цей час активність апоптотичних процесів у цілому знижувалася як у нейронах, так і в гліальних клітинах усіх часток кори. Отримані результати свідчать про наявність регіонарних відмінностей динаміки реагування досліджених часток кори великих півкуль на ішемічно-реперфузійне пошкодження за інтенсивністю апоптозу нейронів та гліальних клітин, а також про модифікований вплив ЦД на реакцію вивчених показників.

Ключові слова: цукровий діабет; ішемія-реперфузія головного мозку; кора великих півкуль; апоптоз.

ВСТУП

Протягом останніх років цукровий діабет (ЦД) став глобальною медико-соціальною проблемою. У більшості країн світу він посідає третє місце серед причин смерті [1]. Наявність цього захворювання в декілька разів підвищує ймовірність виникнення гострих порушень мозкового кровообігу, зокрема, ішемічного інсульту [2 - 4].

Останніми роками при вивченні молекулярно-генетичних аспектів формування основних чинників ризику виникнення ендокринних та цереброваскулярних захворювань активно досліджуються механізми

клітинної смерті [5, 6]. З'ясування шляхів загибелі нейронів та гліальних клітин (некроз чи апоптоз) є одним із критеріїв індивідуальної чутливості різних часток неокортекса до цереброваскулярних уражень, оскільки відомо, що апоптотичну загибель клітин вважають “меншим злом” для головного мозку, незважаючи на те, що загальна їх кількість зменшується [7]. Беручи до уваги складність методик оцінки та швидку елімінацію апоптотичних клітин, визначення їх сумарної частки в ішемізованій ділянці головного мозку є непростим завданням, тому такі дослідження є актуальними [8].

© Т.М. Бойчук, Т.І. Кметь

Характеристик активності процесів апоптозу в різних структурах мозку при ішемічно-реперфузійних пошкодженнях чи ЦД в літературі достатньо, однак за умов поєднання таких патологічних станів дослідження поодинокі. Зокрема, підтверджені експериментально порушення апоптотичної активності у тварин із ЦД в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в гіпокампі [9], однак порівняння інтенсивності апоптозу в різних частках кори в динаміці спостереження відсутнє.

Мета нашого дослідження – порівняльний аналіз чутливості нейронів та гліоцитів кори лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку (КЛЧ, КТЧ та КСЧ відповідно) щурів зі стрептозототиніндукованим діабетом до неповної глобальної ішемії-реперфузії за активністю процесів апоптозу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 66 нелінійних білих самцях щурів контрольної групи та тваринах з ЦД, який моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням двомісячним тваринам стрептозототину у дозі 60 мг/кг («Sigma», США) [10]. Експериментальну групу складали щури із рівнем глікемії вище ніж 10 ммоль/л. По досягненні 5 міс у частини тварин контрольної групи та тих, що мали ЦД (n=11), моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію, для чого під внутрішньоочеревинним наркозом (каліпсол, 75 мг/кг) переднім середнім шийним доступом виділяли обидві загальні сонні артерії, на які накладали кліпси впродовж 20 хв. Після цього кровотік по судинах відновлювали для досягнення реперфузії [11]. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії частину тварин виводили з експерименту через годину по завершенні реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу.

Евтаназію здійснювали під каліпсоловим наркозом відповідно до основних положень GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охо-

рону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Мозок виймали на холоді. За координатами стереотаксичного атласу [12] виділяли кору лобової, тім'яної та скроневої часток і поміщали їх у фіксатор Буена на 24 год. Виготовляли серійні зрізи з відповідних відділів кори товщиною 5 мкм, депарафінували їх у ксилолі, здійснювали регідрацію в низхідних концентраціях етанолу (96, 90, 70, 50 %) і тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Вміст білка р53 визначали методом подвійної імунофлуоресценції, для чого регідровані зрізи мозку впродовж 18 год інкубували у вологій камері при 4°С одночасно з первинними кролячими моноклональними антитілами до р53 щура та мишачими моноклональними антитілами до CD4 щура («Beckman Coulter», США), кон'югованими з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв при 37°С зі вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кроля, кон'юговані з Texas Red («Santa Cruz Biotechnology», США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Зрізи вивчали у флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP («Zeiss», Німеччина). Досліджували щільність розташування р53⁺-клітин різних часток кори головного мозку за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина) та концентрацію у них білка р53⁺ [13].

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм t Стюдента для незалежних вибірок. Результати подано у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено (таблиця), що каротидна ішемія з одногодинною реперфузією вплинула на щільність розташування $p53^+$ нервових клітин лише у КСЧ, спричинивши зростання на 34 % щодо контролю. Проте слід зазначити, що в цей період у нейроцитах КТЧ вірогідно (на 19 %) зросла концентрація білка $p53^+$, що при незмінній кількості апоптотичних клітин може свідчити про посилення апоптозу. Таким чином, нейроцити КСЧ і КТЧ реагували на ішемію-реперфузію вже в ранньому періоді спостереження, однак за рахунок різних механізмів – у першому випадку – це збільшення числа апоптотично змінених клітин, у другому – поглиблення вже існуючих змін. Незважаючи на те, що вірогідних змін щільності $p53^+$ -гліальних клітин у тварин в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді не зафіксовано в жодній із досліджуваних часток неокортекса, у гліюцитах КСЧ концентрація білка $p53^+$ зросла на 4 % ($P < 0,001$), що говорить про посилення апоптозу. Водночас у КТЧ відбувся перерозподіл відсотка щільності апоптотично змінених нейро- та гліоцитів: частка $p53^+$ -нейроцитів зросла на 29 % ($P < 0,01$) при одночасному зменшенні на 10 % ($P < 0,01$) частки гліоцитів стосовно відповідних показників у шурів контрольної групи. Отже, можна зазначити, що за всіма дослідженими показниками у тварин без ЦД у ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження найбільшою стійкістю характеризувалася КЛЧ.

За даними літератури [14] експресія білка $p53^+$ активується при пошкодженнях генетичного апарату клітин, а також при ішемічних стимулах, особливо в центральній нервовій системі. Функція білка $p53$ полягає у видаленні з пулу реплікованих клітин, які пошкоджені або є потенційно небезпечними для організму. При відсутності пошкоджень генетичного апарату білок $p53$ знаходиться в неактивному стані, а при появі – ДНК активується [15]. Тому виявлені коливання його вмісту характеризують ступінь чутливості клітин до ішемії.

У пізньому постішемічному періоді (12-та доба) у КЛЧ й КСЧ півкуль головного мозку спостерігалось вірогідне зростання щільності $p53^+$ -нейроцитів у 2 та 1,8 раза відповідно стосовно контролю і у 2,4 та 1,4 раза відповідно щодо раннього постішемічного періоду. Однак у КЛЧ цей показник зростав на тлі зниження концентрації в клітинах білка $p53^+$ на 11 %, що може свідчити про ініціацію захисних механізмів, здатних протидіяти апоптозу. В КСЧ вірогідних змін концентрації білка $p53^+$ не виявлено. Водночас, незважаючи на відсутність змін щільності $p53^+$ нейроцитів, у КТЧ концентрація білка $p53^+$ в цих клітинах зменшувалася вдвічі ($P < 0,001$). Таким чином, на тлі незмінної кількості апоптотичних клітин, наймовірніше, знижувалася експресія білка $p53^+$. Динаміка реагування нейроцитів різних часток неокортекса на ішемічно-реперфузійні пошкодження мала свої особливості, хоча порівняно з раннім терміном спостереження у КЛЧ, КСЧ, КТЧ вміст цього білка вірогідно знизився на 10, 8 % та у 2,4 раза відповідно. Однак у КЛЧ і КСЧ це відбулося на тлі незмінного показника в ранньому терміні спостереження, а в КТЧ – після його попереднього зростання.

На 12-ту добу спостереження щільність $p53^+$ -гліоцитів стосовно показників контрольної групи не змінилася в КЛЧ і знизилася – в КТЧ і КСЧ в 4,7 раза та на 28 % відповідно. У гліюцитах усіх досліджених часток кори виявлено також вірогідне зниження концентрації білка $p53^+$: на 13, 16, 3 % та 12, 18, 7 % у КЛЧ, КТЧ і КСЧ відповідно щодо контрольних значень і таких у ранній термін спостереження, що в сукупності з порівнянням зі змінами щільності клітин характеризувало послаблення процесів апоптозу.

Аналіз відсоткового співвідношення апоптотично змінених нейро- та гліоцитів засвідчив зростання в цей період частки нервових клітин як щодо контролю, так і раннього терміну спостереження (на 64, 228 і 106 % та 111, 154, 64 % для КЛЧ, КТЧ і КСЧ відповідно) й зменшення частки гліальних (в 1,3, 4,1,

Експресія білка p53⁺ нервових та гліальних клітин у корі різних часток великих півкуль щурів зі стрептозотиніндукованим цукровим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку на 1 мм² (M±m); (n=11)

Схема дослідження	Нервові клітини		Гліальні клітини	
	Щільність p53 ⁺ -нейроцитів (мм ²)	Концентрація білка p53 ⁺	Щільність p53 ⁺ - гліоцитів (мм ²)	Концентрація білка p53 ⁺
Кора лобової частки				
Контроль	21,89±2,13 (25,88±2,51)	0,408±0,006	62,48±5,06 (74,12±2,51)	0,381±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	17,64±1,87 (20,05±2,03)	0,403±0,006	64,42±5,60 (79,95±2,03)	0,375±0,002
Ішемія-реперфузія (12 діб)	42,11±4,69* [^] (42,45±3,45)* [^]	0,365±0,005* [^]	58,01±5,65 (57,54±3,45)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	19,77±2,27 (28,08±3,47)	0,449±0,006*	53,87±5,65 (71,91±3,47)	0,395±0,003*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	19,54±2,09 (28,32±2,95)	0,456±0,005	56,19±6,19 (71,68±2,95)	0,400±0,003
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	21,28±3,37 (63,30±6,43)#&	0,399±0,011#&	56,26±3,71 (36,70±3,43)#&	0,389±0,003&
Кора тім'яної частки				
Контроль	21,00±1,20 (24,88±1,80)	0,452±0,006	78,64±4,92 (75,12±1,81)	0,395±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	25,69±2,67 (32,16±2,10)*	0,539±0,007*	72,64±7,26 (67,83±2,10)*	0,403±0,003
Ішемія-реперфузія (12 діб)	19,69±1,93 (81,75±3,16)* [^]	0,228±0,014* [^]	16,72±3,16* [^] (18,25±3,16)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	45,9±5,38* (39,86±2,20)*	0,464±0,006	72,52±7,42 (60,14±2,20)*	0,383±0,002*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	29,19±1,41# (32,38±2,02)#	0,442±0,006#	82,06±5,86 (67,62±2,02)#	0,359±0,002#
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	17,18±1,13#& (60,23±3,91)#&	0,365±0,006#&	54,01±6,13& (39,76±3,91)#&	0,339±0,002#&
Кора скроневої частки				
Контроль	20,39±3,02 (20,15±2,58)	0,383±0,012	72,23±7,70 (79,85±2,58)	0,342±0,002
Ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	27,23±1,66* (25,35±1,68)	0,394±0,004	89,90±4,86 (74,65±1,68)	0,356±0,002*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	36,73±4,10* [^] (41,51±3,27)* [^]	0,364±0,005 [^]	51,74±4,82* [^] (58,49±3,27)* [^]	0,332±0,003* [^]
Діабет	26,66±1,47 (38,04±2,67)*	0,441±0,009*	66,15±4,86 (61,96±2,67)*	0,355±0,003*
Діабет та ішемія-реперфузія (20 хв/1 год)	28,94±1,53 (37,74±2,83)	0,448±0,009	75,29±6,08 (62,25±2,83)	0,354±0,002
Діабет та ішемія-реперфузія (12 діб)	24,04±1,82& (20,63±1,74)#&	0,371±0,005#&	106,58±5,88#& (79,36±1,74)#&	0,348±0,001#&

Примітка: вірогідність різниці порівняно з: * - контролем; [^] - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у контрольних тварин; # - діабетом; & – ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год) у тварин із діабетом; у дужках – відсоткове співвідношення.

1,4 раза і в 1,4, 3,7, 1,3 раза відповідно).

ЦД впродовж 3 міс призвів до зростання щільності p53⁺ нервових клітин лише в КТЧ у 2,2 раза ($P<0,001$) щодо контролю. Щільність гліальних клітин цього типу вірогідних змін не зазнала в жодній із досліджених часток кори. Однак слід зауважити, що при цьому в КЛЧ і КСЧ вірогідно зросла концентрація білка p53⁺ у нейро- та гліоцитах на 10 і 4 % та 15 і 4 % відповідно, що говорить на користь деякого посилення інтенсивності апоптозу. Крім того, в КТЧ виявлено зниження на 3 % в гліоцитах ($P<0,01$).

ЦД модифікував ранню реакцію досліджених параметрів на ішемію-реперфузію (див. таблицю). Із всіх вивчених відділів кори у тварин із порушенням вуглеводним обміном на таке втручання відреагувала лише КТЧ. Зокрема, за наявності цієї патології виявлено вірогідне зниження щільності p53⁺-нейроцитів на 36 % відносно досліджуваного параметра в щурів із діабетом, зменшення концентрації білка p53⁺ в нервових і гліальних клітинах відповідно на 5 і 6 %. Практично таким самим, як і в контролі, був перерозподіл різних видів p53⁺-клітин: зниження на 19 % частки нейронів та зростання на 12 % - гліоцитів.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із ЦД також виявлено особливості реагування досліджених показників у всіх вивчених ділянках кори. Так, у КЛЧ не встановлено вірогідних змін щільності p53⁺-нейроцитів і гліоцитів. Однак знижувалася концентрації білка p53⁺ у нервових і гліальних клітинах на 13 ($P<0,001$) та 3 % ($P<0,01$) відповідно стосовно значень попередньої групи тварин. Слід відмітити зростання частки нервових клітин щодо значень у разі ЦД, так і раннього терміну спостереження у 2,3 та 2,2 раза відповідно і зменшення частки гліальних клітин у 2 та 1,95 раза відповідно.

У КТЧ півкуль головного мозку щурів із порушенням вуглеводного обміну на 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду встановлені як якісні, так і кількісні особливості

активності апоптотичних процесів порівняно з контрольними тваринами. Зокрема виявлено: зниження щільності p53⁺-нервових клітин на 63 % стосовно показника за ЦД і на 41 % – щодо раннього терміну та зменшення досліджуваного параметру гліальних клітин на 34 % відносно попереднього терміну. Водночас лише кількісно відрізнялися зміни концентрації білка p53⁺ в нейроцитах та гліоцитах: зниження у щурів із порушенням вуглеводного обміну становило 22 і 12 % щодо значень у тварин із ЦД на 18 і 6 % – стосовно попереднього терміну спостереження. Менш суттєвими були також і зміни відсоткового співвідношення різних класів p53⁺-клітин: частка нейроцитів зросла на 51 та 86 %, а гліоцитів зменшилася в 1,5 та 1,8 раза стосовно відповідних показників у щурів із ЦД та раннього терміну спостереження. Модифікований вплив ЦД на перебіг апоптотичних процесів ішемічно-реперфузійного пошкодження констатовано і в КСЧ. На відміну від зростання у цей період щільності і частки p53⁺-нейроцитів у тварин без ЦД, за наявності порушення вуглеводного обміну щільність таких клітин не змінилася, а частка – знизилася вдвічі стосовно показників за ЦД і на 44 % – щодо раннього періоду спостереження. Протилежно спрямованими виявилися і зміни щільності та частки p53⁺-гліоцитів у щурів без ЦД за рахунок їх зростання на 61 і 28 % стосовно відповідних показників за ЦД і на 42 та 27 % – щодо попереднього терміну. Незважаючи на відсутність на 12-ту добу змін концентрації білка p53⁺ в нейроцитах тварин контрольної групи за умов ЦД у цей період вона зменшувалася на 16 %, і лише її зміни в гліоцитах нагадували такі у щурів без ЦД.

Результати проведеного дослідження свідчать про модифікацію ЦД регіонарної чутливості відділів неокортекса до ішемічно-реперфузійного пошкодження (за показниками вираженості апоптозу нервових та гліальних клітин), що може бути наслідком формування діабетичної енцефалопатії.

ВИСНОВКИ

1. Після 20-хвилинної каротидної ішемії з одногодинною реперфузією за дослідженими показниками у тварин без ЦД рівень апоптотичних процесів в нейро- та гліоцитах КЛЧ залишався незмінним; у КТЧ активувався апоптоз нейронів, у КСЧ – нейро- і гліоцитів. На 12-ту добу спостереження в КСЧ вона зростала у нейронах і знижувалася – в гліоцитах, у КЛЧ і КТЧ зменшувалася в гліоцитах, а в нейронах зниження концентрації білка p53⁺ відбувалося на тлі зростання щільності p53⁺-клітин.

2. ЦД посилював апоптоз нейронів і гліальних клітин КЛЧ та КСЧ, нейронів КТЧ та знижував - гліоцитів останньої.

3. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді у тварин із порушенням вуглеводного обміну активність апоптотичних процесів не змінювалася в КЛЧ і КСЧ та знижувалася – в КТЧ за рахунок гліальних клітин. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із ЦД вона у цілому знижувалася як у нейронах, так і в гліальних клітинах усіх часток кори.

4. Динаміка реагування досліджених часток кори великих півкуль на ішемічно-реперфузійне пошкодження за інтенсивністю апоптозу нейронів та гліальних клітин характеризувалася регіонарними особливостями як у щурів без ЦД, так і з його наявністю, однак останній суттєво модифікував реакцію вивчених відділів кори на ішемію-реперфузію.

Т.Н. Бойчук, Т.І. Кметь

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА И НЕПОЛНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МОЗГА НА АПОПТОЗ РАЗНЫХ ДОЛЕЙ НОВОЙ КОРЫ КРЫС

Исследовали влияние сахарного диабета на динамику интенсивности апоптоза нейронов и глиоцитов коры лобной, теменной и височной долей полушарий головного мозга крыс в условиях его ишемически-реперфузионного повреждения. Установлено, что 20-минутная каротидная ишемия с однократной реперфузией у животных без сахарного

диабета не вызывала апоптотических процессов в нейро- и глиоцитах коры лобной доли; в коре теменной доли активировался апоптоз нейронов, а в коре височной доли – нейро- и глиоцитов. Сахарный диабет на протяжении 3 мес усиливал апоптоз нейронов и глиальных клеток коры лобной и височной долей, нейронов коры теменной доли и снижал - глиоцитов. В раннем ишемически-реперфузионном периоде у животных с сахарным диабетом активность апоптотических процессов не изменялась в коре лобной и височной долей и снижалась в коре теменной доли за счет глиальных клеток. На 12-е сутки у крыс без сахарного диабета в коре височной доли возрастала активность апоптотических процессов в нейронах и снижалась – в глиоцитах, в коре лобной и теменной долей уменьшалась в глиоцитах. У нейронах снижение концентрации белка p53⁺ происходило на фоне роста плотности p53⁺ клеток. У крыс с диабетом активность апоптотических процессов в целом снижалась как в нейронах, так и в глиальных клетках всех долей коры. Полученные результаты свидетельствуют о наличии регионарных различий динамики реагирования исследованных долей коры больших полушарий на ишемически-реперфузионные повреждения по интенсивности апоптоза нейронов и глиальных клеток, а также о модифицирующем влиянии сахарного диабета на реакцию исследованных показателей.

Ключевые слова: сахарный диабет; ишемия-реперфузия головного мозга; кора больших полушарий; апоптоз.

T.M. Boychuk, T.I. Kmet

PECULIARITIES OF THE INFLUENCE OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIS AND INCOMPLETE ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE BRAIN DURING APOPTOSIS OF VARIOUS NEOCORTICAL LOBES OF RATS

The effect of diabetes mellitus on the dynamics of neurocyte and gliocyte apoptosis intensity in the cortex of the frontal, parietal and temporal lobes of the cerebral hemispheres under conditions of ischemic-reperfusion lesion has been studied in experiments on rats. The level of apoptotic processes in the neuro- and gliocytes of the frontal cortex has been found to be unchanged after 20 minutes of carotid ischemia followed by one hour reperfusion according to the indices examined in animals with out diabetes mellitus. Apoptosis of neurocytes is activated in the cortex of the parietal lobe, and that of the neuro- and gliocytes – in the cortex of the temporal lobe. Three-month diabetes mellitus intensifies apoptosis of neurons and glial cells in the cortex of the frontal and temporal lobes, neurons in the cortex of the parietal lobe and decreases apoptosis of gliocytes in it. In early ischemic-reperfusion period the activity of apoptotic processes in the cortex of the frontal and temporal lobes does not change in animals with diabetes mellitus, but it decreases in the cortex of the parietal lobe at the expense of glial cells. On the 12th day of observation the

activity of apoptotic processes in neurocytes of the cortex of the temporal lobe increases in rats without diabetes mellitus, and it decreases in the glial cells. We detected a reduced content of the protein p53 in neurons and increased density of p53⁺-cells. In this period of observation in rats with diabetes mellitus the activity of apoptotic processes decreases in general both in neurons and glial cells of all the lobes. The results obtained point for the availability of regional differences in the dynamics of reaction of the cerebral hemisphere lobes in response to ischemic-reperfusion injury characterized by the intensity of apoptosis of neurons and glial cells. The results also point for modifying effect of diabetes mellitus on the indices studied. Key words: diabetes mellitus; ischemia-reperfusion of the brain; cerebral cortex; apoptosis.

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi

REFERENCES

1. Ryden L, Grant P, Anker D, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J*. 2013;34:3035-87.
2. Toshio Hayashi, Seinosuke Kawashima, Hideki Nomura, Hideki Itoh, Hiroshi Watanabe, Takashi Ohnui, et al. Age, gender, insulin and blood glucose control status alter the risk of ischemic heart disease and stroke among elderly diabetic patients. *Cardiovasc Diab*. 2011;10(1):86-9.
3. Sui X, Lavie CJ, Hooker SP, Lee DC, Colabianchi N, Lee CD, Blair S.N. A prospective study of fasting plasma glucose and risk of stroke in asymptomatic men. *Mayo Clin Proc*. 2011 November;86(11):1042-9.
4. Arboix A, Rivas A, Garcia-Eroles L, de Marcos L, Massons J, Oliveres M. Cerebral infarction in diabetes: Clinical pattern, stroke subtypes, and predictors of in-hospital mortality. *BMC Neurol*. 2005;5(1):5-9.
5. Liu HM, Li JX, Chen LB. Ischemic preconditioning relieves ischemia/reperfusion injury of hippocampus neurons in rat by inhibiting p53 and bax expressions. *Chin Med Sci J*. 2007 Jun;22(2):123-7.
6. Jazayeri L, Callaghan MJ, Grogan RH, Hamou CD, Thanik V, Ingraham CR, et al. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Apr;121(4):1135-43.
7. Waring P, Kos F, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Med Res Rev* 2008;11:219-36.
8. Manskikh V. Morphological methods of verification and quantification of apoptosis. *Bull of Siber Med*. 2004;1:63-70.
9. Tkachuk SS, Lenkov AM. Expression of Hif-1 α , p53 and Bcl-2 proteins in the brain under the conditions of bilateral carotid ischemia-reperfusion in experimental diabetes mellitus in male rats. *Clin and Exp Pathol*. 2010;2(32):111-13. [Ukrainian].
10. Bassirat M, Khalil Z. Short- and long-term modulation of microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats by glycosylated products. *J Diab Compl*. 2008;22(6):371-6.
11. Skibo GG. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija*. 2004;1(1):22-30. [Russian].
12. Konig JF, Klippel PA. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963;162 p.
13. Kolesnik YM, Abramov AV. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microscopy and Analysis*. 2002;5:12-16.
14. Hammond EM, Giaccia AJ. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331:718-25.
15. Zhao Jiang, Chun-Hua Chen, Ying-Yu Chen, Jing-Yan Han, John Riley, Chang-Man Zhou. Autophagic effect of programmed cell death 5 (PDCD5) after focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Neurosci Lett*. 2014 Apr 12;566:298-303.

Матеріал надійшов до редакції 09.11.2015

Роль TRPV4-каналів у регуляції фенілефрин-індукованого скорочення легеневих артерій щурів

Д.О. Дринь^{1,3}, М.І. Мельник², І.В. Кізуб², Х. Хью⁴, А.І. Соловійов², О.В. Жолос^{1,3}

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка;

²ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ;

³Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

⁴Медичний інститут університету Вашингтона, Сент Луїс, США; e-mail: darinka.dr@gmail.com

Досліджували роль ванілоїдних катіонних каналів транз'єнтного рецепторного потенціалу (TRPV4-каналів) у регуляції скоротливої активності легеневих артерій щурів під час активації α -адреноцеторів судинних гладеньком'язових клітин (ГМК), а також вивчали їх як потенційну мішень для фармакологічної інтервенції при легеневої гіпертонії. При додаванні селективного агоніста TRPV4-каналів GSK1016790A на фоні дії активатора α -адреноцеторів фенілефрину (ФЕ) у гладеньких м'язах виникала двофазна відповідь, яка характеризувалася початковим розслабленням ($63,5 \pm 7,1$ %) та наступним скороченням ($142 \pm 17,9$ %). У деендомелізованих судинах ефект GSK1016790A зберігався, що свідчило про визначальну роль TRPV4-каналів, котрі експресовані саме у ГМК судин. Їх селективний блокатор HC-067047 повністю пригнічував ефект агоніста, що підтверджує залучення TRPV4-каналів до регуляції скорочення гладеньких м'язів судин. За відсутності кальцію у зовнішньому розчині фаза скорочення зникала (зменшення від 43,9 до 0,3 %). Двофазна дилататорно-констрикторна відповідь може бути пояснена вивільненням іонів кальцію з саркоплазматичного ретикулула клітин внаслідок дії ФЕ та наступного кальційіндукованого вивільнення кальцію, що, в свою чергу, викликане TRPV4-каналами. Це активує кальційчутливі калієві канали великої провідності, призводить до гіперполяризації мембрани та розслаблення. Подальший вхід кальцію через TRPV4-канали викликає скорочення м'яза. Таким чином, TRPV4-канали відіграють важливу роль у регуляції судинного тону легеневих артерій, але активаційні механізми та з'ясування деталей сигнальних шляхів потребують подальших досліджень.

Ключові слова: гладенькі м'язи; легеневої артерії; канали транз'єнтного рецепторного потенціалу; агоніст і антагоніст TRPV4-каналів; вазоконстрикція; вазодилатація.

ВСТУП

Концентрація кальцію в клітині чітко регулюється різноманітними структурами мембрани: іонними каналами, помпами та обмінниками. Важливу роль у цьому процесі відіграють потенціалзалежні кальцієві канали та рецепторкеровані неселективні катіонні канали, найбільший клас яких представлено родиною TRP (канали транз'єнтного рецепторного потенціалу) [1, 2]. Це суперсімейство полімодальних клітинних сенсорів, що беруть участь у різних фізіологічних процесах, включаючи трансдукцію сигналів, регуляцію Ca^{2+} та Mg^{2+} -гомеостазу та такі кальційза-

лежні процеси, як ріст і загибель клітин, проліферацію, міграцію, клітинний цикл тощо. Варто зазначити, що вони експресовані майже у всіх типах клітин ссавців.

TRP-канали активуються цілим спектром стимулів, таких, як температура, зміна потенціалу та механічний тиск, розтягнення мембрани, зміна pH та іонного складу, а також різними внутрішньоклітинними сигнальними шляхами [3–8]. На основі структурної подібності будови їх було класифіковано на 6 підродин: канонічні (TRPC; TRPC1–7), ванілоїдні (TRPV; TRPV1–6), анкіринові (TRPA; TRPA1), меластатинові (TRPM; TRPM1–8),

© Д.О. Дринь, М.І. Мельник, І.В. Кізуб, Х. Хью, А.І. Соловійов, О.В. Жолос

муколіпінові (TRPML; TRPML1–3) та поліцистинові (TRPP; TRPP2, TRPP3, TRPP5) [9, 10]. Структура каналу включає 6 трансмембарних повторів (S1–S6), при цьому між п'ятим (S5) та шостим (S6) доменами утворюється пора каналу, а також С- та N-термінали, які знаходяться всередині клітини. Більше того TRP-канали мають додаткові структурні елементи, представлені анкіриновими повторами на внутрішньоклітинному N-терміналі, законсервованій TRP-домен з 25 амінокислотних залишків, до складу якого входить також TRP-box (EWKFAR) та насичену проліном ділянку від С-терміналю до трансмембранного сегмента S6 [9–10].

TRPV-канали відіграють важливу роль як у збудливих, так і незбудливих типах клітин. Зокрема, один з представників цієї підродини, TRPV4-канал, активується при температурі вище ніж 25⁰ С, механічними стимулами, ендогенними речовинами (арахідонова кислота), а також синтетичними сполуками (GSK1016790A). Цей катіонний канал відіграє важливу роль у забезпеченні регуляції артеріального тиску, осмолярності клітин, відчутті тепла, механочутливості тощо. За біофізичними властивостями він має приблизно однакову проникність для Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, але за фізіологічних умов, крім Na⁺, Ca²⁺ є основним іоном, що проникає через цей канал [11, 12].

TRPV4-канали у значній кількості експресуються в ендотелії та гладеньких м'язах легеневи́х артерій, нейронах спинномозкових гангліїв, клітинах серця, легень, кісток, печінки тощо [13, 14]. Важливо зазначити, що вони можуть сприяти розвитку механічної гіпералгезії при запаленнях та ушкодженнях тканин. Дослідження останніх років показали, що TRPV4-канали підсилюють чутливість судин до хронічної гіпоксичної легеневої гіпертензії, а також надмірно експресуються за цих умов [15–17]. Однак нині недостатньо відомо про властивості цього каналу в легеневи́х артеріях.

Метою нашої роботи було з'ясувати особливості регуляції скоротливої діяльності

гладеньких м'язів легеневи́х артерій щурів під час активації TRPV4-каналів.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували щурів-самців лінії Вістар масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Всю роботу проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях, а протоколи експериментів були ухвалені Комітетом з етики.

Виділення ізольованих легеневи́х артерій щурів. Дослідження проводили на ізольованих кільцевих препаратах легеневи́х артерій (ЛА). Після попередньої анестезії (кетамін – 45 мг/кг, ксилазин – 10 мг/кг) тварин декапітували з наступним знекровленням. Після цього розтинали грудну клітку, вилучали разом легені, серце й аорту та відмивали тканини від крові. Під бінокулярним мікроскопом виділяли ЛА та нарізали їх на кільця із внутрішнім діаметром 0,9–1,5 мм та шириною 1 мм. Для препарування кілець використовували модифікований розчин Кребса, що містив (ммоль/л): NaCl - 133, NaHCO₃ - 16,3, NaH₂PO₄ - 1,38, KCl - 4,7, MgCl₂ - 1,05, глюкозу - 11,5, CaCl₂ - 2,73, HEPES - 10; pH 7,4 (доводили за допомогою NaOH). Безкальцієвий розчин був такого складу (ммоль/л): NaCl - 133, NaHCO₃ - 16,3, NaH₂PO₄ - 1,38, KCl - 4,7, MgCl₂ - 1,05, глюкоза - 11,5, HEPES - 10; pH 7,4.

Реєстрація скоротливої активності. Скоротливі реакції гладеньких м'язів досліджували в ізометричному режимі з використанням методу тензометричної реєстрації за допомогою ємнісних датчиків напруження та комп'ютерної програми LabScribe 2 («World Precision Instrument Inc.», США). Відпрепаровані судинні кільця розміщували у проточній камері об'ємом 0,5 мл, в якій підтримували 37⁰ С. Препарати закріплювали на двох сталевих гачках, один з яких був

стаціонарно вмонтований в стінку камери, а інший приєднаний до штока тензодатчика. Для отримання оптимальної сили скорочення судинні сегменти підлягали попередньому пасивному розтягненню з силою приблизно 0,5 г. Препарати ЛА перфузували розчином Кребса зі сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою чотириканального перистальтичного насоса IPS ISM 930 "Ismatec" (Німеччина).

Для оцінки функційного стану судин та отримання оптимальних скоротливих відповідей до початку експерименту їх періодично стимулювали гіперкалієвим розчином, в якому концентрація K^+ становила 60 ммоль/л. Дію селективного агоніста TRPV4-каналів GSK1016790A на скоротливу активність гладеньких м'язів ЛА вивчали аплікацією цієї речовини (0,3 мкмоль/л). Перед додаванням агоніста препарати попередньо скорочували активатором α -адреноцепторів фенілефрином (ФЕ, 10 мкмоль/л). Вазодилатацію та вазоконстрикцію виражали у відсотках від максимального скорочення, викликаного ФЕ (10 мкмоль/л) або KCl, залежно від задачі. Селективний блокатор TRPV4-каналів HC067047 подавали в концентрації 1 мкмоль/л і агоніст ріанодинових рецепторів (RyR) кофеїн – 10 ммоль/л. Аплікацію усіх застосованих хімічних речовин здійснювали за допомогою перфузійної системи.

Деендотелізацію судин проводили хімічним методом: препарати витримували 15 хв у розчині сапоніну (0,1 мг/мл). Контролем деендотелізації був добре відомий тест на дію ацетилхоліну, який в препаратах з інтактним ендотелієм викликає чітко виражену вазодилатацію, а в деендотелізованих призводить до зниження амплітуди ацетилхоліндукованого розслаблення або викликає вазоконстрикцію. В наших дослідах аплікація ацетилхоліну (10^{-5} моль/л) до оброблених сапоніном препаратів викликала вазоконстрикцію, що підтверджує повну деендотелізацію судин.

Статистична обробка результатів. Усі експериментальні результати наведено

у вигляді середньої арифметичної (M) та її стандартної похибки (m) для певної вибірки (n). Аналіз результатів та побудову графіків проводили з використанням програми Origin 8.5 («Microcal Software Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження демонструють двофазну скоротливу відповідь ЛА при дії агоніста TRPV4-каналів GSK1016790A, яка складалась із першої фази розслаблення ($63,5\% \pm 7,1$) та наступної фази скорочення ($142\% \pm 17,9$). Препарати були попередньо скорочені ФЕ (рис. 1).

Згідно з літературними даними [18, 19] TRPV4-канали експресовані як у гладеньком'язових клітинах (ГМК), так і в ендотелії легеневи артерій, тому ми припустили, що ефект двофазної відповіді міг бути пов'язаним з активацією ендотеліальних каналів. Враховуючи це, важливо було перевірити ефекти GSK1016790A на деендотелізованих препаратах. В цих експериментах було встановлено, що агоніст TRPV4-каналів як на деендотелізованих ЛА, так і з інтактним ендотелієм, викликав двофазну відповідь (рис. 2). При цьому вірогідних відмінностей між обома типами препаратів у фазі релаксації не відмічалось (різниця на 11,6%), але у фазі скорочення без ендотелію ефект був більш вираженим (на 29,2 %, рис. 2, а, б).

Для перевірки нормального функціонального стану препарату гладеньких м'язів після деендотелізації розчином сапоніну проводився стандартний тест на вплив ацетилхоліну. Спостерігалось незначне скорочення на фоні дії гіперкалієвого розчину, що свідчило про неушкоджений шар гладеньких м'язів, очищений від ендотелію (див. рис. 2, в).

Отримані результати говорять про те, що двофазна відповідь на дію GSK1016790A за наявності ФЕ зумовлена активацією TRPV4-каналів, які експресовані головним чином у судинних ГМК. Такі результати є пер-

спективними, оскільки залежно від судинного русла, природи фізіологічного стимула скорочення гладеньких м'язів та від місця експресії TRPV4-каналів їх активація призводить до різних відповідей. Так, у системних судинах це спричинює вазорелаксацію (церебральні артерії, мезентеріальні артерії), яка зумовлена переважно активацією ендотеліальних TRPV4-каналів [19], а у внутрішньолегеневих артеріях, навпаки, вазоконстрикцію [20, 21]. Нами вперше була показана двофазна скоротлива відповідь внаслідок активації цих каналів за умов стимуляції α -адреноцепторів ФЕ. При цьому важливо відмітити, що роль

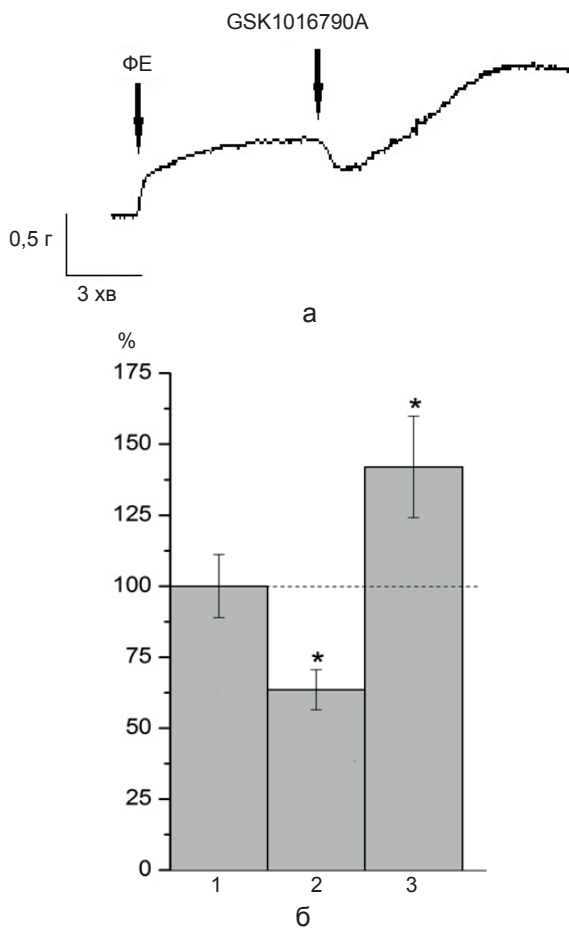


Рис. 1. Скоротлива відповідь гладеньких м'язів легеневих артерій під час активації TRPV4-каналів агоністом GSK1016790A на фоні їх преконострикції ФЕ: а - оригінальна міограма типового експерименту; б - тонус гладеньких м'язів (фаза розслаблення - 2 та скорочення - 3) виражений у відсотках від дії ФЕ (1); * $P < 0,05$ відносно дії ФЕ

TRPV4-каналів у регуляції базального тону легеневих артерій суттєво відрізняється від їх функції у процесі скорочення, викликаного агоністом α -адреноцепторів. Так, нещодавно було показано, що для базального тону легеневих артерій щурів домінуючим ефектом GSK1016790A було ендотеліальне роз-

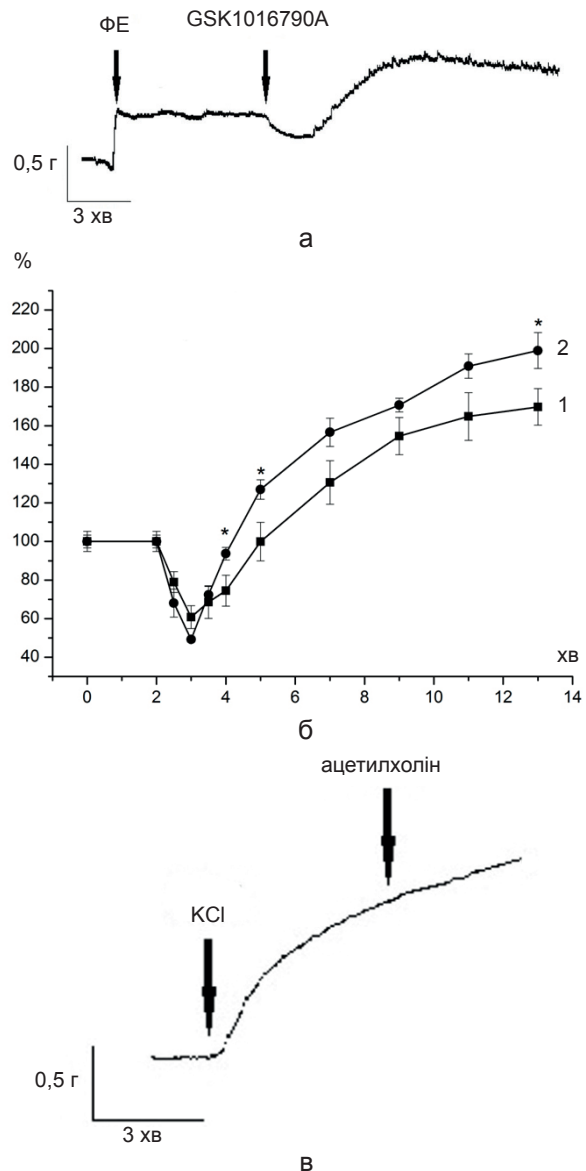


Рис. 2. Порівняльний аналіз ефектів GSK1016790A на передскорочені фенілефрином легеневі артерії з ендотелієм (1) та без (2); а - оригінальна міограма типового експерименту без ендотелію; б - ізометричні скорочення виражені у відсотках від дії ФЕ; в - оригінальна міограма типової реакції деендотелізованої сапоніном ЛА у відповідь на дію ацетилхоліну; * $P < 0,05$ відносно препарату з ендотелієм

слаблення, хоча автори і згадують незначне підвищення базального тону при його дії на деендотелізовані судини [22]. Як продемонстровано в наших дослідженнях, ця реакція стає дуже вираженою (див. рис. 1, 2) при активації α -адреноцепторів.

Для підтвердження участі саме TRPV4-каналів у розвитку двофазної скоротливої відповіді застосовували селективний блокатор HC067047. Було показано, що він повністю інгібував ефект GSK1016790A (рис. 3).

При відкриванні TRPV4-каналів кальцій надходить ззовні і одночасно внаслідок активації RyR запускається процес кальційіндукованого вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулула (CP). Залежно від

його локалізації, вихід кальцію через RyR викликає або скорочення, або розслаблення гладеньких м'язів [20]. Якщо він розташований примембранно, тоді вивільнення Ca^{2+} призводить до виникнення кальцієвих спарків, які переважно активують кальційзалежні калієві канали великої провідності (BK_{Ca}), що викликає гіперполяризацію мембрани та розслаблення ГМК [19]. Коли CP локалізований у центральній ділянці, тоді активація RyR викликає підвищення кальцію в усій цитоплазмі та, зокрема, біля міофіламентів клітини і це, в свою чергу, призводить до скорочення [20].

Dahan та співавтори [20] показали, що в легеневих артеріях CP розташований у центральній ділянці, де експресуються RyR2, тоді як у системних судинах він переважно знаходиться в примембранній зоні та містить RyR1. Такою специфікою локалізації може бути зумовлена відмінність реакції ГМК на активацію TRPV4-каналів залежно від їх місця розташування. Так, агоніст TRPV4-каналів епоксіейкозатрієнова кислота викликала розслаблення гладеньких м'язів мозкових та мезентеріальних артерій [19], тоді як у легеневих артеріях інший агоніст 4α -PDD, навпаки, спричинював скорочення [20].

У нашому випадку активація TRPV4-каналів ЛА агоністом GSK1016790A призводила спочатку до транзійтного розслаблення, а потім до значного повільного скорочення (див. рис. 1). Щоб з'ясувати, який механізм ініціює двофазну скоротливу відповідь, проводили порівняльні експерименти в звичайному та в безкальцієвому розчині Кребса (рис. 4).

Видно, що розслаблення зберігалось за обох умов (зменшення на 23,4 % та на 19 % порівняно з дією ФЕ, відповідно), тоді як фаза скорочення в безкальцієвому розчині Кребса зникла (збільшення на 43,9 % та на 0,3 %, відповідно; див. рис. 4, а, б). Такі результати говорять про те, що вазоконстрикція ЛА внаслідок активації TRPV4-каналів, як і очікувалось, ініціюється входом кальцію

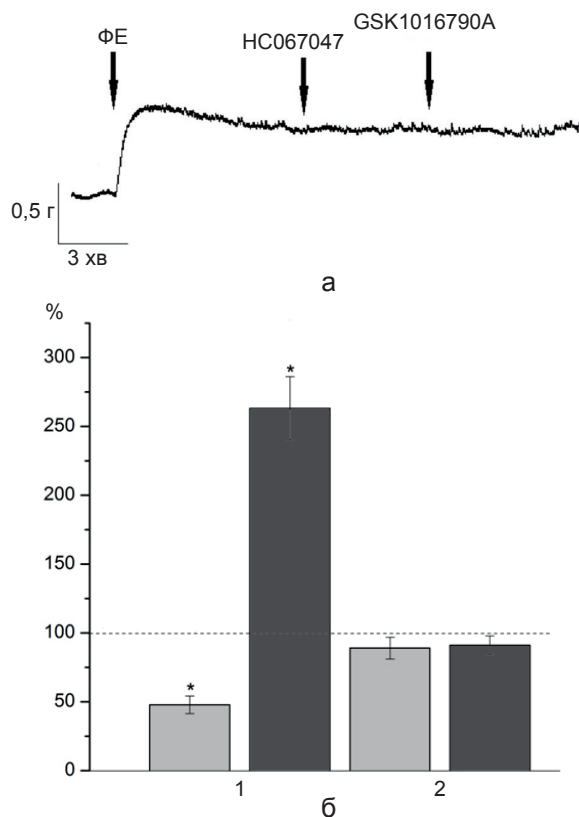


Рис. 3. Інгібування двофазної відповіді на агоніст TRPV4-каналів (1) блокатором HC067047 (2) передскорочених фенілефрином легеневих артерій: а - оригінальна міограма типового експерименту з блокатором; б - ізометричні скорочення (фаза розслаблення - світло-сірий, фаза скорочення - темно-сірий) виражені у відсотках від дії ФЕ; * $P < 0,05$ відносно дії ФЕ

ззовні, тоді як природа фази розслаблення залишається невідомою.

Ми припускаємо, що розслаблення може бути пов'язане з преко́нстрикцією гладенького м'яза ФЕ. Одним з механізмів скорочення при активації α -адреноцеторів є вивільнення кальцію з СР через інозитолтрисфосфатні рецептори. Тому, ймовірно, на момент відкриття TRPV4-каналів СР був значно спустошений і не міг запустити механізм кальційіндукованого вивільнення кальцію. Найвірогідніше кальцій, який входив через TRPV4-канали, активував BK_{Ca} і призводив до розслаблення. Раніше ми показали, що блокатор BK_{Ca} паксилін пригнічував викликану GSK1016790A вазодилатацію [23].

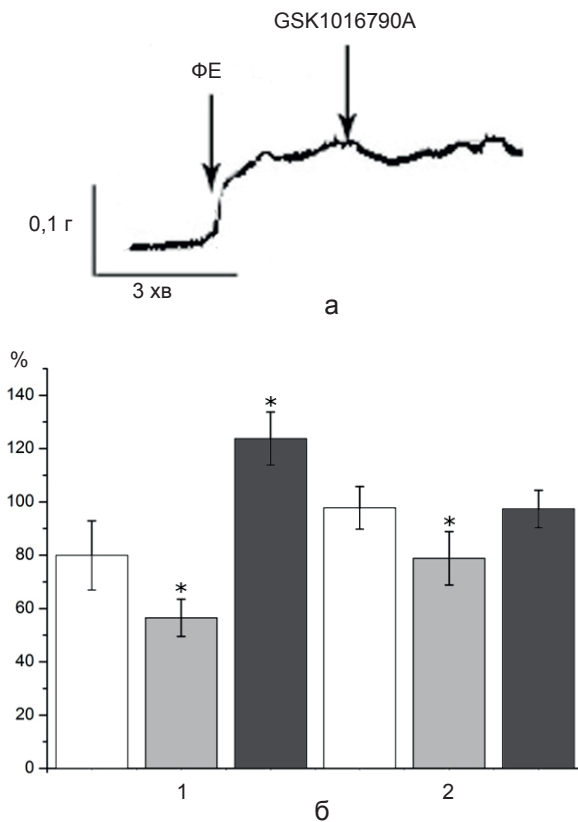


Рис. 4. Порівняльний аналіз скоротливої активності гладеньких м'язів легеневих артерій передскорочених фенілефрином у відповідь на дію GSK1016790A в нормальному (1) та безкальцієвому (2) розчині Кребса: а - оригінальна міограма типового експерименту; б - ізометричні скорочення на дію ФЕ (білий) та GSK1016790A (фаза розслаблення – світло-сірий, фаза скорочення – темно-сірий) виражені у відсотках від дії KCl; * $P < 0,05$ відносно дії ФЕ

Тоді як при десенситизації α -адреноцеторів СР заповнювався кальцієм, його вхід через TRPV4-канали міг ініціювати фазу скорочення за допомогою як прямого входу Ca^{2+} через ці канали, так і його викиду з депо клітини через RyR. Для оцінки відносного внеску цих механізмів ми порівняли амплітуду максимальних скорочень, що виникали у відповідь на дію ФЕ, GSK1016790A і кофеїну – одного з відомих агоністів RyR (рис. 5). Як і в попередніх досліджах, ефект агоніста TRPV4-каналів спостерігали на фоні преко́нстрикції м'яза ФЕ.

З представлених результатів (рис. 5) видно, що аплікація GSK1016790A на попередньо скорочені ФЕ легеневі артерії викликала більшу за амплітудою констрикцію ($123,8 \% \pm 15,2$), ніж KCl (100 %), ФЕ ($79,9 \% \pm 13$) або кофеїн ($69,2 \% \pm 7,3$), що свідчить про значну роль TRPV4-каналів у регуляції індукованого ФЕ скорочення ЛА.

Отже, ми показали, що в легеневих артеріях шурів функціональні TRPV4-канали експресовані переважно в ГМК, тоді як ендотеліальні відіграють відносно незначну роль у регуляції скорочення, принаймні на фоні активації α -адреноцеторів. Синтетичний

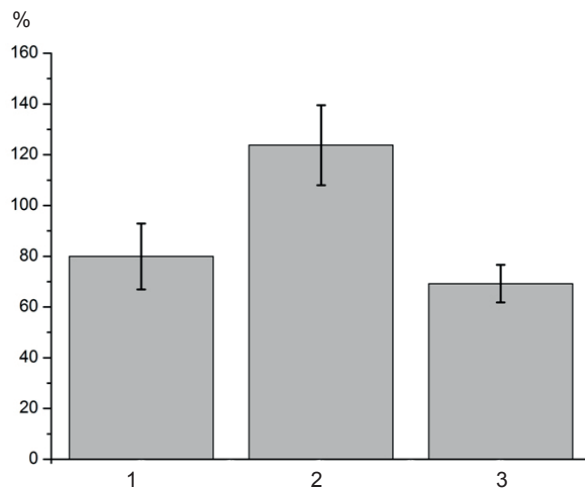


Рис. 5. Порівняльний аналіз амплітуди максимальних скорочень гладеньких м'язів легеневих артерій шура при дії фенілефрину (1), кофеїну (3) та GSK1016790A на фоні преко́нстрикції ФЕ (2), ізометричні скорочення виражені у відсотках від дії KCl

агоніст цих каналів GSK1016790A викликає вхід Ca^{2+} в ГМК і це, ймовірно, призводить до попередньої гіперполяризації мембрани через активацію BK_{Ca} -каналів та тимчасової вазодилатації, а потім наступної деполяризації, яка спричиняє значний вхід Ca^{2+} і довготривалу вазоконстрикцію легеневих судин. Участь TRPV4-каналів вагома у багатьох фізіологічних процесах, особливо у формуванні судинного тону, а також в процесах клітинної та тканинної осморегуляції. Тому очевидно, що дослідження ролі TRPV4-каналів у регуляції скорочення гладеньких м'язів ЛА є перспективним напрямком подальших всебічних досліджень, адже отримані результати передбачають можливість їх використання як мішені для фармакологічної корекції судинної патології різного генезу.

Д.О. Дринь, М.І. Мельник, І.В. Кізуб,
Х. Хью, А.І. Соловйов, А.В. Жолос

РОЛЬ TRPV4-КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕНИЛЭФРИН-ИНДУЦИРОВАННОГО СОКРАЩЕНИЯ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ КРЫС

Исследовали роль ванилоидных катионных каналов транзистного рецепторного потенциала (TRPV4-каналов) в регуляции сократительной активности легочных артерий крыс на фоне активации α -адреноцепторов гладкомышечных клеток фенилэфрином (ФЭ) с целью их изучения как возможных мишеней для фармакологической модуляции при различных сосудистых заболеваниях с помощью высокоселективного агониста этих каналов GSK1016790A. В ответ на действие последнего на фоне влияния ФЭ гладкие мышцы развивали двуфазный сократительный ответ, который характеризовался начальной фазой расслабления ($63,5\% \pm 7,1$) и последующей сокращения ($142\% \pm 17,9$). В деэндотелизированных сосудах эффект GSK1016790A сохранялся, что свидетельствовало об определяющей роли экспрессированных в гладких мышцах TRPV4-каналов. Селективный блокатор HC-067047 полностью ингибировал действие агониста GSK1016790A, что подтверждает специфику участия TRPV4-каналов в сокращениях гладких мышц сосудов. В отсутствии кальция во внешней среде фаза сокращения исчезала (уменьшение от $43,9\%$ до $0,3\%$). Двуфазный дилататорно-констрикторный ответ может быть объяснен опустошением саркоплазматического ретикула клеток вследствие действия ФЭ и дальнейшего кальцийиндуцированного высвобождения кальция, что, в свою очередь, вызвано TRPV4-каналами.

Это активирует кальцийчувствительные калиевые каналы большой проводимости, приводит к гиперполяризации мембраны и расслаблению. Последующий вход кальция через TRPV4-каналы вызывает сокращение мышцы. TRPV4-каналы играют важную функцию в регуляции сосудистого тонуса в гладкомышечных клетках легочных артерий, но еще до конца остаются невыясненными активационные механизмы и сигнальные пути этих ионных каналов.

Ключевые слова: гладкие мышцы; легочные артерии; каналы транзистного рецепторного потенциала; агонист и антагонист TRPV4-каналов; вазоконстрикция; вазодилатация.

Dariia Dryn^{1,3}, Mariia Melnyk², Ihor Kizub²,
Hongzhen Hu⁴, Anatoliy Soloviev²,
Alexander Zholos^{1,3}

THE ROLE OF TRPV4 CATION CHANNELS IN THE REGULATION OF PHENYLEPHRINE-INDUCED CONTRACTION OF RAT PULMONARY ARTERY

The aim of our study was to investigate the role of mechanosensitive TRPV4 channels in the regulation of rat pulmonary artery smooth muscle (PASM) contractile activity induced by the activation of α -adrenoceptors and the possibility of their use as novel pharmacological targets in pulmonary hypertension. TRPV4 selective agonist, GSK1016790A, in the presence of the agonist of α -adrenoceptors phenylephrine (PhE) evoked biphasic contractile reaction with initial relaxation ($63,5\% \pm 7,1$) followed by significant vasoconstriction ($142\% \pm 17,9$). GSK1016790A evoked similar effects in PASM rings with and without endothelium, indicating that its main site of action was TRPV4 expressed in smooth muscle cells. TRPV4 selective blocker, HC-067047, completely inhibited the effects of GSK1016790A confirming the specific role of TRPV4 in these vascular responses. Application of Ca^{2+} -free external solution reduced the relaxation phase and completely abolished the sustained contractile response to GSK1016790A (from $43,9\%$ to $0,3\%$). The biphasic reaction could be explained as an initial calcium store depletion by PhE and further calcium-induced calcium release activated by TRPV4 that causes BK_{Ca} activation, membrane hyperpolarisation and vasorelaxation, followed by Ca^{2+} entry via TRPV4 and contraction. We conclude that TRPV4 channels play an important role in the regulation of the adrenergic vascular tone of PASM cells, but TRPV4 activation mechanism(s) and signaling pathways remain unclear.

Key words: vascular smooth muscle; pulmonary artery; transient receptor potential channels; TRPV4 agonist and antagonist; vasodilatation; vasoconstriction.

¹ESC "Institute of Biology", Taras Shevchenko Kiev National University; ²Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy of Medical Sciences, Kiev; ³A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev; ⁴Washington University School of Medicine in St. Louis, USA; e-mail: darinka.dr@gmail.com

REFERENCES

1. So I, Kim KW. Nonselective cation channels activated by the stimulation of muscarinic receptors in mammalian gastric smooth muscle. *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39:231–47.
2. Beech DJ, Muraki K, Flemming R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol.* 2004; 559:685–706.
3. Zholos AV, Zholos AA, Bolton TB. G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol.* 2004; 123:581–98.
4. Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nature Biol Chem.* 2005; 1:85–92.
5. Clapham D E. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003; 426:517–24.
6. Gees M, Owsianik G, Nilius B, Voets T. TRP channels. *Comp Physiol.* 2012; 2(1):563–608.
7. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011; 12(3):218–29.
8. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 2005; 38:233–52.
9. Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2006; 156:61–90.
10. Clapham D E, Julius D, Montell C, and Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:427–50.
11. Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ES, Gordon EA, Evans L, Misajet BA, Demarini DJ, Nation JH, Casillas LN, Marquis RW, Votta BJ, Sheardown SA, Xu X, Brooks DP, Laping N, Westfall TD. GS-K1016790A, a novel and potent TRPV4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: part I. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326:432–42.
12. Vriens J, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Nilius B. Determinants of 4 α -phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem.* 2007; 282:12796–803.
13. Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, and Nilius B. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:396–401.
14. Liedtke W and Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:13698–703.
15. Nilius B, Voets T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep.* 2013; 14(2):152–63.
16. Zholos A.V., Curtis T.M. TRP channels in vascular disorders. *Curr Top Med Chem.* 2013; 13: 295-309.
17. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772:805–12.
18. Kohler R., Heyken W. T., Heinau P., Schubert R., Si H., Kacik M., Busch C., Grgic I., Maier T. and Hoyer J. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1495–502.
19. Earley S., Heppner T.J., Nelson M.T., Brayden J.E. TRPV4 Forms a Novel Ca²⁺-Signaling Complex With Ryanodine Receptors and BK_{Ca} Channels. *Circulation Research.* 2005; 9(23) 1270-9.
20. Dahan D., Ducret T., Quignard J.-F., Marthan R., Savineau J.-P., Estève E. Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012; 303: L824–33.
21. Xia Y., Fu Z., Hu J., Huang C., Paudel O., Cai S., Liedtke W. and Sham J. TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 305: C704–15.
22. Sukumaran S.V., Singh T.U., Parida S, Narasimha R.C., Thangamalai R., Kandasamy K., Singh V., and Mishra S.K. TRPV4 channel activation leads to endothelium-dependent relaxation mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat pulmonary artery. *Pharmacol Res.* 2013; 78:18-27.
23. Dryn D., Melnyk M., Kizub I., Zholos A., Soloviev A. Interaction of TRPV4 and BK_{Ca} channels in the regulation of vascular tone of rat pulmonary arteries. *Pharmacology and Drug Toxicology.* 2015; 6(46): 58-63.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.11.2015*

Корвітин знижує високий вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарда

Н.О. Рижкова, Т.І. Гавриленко, О.М. Пархоменко

ДУ ННЦ «Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска» НАМН України, Київ;
e-mail: tala.ruzh@mail.ru

Вивчали вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих, яка є новим додатковим маркером, що дає змогу оцінити метаболічну активність фагоцитів і активність запалення у хворих з гострим інфарктом міокарда і можливості її корекції корвітином. Обстежено 15 практично здорових осіб, у яких вміст мієлопероксидази становив $74,5 \pm 16,3$ нг/мл, 13 пацієнтів зі стабільною стенокардією, у яких вміст цього ферменту був $218,4 \pm 30,9$ нг/мл і 60 хворих з гострим інфарктом міокарда в динаміці лікування. Під час вступу до стаціонару у них вміст мієлопероксидази становив $606,0 \pm 59,3$ нг/мл. Профіль вмісту цієї речовини у хворих, яким було призначене стандартне лікування (без застосування корвітину), фактично не змінювався до 7-ї доби. У хворих, що отримували корвітин, дія цього препарату була неоднозначною і залежала від початкового вмісту мієлопероксидази. У пацієнтів з початково нормальним вмістом мієлопероксидази в плазмі крові (16,7%) в динаміці лікування спостерігається незначне її збільшення, тоді як у пацієнтів з високим початковим вмістом (83,3%), навпаки, реєструється зниження вмісту ферменту.

Ключові слова: інфаркт міокарда; мієлопероксидаза; корвітин

ВСТУП

Ідентифікація чинників, котрі беруть участь у патогенезі атеросклерозу, зокрема таких, що сприяють оксидативному стресу та призводять до окиснення ліпідів, розвитку запалення й аутоімунних реакцій - вельми цікава наукова тема. Одним з таких чинників є мієлопероксидаза [1, 2], яка була виділена з лейкоцитів Agner [3]. Найбільша її кількість міститься в нейтрофілах – основних клітинах вродженого імунітету, складаючи близько 5% усього об'єму клітини. Цей фермент відноситься до чинників, вміст яких не залежить від стимуляції клітини, а цілком визначається кількістю речовини, синтезованої в процесі гранулопоезу. Мієлопероксидаза рідко визначається в зрілих моноцитах і практично зникає при перетворенні моноцитів на тканинні макрофаги. У макрофагах і інших клітинах організму вона відсутня [4].

Фізіологічна функція мієлопероксидази

полягає у формуванні високореактивних прооксидантів у межах фагосоми та знищенні мікроорганізмів у клітинах вродженого імунітету [4]. Оксидативний стрес клітин вродженого імунітету у відповідь на інфекційні агенти або пошкодження клітин іншої етіології асоціюється зі змінами ліпідного метаболізму, направленою на нейтралізацію токсичного ефекту ендотоксинів. До певного моменту ці зміни корисні в захисті організму від інфекції. Проте зі збільшенням сили і тривалості патологічного процесу збільшується і ризик розвитку атеросклерозу внаслідок стимуляції окиснення ліпопротеїнів. Ці зміни відбуваються в результаті порушення про- і антиоксидантної рівноваги, а також функціональної активності клітин вродженого імунітету [5].

Як висококатіонний білок мієлопероксидаза здатна зв'язуватися з такими електро-негативними поверхнями, як ендотеліальна

стінка, ліпопротеїни або протеоглікани [6]. Показано, що при гострому запаленні вона виділяється фагоцитами в кровоносне русло, може визначатися на ендотеліальній поверхні, усередині ендотеліальних клітин і в субендотеліальному просторі. В цих місцях вона може вступати в реакцію з перекисом водню, що утворився за допомогою судинної НАДФ-оксидази, модулюючи NO-залежний сигнал. Оксидативні реакції, які каталізують субендотеліально локалізовану мієлопероксидазу, є причиною ендотеліальної дисфункції [7, 8]. Крім того, вона взаємодіє з тромбоцитами і активує їх набагато сильніше, ніж класичні активатори тромбоцитів [9].

Існує багато літературних даних про участь мієлопероксидази в патогенезі атеросклерозу з ідентифікацією цього ферменту в атеросклерозних бляшках або підвищенні її вмісту в плазмі крові [2, 7, 10]. Проте можливого цілеспрямованого терапевтичного впливу на вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарда в літературі ми не зустріли.

Одним з відомих модуляторів різних ферментів є біофлавоноїд кверцетин і, зокрема, його водорозчинна форма – корвітин, що має антиоксидантну дію [11]. Клінічними дослідженнями показано, що ця лікарська форма кверцетину зменшує реперфузійні порушення коронарного кровообігу в серці, покращує гемодинаміку і кардіодинаміку, зменшує об'єм некротизованого міокарда і проявляє антиаритмічну дію [12].

Мета нашої роботи – вивчення вмісту мієлопероксидази в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарда і можливості її корекції корвітином.

МЕТОДИКА

Нами було обстежено 15 практично здорових осіб, 13 пацієнтів зі стабільною стенокардією і 60 з гострим коронарним синдромом з елевацією сегмента ST на ЕКГ на час надходження в стаціонар до початку планової

медикаментозної терапії, а також до початку проведення реперфузійної терапії, і на 7-му добу стаціонарного лікування. У всіх хворих з гострим коронарним синдромом при подальшому спостереженні був діагностований гострий інфаркт міокарда із зубцем Q. Середній вік цих пацієнтів становив $55,8 \pm 2,0$ років. Це збігається з іншими групами, що вивчаються. Медикаментозну терапію проводили згідно з рекомендаціями Європейського товариства кардіологів і Асоціації кардіологів України з лікування хворих з гострим коронарним синдромом [13].

Пацієнти з гострим інфарктом міокарда були розділені на 2 групи. 1-ша група (12 чоловік) отримували лише стандартну терапію з проведенням інтервенційних втручань, антитромботичних препаратів, β -блокаторів та інших. 2-га група (48 чоловік), крім стандартного лікування, отримувала корвітин (Борщагівський ХФЗ, Україна) внутрішньовенно згідно з інструкцією застосування препарату.

Вміст мієлопероксидази в плазмі крові визначали методом ІФА з використанням тест-системи «eBioscience» (Австрія) згідно з інструкцією виробника. Облік реакції проводили на імуноферментному аналізаторі iEMS Labsystems (Фінляндія).

При статистичній обробці результатів використовували програму «Microsoft Excel». Достовірність відмінностей оцінювали за критерієм t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчили, що у хворих зі стабільною стенокардією у середньому вміст мієлопероксидази був підвищений порівняно з контролем ($218,4 \pm 30,9$ та $74,5 \pm 16,3$ нг/мл відповідно, $P < 0,05$). На підвищення цього показника вказували й інші автори [7]. Визначення вмісту мієлопероксидази методом проточної цитометрії у хворих зі стабільною стенокардією і наявністю атеросклерозу коронарних артерій зі стенозом, підтвердженого коронарною ангіографією,

показало достовірне збільшення цього показника у венозній крові хворих, порівняно зі здоровими особами. При цьому він також був підвищений у крові стегнової, черевної, лівої та правої коронарних артерій. Найбільш високий вміст мієлопероксидази виявлено в коронарних артеріях.

У дослідженні Epic-porfolk (Академічний Медичний Центр, Амстердам, Нідерланди) проаналізували вміст мієлопероксидази в сироватці крові практично здорових людей, яких спостерігали впродовж 8 років. У 1138 обстежених протягом цього часу розвинулася ішемічна хвороба серця, у 2237 – ні (група контролю). Тобто високий початковий вміст мієлопероксидази дає змогу передбачити збільшення ризику розвитку ішемічної хвороби серця, він також асоціюється з лейкоцитозом, вмістом С-реактивного білка і порушенням ліпідного метаболізму. Це дає підставу вважати мієлопероксидазу незалежним додатковим чинником ризику при

атеросклерозі і маркером запалення у хворих на ішемічну хворобу серця [2] .

У нашому дослідженні обстеження хворих з гострим інфарктом міокарда показало, що вміст мієлопероксидази був високим в плазмі крові більшості з них і становив в середньому по групі $606,0 \pm 59,3$ нг/мл.

Оскільки у хворих з гострим інфарктом міокарда початковий вміст мієлопероксидази істотно варіював (від 31,9 до 1870,0 нг/мл), було виділено дві підгрупи пацієнтів: 1-ша підгрупа – нормальний вміст мієлопероксидази, менше ніж 120 нг/мл, 10 осіб (16,7%); 2-га підгрупа – високий її вміст, більше ніж 120 нг/мл, 50 осіб (83,3%). Причому у більшості пацієнтів 2-ої підгрупи (55%) вміст мієлопероксидази був дуже високим – більше ніж 300 нг/мл.

Детальне обстеження пацієнтів показало (табл.1), що нормальний вміст мієлопероксидази спостерігався у осіб старшої вікової групи, в цій групі були відсутні пацієнти у

Таблиця 1. Клінічні особливості пацієнтів з гострим інфарктом міокарда залежно від початкового вмісту мієлопероксидази в плазмі крові

Показники	Вміст мієлопероксидази в плазмі крові	
	<120 нг/мл (1-ша підгрупа) n=10	>120 нг/мл (2-га підгрупа) n=50
Жінки, %	40	8,9*
Чоловіки, %	60	91,1*
Вік, %	$64,1 \pm 2,8$	$53,5 \pm 1,7^*$
Маса, %	$79,8 \pm 7,4$	$86,3 \pm 3,4$
Куріння, %	46,4	54,3
Гіпертонічна хвороба, %	100	69*
Цукровий діабет або порушення толерантності до глюкози, %	60	16,7*
Стенокардія в анамнезі, %	30	18,6
Супутні захворювання за участю запальної ланки, %	10	41,9*
Гострий інфаркт міокарда в анамнезі, %	20	2
Гостра лівошлуночкова недостатність при надходженні хворого до стаціонару, %	20	20,9
Ускладнений перебіг -аритмії, блокади серця, формування аневризми, %	70	32,6

* – вірогідність відмінностей показників між групами ($P < 0,05$).

віці до 40 років. Крім того, істотний відсоток склали жінки. Слід зазначити також наявність гіпертонічної хвороби у всіх пацієнтів, цукрового діабету у 3, а гострий інфаркт міокарда в анамнезі у 2 чоловік. Також для більшості хворих цієї групи характерний ускладнений перебіг госпітального періоду гострого інфаркта міокарда (аритмії, формування гострої аневризми, блокади серця).

Клінічними особливостями пацієнтів 2-ї підгрупи можна відзначити наявність переважно осіб чоловічої статі у віці до 60 років, причому 7 з них (20%) були віком від 37 до 40 років. Для обстежених осіб цієї групи характерною була також підвищена маса тіла, а у 5 чоловік маса перевищувала 100 кг. Звертають на себе увагу також супутні захворювання за участю запальної ланки – псоріаз, сечокам'яна хвороба, хронічний гепатит, хронічні обструктивні захворювання легень.

Нещодавно проведені дослідження дали змогу ідентифікувати підвищення вмісту мієлопероксидази в крові як новий діагностичний біомаркер гострого коронарного синдрому [10]. У 703 пацієнтів з гострим коронарним синдромом, стабільною стенокардією і осіб з нормальними коронарними судинами визначали ліпідний профіль, вміст окиснених ліпопротеїдів низької щільності, С-реактивного білка, секреторної фосфоліпази A2, параоксонази-1 і мієлопероксидази. Високий вміст мієлопероксидази був найбільш відмітною ознакою для ідентифікації гострого коронарного синдрому у пацієнтів з розвитком болю в грудній клітці.

Крім того, високий вміст мієлопероксидази в плазмі крові вважається поганою прогностичною ознакою при гострому інфаркті міокарда [14]. У 33% хворих з ускладненим перебігом цього захворювання визначався високий вміст мієлопероксидази, а у 11% – низький. При спостереженні за хворими впродовж подальших 2 років встановлено, що більший ризик смерті і ускладнень спостерігається у пацієнтів з високим вмістом мієлопероксидази.

У дослідженні Capture [15] був проведений мультимаркерний аналіз (мієлопероксидаза, тропонін-Т, плацентарний фактор росту, ІЛ-10) у 1090 хворих з гострим коронарним синдромом без підйому сегмента ST впродовж 4 років спостереження. Тільки у 6% пацієнтів при первинному обстеженні всі маркери були в нормі, а у 35,8% – три і більше маркери відрізнялися від нормальних значень. Мультимаркерна модель показала, що такі чинники, як мієлопероксидази більше ніж 350 мкг/л, тропонін-Т більше ніж 0,01 мкг/л, плацентарний фактор росту більше ніж 27 нг/л і ІЛ-10 менше ніж 3,5 нг/л є достовірними предикторами загальної смерті і розвитку нефатального гострого інфаркта міокарда.

Нині відбувається пошук фармакологічних агентів, здатних інгібувати вміст і активність мієлопероксидази [8, 16]. При цьому у хворих з наявністю гострого інфаркту міокарда подібних даних в доступній нам літературі ми не виявили. Разом з тим раніше нами було показано інгібувальний вплив корвітину на активність мієлопероксидази нейтрофілів периферичної крові хворих з гострим інфарктом міокарда [17].

У нашому дослідженні визначали вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих з гострим інфарктом міокарда в динаміці лікування. Отримані результати показали істотне коливання вмісту ферменту у пацієнтів, що отримували і не отримували корвітин.

Профіль вмісту мієлопероксидази у хворих 1-ї групи, що приймали стандартне лікування (без застосування корвітину), фактично не змінювався до 7-ї доби лікування, незалежно від того, низький або високий вміст мієлопероксидази був під час вступу хворого до стаціонару. У хворих 2-ї групи, що отримували корвітин, дія цього препарату була неоднозначною і залежала від початкового вмісту мієлопероксидази (табл.2).

У пацієнтів з початково нормальним вмістом мієлопероксидази в плазмі крові (менше ніж 120 нг/мл) в динаміці лікування

Таблиця 2. Вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда в динаміці лікування

Показники	Вміст мієлопероксидази в плазмі крові (нг/мл)	
	1-ша доба	7-ма доба
Донори (n=15)	74,5±16,3	-
Стабільна стенокардія без перенесеного інфаркту (n=13)	218,4±30,9	-
Хворі на гострий інфаркт міокарда		
1-ша група (без корвітину; n=12)	522,6±135,5*, **	482,1±140,4*,**
2-га група (корвітин; n=48)	621,6±84,2*, **	370,3±65,8*, ***
1-ша підгрупа		
Вміст мієлопероксидази <120 нг/мл (n=9)	90,6±6,7	209,6±37,7*, ***
2-га підгрупа		
Вміст мієлопероксидази >120 нг/мл (n=35)	735,2±88,5*	398,1±76,5*, ***

* P<0,05 між пацієнтами з гострим інфарктом міокарда і практично здоровими особами; ** між пацієнтами з гострим інфарктом міокарда і хворими на стабільну стенокардію; *** P<0,05 між 1-ю і 7-ю добою.

спостерігалось збільшення (в середньому на 155%, P<0,05) цього показника; у пацієнтів з помірно підвищеним або високим початковим вмістом мієлопероксидази, навпаки, реєстрували зниження вмісту ферменту (в середньому на 250%, P<0,05), але тільки у 34% пацієнтів цієї групи показник знижувався до нормальних значень.

Таким чином, вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда є новим додатковим маркером, що дає змогу оцінити не тільки метаболічну активність фагоцитів, що є основою «сплеску» вільнорадикальних процесів при розвитку гострого коронарного синдрому, але і активацію прозапальних процесів при цьому захворюванні.

Отримані результати показали підвищення вмісту мієлопероксидази в плазмі крові хворих на ішемічну хворобу серця. Разом з тим, якщо у хворих на стабільну стенокардію він був помірно підвищений, то у хворих з гострим інфарктом міокарда істотно варіював. Основну групу (55%) склали пацієнти з дуже високим вмістом мієлопероксидази (більше 300 нг/мл). Найменша кількість пацієнтів (16,7%) була з нормальними показниками вмісту ферменту.

Початковий вміст мієлопероксидази асоціювався з супутньою клінічною патологією

і характером терапевтичної дії корвітину на цей показник у динаміці лікування. У пацієнтів з початково нормальним вмістом мієлопероксидази в плазмі крові в динаміці лікування спостерігалось незначне його збільшення, тоді як у пацієнтів з високим початковим її вмістом, навпаки, реєструвалось зниження його вмісту. Подібна динаміка біомаркера може свідчити про виражений протизапальний ефект корвітину, а його використання в клінічній практиці може бути корисним для моніторингу активності захворювання, прогнозуванні його перебігу і у виборі правильної стратегії лікування. Застосування корвітину в комплексній терапії хворих з гострим інфарктом міокарда, вірогідно, здатне зменшити деструктивну дію мієлопероксидази при атеросклерозі і запобігти його дестабілізації, що було раніше виявлене в клінічних дослідженнях.

**Н.А. Рыжкова, Т.И. Гавриленко,
А.Н. Пархоменко**

КОРВИТИН СНИЖАЕТ ВЫСОКОЕ СОДЕРЖАНИЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Изучали содержание миелопероксидазы в плазме крови, которая является новым дополнительным маркером, позволяющим оценить метаболическую активность фагоцитов и активность воспаления у больных с острым инфарк-

том міокарда и возможности её коррекции корвитином. Обследовано 15 практически здоровых лиц, у которых содержание миелопероксидазы составило $74,5 \pm 16,3$ нг/мл, 13 пациентов со стабильной стенокардией, у которых её содержание было $218,4 \pm 30,9$ нг/мл и 60 больных с острым инфарктом миокарда в динамике лечения. При поступлении в стационар содержание миелопероксидазы составило $606,0 \pm 59,3$ нг/мл. Профиль её содержания у больных, принимавших стандартное лечение (без применения корвитина), фактически не изменялся к 7-м суткам лечения. У больных, получавших корвитин, действие этого препарата было неоднозначным и зависело от исходного содержания миелопероксидазы. У пациентов с исходно нормальным содержанием миелопероксидазы в плазме крови (16,7%) в динамике лечения наблюдается незначительное её увеличение, тогда как у пациентов с высоким исходным содержанием этого вещества (83,3%), наоборот, регистрируется снижение содержания фермента. Ключевые слова: инфаркт миокарда; миелопероксидаза; корвитин

**N.O. Ryzhkova, T.I. Gavrilenko,
O.M. Parkhomenko**

KORVITIN REDUCES THE HIGH MAINTENANCE OF MYELOPEROXIDASE IN PLASMA OF BLOOD OF PATIENTS WITH THE ACUTE INFARCT OF MYOCARDIUM

We studied the content of myeloperoxidase in plasma of blood, which is a new additional marker of the metabolic activity of phagocytes and the activity of inflammation in patients with the acute infarct of myocardium and possibility of its correction of Korvutin. We inspected 15 practically healthy persons in which the content of myeloperoxidase was $74,5 \pm 16,3$ ng/ml, 13 patients with a stable stenocardia (the content of myeloperoxidase was $218,4 \pm 30,9$ ng/ml) and 60 patients with acute infarct of myocardium (the content of myeloperoxidase was $606,0 \pm 59,3$ ng/ml at the beginning of therapy) in the dynamics of treatment. In patients accepting standard treatment (without application of Korvutin), the content of myeloperoxidase was unchanged during 7 days of treatment. In patients administered korvutin, the action of this preparation depended on the initial level of myeloperoxidase. In Patients with the initial normal plasma content of myeloperoxidase (16,7%), its content insignificantly increased during the time course of the treatment, while in patients with the high initial level of myeloperoxidase (83,3%), its level declined during treatment. Key words: acute infarct of myocardium; myeloperoxidase; korvutin

“NSC “M.D. Strazhesko Institute of Cardiology NAMS of Ukraine”, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

1. Gavrilenko T, Ryzhkova N, Parkhomenko O. Myeloperoxidase and its role in development of ischemic heart diseases. Ukr Card J 2014; 4: 119-26. [Russian].
2. Salonen I, Huttunen K, Hirvonen M, Dufva J, Groundstroem K, Dufva H, Pekkanen J, Salonen R. Serum myeloperoxidase is independent of the risk factors of atherosclerosis. Coron Artery Dis. 2012; 23(4): 251-8.
3. Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. Acta Chem Scand. 1941; A2 (S.8): 1-62.
4. Klebanoff S. Myeloperoxidase: Friend and foe. J Leuc Biol. 2005; 77(5): 598-625.
5. Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, Serafini M. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2012; 12(4): 351-60.
6. Ruleva N, Zvyaginceva M, Dugin S. Myeloperoxidase: biological functions and clinical value. Modern Sci Technol. 2007; 8: 11-14. [Russian].
7. Alipour A, Ribalta J, Njo T, Janssen H, Birnie E, van Miltenburg A, Elte J, Castro C. Trans-vessel gradient of myeloperoxidase in coronary artery disease. Eur J Clin Invest. 2013; 43(9): 920-5.
8. Patterson E, Fraser D, Capretta A, Potter R, Cepinskas G. Carbon monoxide-releasing molecule 3 inhibits myeloperoxidase and protects against MPO-induced vascular endothelial cell activation/dysfunction. Free Radic Biol Med. 2014; 26 (70C): 167-73.
9. Kolarova H, Klinke A, Kremserova S, Adam M, Pekarova M, Baldus S, Eiserich J, Kubala L. Myeloperoxidase induces the priming of platelets. Free Radic Biol Med. 2013; Aug;61:357-69.
10. Graner M, Tikkanen E, Rimpila O, Tikkanen H, Ripatti S, Lokki M, Niemen M, Taskinen M, Sinisalo J. Diagnostic efficacy of myeloperoxidase to identify acute coronary syndrome in subjects with chest pain. Ann Med. 2013; Jun;45(4): 322-7.
11. Moybenko O, Dosenko V, Parkhomenko O. Endogenous mechanisms of cardioprotection as basis of nosotropic therapy of diseases of heart. Kyiv: Scientific thinking; 2008. [Russian].
12. Kozhukhov S, Parkhomenko A. Myocardial protection by intravenous 5-lipoxygenase inhibitor Quercetin administration before primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction: short-term results an open blind randomized trial. J Am Coll Cardiol. 2007; 49(9): 226A.
13. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundquist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg P, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Eur. Heart J. 2008; 29(23): 2909-45.
14. Dullaart RP, Tietge UJ, Kwakernaak A, Dikkeschei BD, Pertion F, Tio RA. Alterations in plasma lecithin: cholest-

- terol acyltransferase and myeloperoxidase in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2014; 234(1):185-92.
15. Oemrawsingh R, Lenderink T, Akkerhuis K, Heeschen C, Baldus S, Fichtlscherer S, Hamm C, Simoons M, Borsma E. Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart*. 2011; 97(13): 1061-6.
16. Kajer T, Fairfull-Smith K, Yamasaki T, Yamada K, Fu S, Bottle S, Hawkins C, Davies M. Inhibition of myeloperoxidase- and neutrophil-mediated oxidant production by tetraethyl and tetramethyl nitroxides. *Free Radic Biol Med*. 2014; May;70: 96-105 .
17. Ryzhkova N, Gavrilenko T, Parkhomenko O, Kozhukhov S. Metabolic activity of neutrocytes and the ways of it are possible correction at of patients from by the acute coronary syndrom. *Fiziol J*. 2011; 57(2): 35-42 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 18.09.2015*

Зміни поверхневого маркера CD44 еритроцитів при гіпотермічному та низькотемпературному зберіганні

Н.Г. Землянських, Л.О. Бабійчук

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, e-mail: nina_zemlya@mail.ru

У роботі досліджено зміни поверхневого маркера CD44 в еритроцитах, які кріоконсервовали за наявності гліцерину та ПЕГ-1500 або зберігали в гіпотермічних умовах. Показано, що при гіпотермічному зберіганні характеристики CD44 в суспензії еритроцитів не змінювалися впродовж 10 діб. У кріоконсервованих еритроцитах відзначалося зниження кількості CD44⁺-клітин і рівня експресії поверхневого маркера. Використання ПЕГ-1500 призводило до більш виражених змін характеристик CD44 в еритроцитах після розморожування порівняно з гліцерином. Видалення кріопротекторів і втрата частини клітин в процесі відмивання призвели до відновлення характеристик CD44 в суспензії розморожених еритроцитів, які успішно пережили стрес. Отримані результати свідчать, що в кріоконсервованих еритроцитах виявлені зміни охоплюють тільки частину клітин, і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44, оскільки після видалення кріопротекторів із супутнім гемолізом нестабільних клітин, показники CD44 в еритроцитарній суспензії відновлювалися. Механізми, що лежать в основі змін параметрів поверхневого маркера CD44 в розморожених еритроцитах, можуть бути пов'язані з порушенням міжмолекулярних взаємодій у мембрані під впливом фізико-хімічних факторів середовища, і процесом везикуляції мембран з включенням білків CD44 до складу везикул.

Ключові слова: еритроцит; мембрана; CD44; заморожування; кріопротектор.

ВСТУП

Зміни поверхневих мембранних маркерів при старінні, гіпотермічному зберіганні та розвитку патофізіологічних процесів в еритроцитах, корелюють зі зниженням життєздатності та стабільності клітин [1, 2]. Вочевидь, поверхневі характеристики віддзеркалюють структурно-функціональні перебудови мембран, які викликані різними стресовими факторами. Відомо, що в еритроцитах стабільність мембрани значною мірою залежить від білків цитоскелета, пов'язаного точковими контактами з окремими інтегральними білками або білковими комплексами, до складу яких входить поверхневий маркер CD44. Останній являє собою молекулу адгезії, яка опосередковує зв'язок клітин з гіалуроновою кислотою та іншими компонентами позаклітинного матриксу [3, 4]. В еритроцитах CD44 представлений стандартною

ізоформою (CD44s), яка також називається гемопоетичною (CD44H), та презентує антигени двох різних систем груп крові: AnWj і In a/b [5, 6]. У нормі еритроцити людини не виявляють адгезивної активності, але залучені в розвиток патофізіологічних процесів, пов'язаних з вазооклюзивними станами при серпоподібноклітинній анемії, спадковому сфероцитозі та інших захворюваннях [7]. Існують докази участі CD44-еритроцитів в міжклітинній сигналізації, спрямованій на стимуляцію лімфоцитів і моноцитів [8, 9] і видалення з організму чужорідних об'єктів і апоптотичних клітин. Зв'язок CD44 з цитоскелетом в еритроцитах, вочевидь, може відігравати певну роль у модуляції механоеластичних властивостей мембрани. Це побічно підтверджується тим, що за наявності генетичної модифікації, яка призводить до повної втрати цитоскелетного білка смуги

4.2 і супроводжується підвищенням асоціації CD44 з цитоскелетом, спостерігається відносно м'який фенотип анемії [10].

Зважаючи на різноманітність функцій CD44 в еритроцитах, його зміни в процесі гіпотермічного (2–5°C) та низькотемпературного зберігання (–196°C), ймовірно, важливі для нормального функціонування клітин в руслі крові. У зв'язку з вищенаведеним, дослідження характеристик поверхневого мембранного маркера CD44 після зберігання еритроцитів можуть бути вирішальними як для оцінки структурно-функціональної повноцінності клітин, так і розуміння механізмів, які відповідальні за їх пошкодження в екстремальних умовах.

Збереженість клітин при низьких температурах забезпечують ендо- та екзоцелюлярні кріопротектори, які реалізують захисні властивості, проникаючи в клітини або залишаючись у позаклітинному середовищі. Нині розроблені різні способи кріоконсервування еритроцитів, які відрізняються різною температурою зберігання, швидкостями заморожування та компонентами консервуючих розчинів. Практично всі вони базуються на використанні ендоцелюлярного кріопротектора гліцерину. Він гарантує високу збереженість еритроцитів у процесі кріоконсервування як при –80°C, так і при більш низьких температурах (до –196°C) [11]. Проте використання ендоцелюлярного кріопротектора передбачає його видалення з клітин після розморожування, що вимагає додаткових витрат. Тому екзоцелюлярні кріопротектори викликають значний інтерес у дослідників [12, 13], оскільки на їх основі можуть бути створені безвідмовні технології кріоконсервування. Перспективним екзоцелюлярним кріопротектором для еритроцитів може розглядатися поліетиленгліколь з молекулярною масою 1500 Да (ПЕГ-1500).

Мета нашої роботи – вивчення змін поверхневого маркера CD44 в еритроцитах, кріоконсервованих за наявності гліцерину та ПЕГ-1500 або при зберіганні в гіпотермічний умовах.

МЕТОДИКА

У роботі були використані такі реактиви: CD44-FITC (“BD Biosciences”, США), тріс, HEPES (“Sigma”, США), бичачий сироватковий альбумін (БСА; “PAA Laboratories GmbH”, Австрія), глюкоза та ПЕГ-1500 (“Fluka”, США), а також гліцерин і солі виробництва України та Росії (х.ч. або ч.д.а.). Препарат CD44-FITC являє собою моноклональні антитіла, кон'юговані з флуоресцентним барвником FITC, які специфічно зв'язуються з поверхневим мембранним маркером CD44.

Об'єктом дослідження були еритроцити крові донорів, заготовленої з використанням глюкозоцитратного розчину в центрі крові м. Харкова. Еритроцити осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв (ОПН-3) при кімнатній температурі, видаляли плазму і лейкоцитарні компоненти крові. Потім до осаджених еритроцитів додавали середовище А (ммоль/л): NaCl – 150, тріс – HCl – 10; pH 7,4 в об'ємі, який в 5 разів перевищує об'єм клітинної маси і відмивали від залишків плазми і білих клітин триразовим центрифугуванням в аналогічному режимі.

Для кріоконсервування еритроцитів використовували кріозахисні розчини на основі гліцерину та ПЕГ-1500. Розчин, який містить 30% гліцерину, 4% манітолу, 0,7% NaCl, додавали в рівному об'ємі до еритроцитів, постійно перемішуючи, при кімнатній температурі. Кінцева концентрація гліцерину в суспензії становила 18–20%. Другий розчин – 30% ПЕГ-1500, на основі середовища А, додавали до охолоджених еритроцитів у рівному об'ємі при 5–7°C. Кінцева концентрація ПЕГ-1500 в суспензії становила близько 20%. Суспензії еритроцитів переносили в пробірки для заморожування й занурювали в рідкий азот (–196°C). Заморожені зразки відігрівали у водяній бані при 44°C.

Аліквоти клітин кожного зразка (близько 700 мкл) відбирали для аналізу змін стану поверхневого маркера еритроцитів CD44,

викликаних процесами заморожування–відтавання. Також клітини у розморожених зразках відмивали від кріопротекторів. Для гліцеринових зразків процедура відмивання включала осадження клітин центрифугуванням (3000 об/хв, 5–7 хв) і три етапи відмивання з використанням таких розчинів: 0,6 моль/л NaCl (перше відмивання) та 150 ммоль/л NaCl (друге і третє відмивання). Процедура відмивання зразків, кріоконсервованих з ПЕГ-1500, включала осадження клітин центрифугуванням (1500 об/хв, 5–7 хв) з подальшим розведенням осаджених клітин рівним об'ємом середовища А з аналогічним режимом центрифугування.

Надалі відібрані аліквоти клітин (50 мкл) суспендували в 500 мкл різних середовищ. Клітини, кріоконсервовані в гліцериновому середовищі, розводили в розчині 2 моль/л гліцерину, на основі середовища А. Клітини, кріоконсервовані під захистом ПЕГ-1500, розводили в 20%-му розчині цієї сполуки, на основі середовища А. Кріоконсервовані клітини, відмиті від кріопротекторів, розводили в модифікованому середовищі Рінгера, якій також використовували як контроль (ммоль/л): NaCl – 125, KCl – 5, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 1, HEPES – 32 (pH 7,4), глюкоза – 5 і БСА – 0,5%. Гематокрит клітинних суспензій становив близько 10%. Клітини інкубували протягом 1 год при 37°C. Потім клітинні суспензії розводили у відповідних розчинах до концентрації 10⁷ клітин/мл, додавали CD44-FITC та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв у темряві. Після чого знижували концентрацію клітин до 10⁶ клітин/мл і оцінювали зв'язування еритроцитами CD44-FITC методом проточної цитометрії на приладі FACS Calibur (Becton Dickinson, США). У кожному вимірі прораховували 30000 подій. Результати аналізували за допомогою програми WinMDI 2.8.

Гемоліз визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100% приймали гемоліз у зразку, в якому еритроцити лізирували внесенням 0,01% розчину Тритону

X-100 в об'ємі у 1000 разів більшому, ніж об'єм еритромаси. Гемоліз оцінювали окремо після етапів розморожування та відмивання. У разі відмивки від гліцерину надосад усіх трьох етапів відмивання об'єднували і, таким чином, оцінювали рівень гемолізу, відповідний етапу відмивання. Розрахунок проводили з урахуванням об'ємів надосадів і коефіцієнтів розведення.

Статистичну обробку результатів виконували з використанням програмного пакета Statgraphics plus 2.1 for Windows і представляли у вигляді $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення). Статистичну значимість відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою множинного рангового тесту Фішера за процедурою групування вибірок з найменш значимою різницею. У кожній серії проведено по шість дослідів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення показників маркера CD44 в еритроцитах базується на цитометричному аналізі гістограм розподілу клітин, мічених однойменним моноклональним антитілом, кон'югованим з флуоресцентним барвником FITC (CD44-FITC). Метод проточної цитометрії дає змогу охарактеризувати зміни субпопуляційного складу клітинної суспензії, яка представлена співвідношенням CD44⁺-клітин, в мембрані яких є молекули адгезії та CD44⁻-клітин, мембрани яких не містять молекул CD44. Крім того, важливою характеристикою CD44⁺-клітин є рівень експресії поверхневого маркера, тобто кількість або щільність молекул CD44 в мембранах клітин. Окремі клітини різняться за рівнем інтенсивності флуоресценції, що відображається на гістограмах розподілу цього показника. Зміна кількості молекул CD44 в мембранах CD44⁺-клітин (експресії маркера) під впливом певних факторів призводить до зміни діапазону інтенсивності флуоресценції, який охоплює зону CD44⁺-клітин. Адекватною характе-

ристикою, яка відображає зміну експресії маркера CD44 в клітинах, може бути медіана гістограми розподілу клітин, що показує величину, відносно якої клітини в суспензії розділені на дві рівні за чисельністю частини.

Перш за все, для аналізу змін маркера CD44 в клітинах під впливом різних режимів зберігання слід було чітко розмежувати зони двох вищевказаних субпопуляцій еритроцитів. У зв'язку з цим було оцінено розподіл нативних еритроцитів, які не інкубували з CD44-FITC, в межах FL1-каналу для того, щоб чітко ідентифікувати діапазон CD44-клітин (негативний контроль). Еритроцити, які не мічені моноклональними антитілами, розподілялися в діапазоні 0–3,5 ум.од. інтенсивності флуоресценції каналу FL1 (ІФ FL1; рисунок, а). У всіх наступних розрахунках верхнє значення цього діапазону було крайньою межею маркерів гістограм, відсікаючи частку CD44-клітин. У нативній суспензії близько 80% еритроцитів зв'язували мітку CD44-FITC, тобто були CD44⁺, і розподілялися в діапазоні від 3,5 до 100 ум.од. ІФ FL1 (див. рисунок, а) з середнім значенням медіани гістограм розподілу, представленим в табл. 1.

Зберігання еритроцитів в глюкозо-цитратному середовищі «Глюгіцер» у гіпотермічних умовах протягом 10 діб не впливало суттєво на характеристики поверхневого маркера CD44. У цьому разі ні кількість CD44⁺-клітин, ні експресія маркера в їх діапазоні не відрізнялися значимо від характеристик контрольних зразків (див. рисунок а, табл. 1).

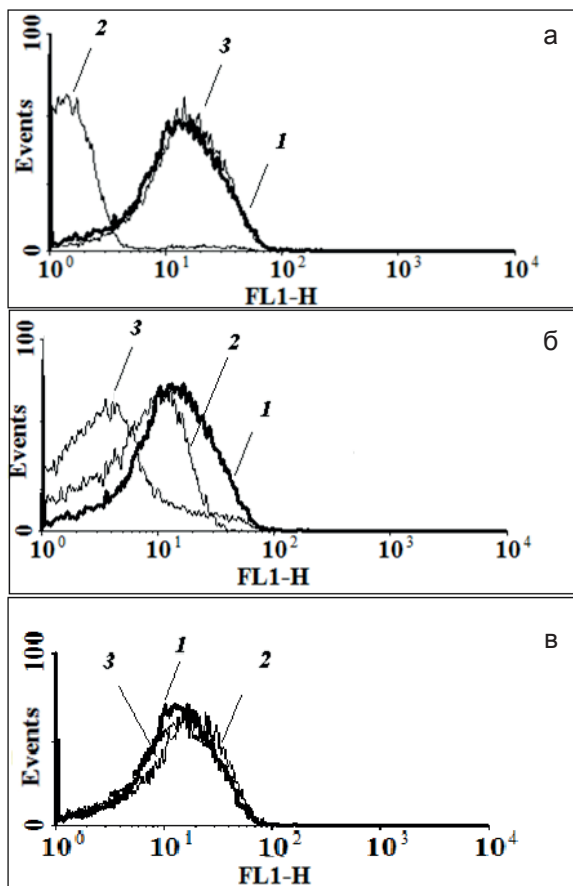
Зберігання еритроцитів при наднизьких температурах пов'язано з процесами заморожування–відтавання клітинних суспензій, які супроводжуються гемолізом унаслідок пошкоджень частини клітин (табл. 2), і, можливо, впливають на структурно-функціональні параметри інших клітин на рівні сублетальних або незначних для їх стабільності змін, які можуть відбитися на презентації поверхневих маркерів. Оцінка параметрів CD44 в розморожених еритроцитах, які зберегли цілісність і доступні для аналізу методом проточної цитометрії, була виконана після нетривалої їх експозиції при 37°C за наявності кріопротекторів. Значення медіан гістограм розподілу вказують на помітне зниження експресії поверхневого маркера CD44 (див. табл. 1, рисунок, б) у розморожених клітинах, яке було виражено однаково за наявності гліцерину і ПЕГ-1500. Разом з тим кількість CD44⁺-клітин у суспензії розморожених еритроцитів за наявності ендотеліального кріопротекторів змінювалася по-різному (див. табл. 1). У разі ПЕГ-1500 воно знижувалося більше, ніж у гліцерині. Більше того, кількість CD44⁺-клітин у розморожених суспензіях з ПЕГ-1500 вірогідно відрізнялася не тільки від контролю, але і від зразків розморожених еритроцитів, кріоконсервованих під захистом гліцерину.

Беручи до уваги, що при трансфузії кріоконсервованих еритроцитів передбачається попереднє видалення кріопротектора у разі використання гліцерину, або розведення кріопротектора у руслі крові з подальшим його

Таблиця 1. Вплив гіпотермічного зберігання і кріоконсервування в присутності гліцерину і ПЕГ-1500 на характеристики поверхневого мембранного маркера CD44 еритроцитів.

Схема досліджу	Кількість CD44 ⁺ - клітин, %	Медіана гістограми ІФ FL-1-канала, ум.од.
Контроль (середовище Рінгера)	79,9±3,6	13,3±1,3
Кріоконсервування за наявності гліцерину	69,5±1,7*	8,9±0,9*
ПЕГ-1500	57,8±8,0**	8,3±1,2*
Відмивання від гліцерину	81,7±3,2	14,3±5,3
ПЕГ –1500	81,9±6,1	12,8±2,6
Гіпотермічне зберігання	82,2±6,4	14,9±2,3

* P<0,05 відносно контролю, ** P <0,05 відносно зразків, заморожених під захистом гліцерину.



Вплив низькотемпературного і гіпотермічного зберігання на CD44 еритроцитів: а: 1 (тут і далі (б і в) – нативні еритроцити в середовищі Рінгера (контроль); 2 – еритроцити, що не мічені CD44-FITC (негативний контроль); 3 – еритроцити, що зберігалися в гіпотермічних умовах протягом 10 діб. б: еритроцити, кріоконсервовані під захистом гліцерину (2) і ПЕГ-1500 (3). в: еритроцити, відмиті від кріопротекторів, після кріоконсервування під захистом гліцерину (2) і ПЕГ-1500 (3). Параметри CD44 оцінювали після інкубування при 37 °C протягом 1 год за наявності кріопротекторів (б) або середовища Рінгера (а, в). За віссю абсцис – значення інтенсивності флуоресценції клітин в FL-1-каналі (ум.од. ІФ FL1); шкала представлена логарифмічними значеннями. За віссю ординат – кількість прорахованих подій в нормалізованому вигляді. Представлені результати типового експерименту

виведенням з організму при застосуванні ПЕГ-1500, доцільно було оцінити характеристики CD44 у суспензіях кріоконсервованих еритроцитів після відмивання кріопротекторів, моделюючи умови трансфузії. В процесі видалення кріопротекторів також спостерігався гемоліз (див. табл. 2), що могло стати причиною додаткових змін характеристик поверхневих маркерів в еритроцитарній суспензії. Було встановлено, що після видалення кріопротекторів і нестабільних клітин, які зазнали гемолізу в процесі відмивання, кількість CD44⁺-еритроцитів і рівень експресії маркера (див. рисунок, в) вірогідно не відрізнялися від контрольних значень (див. табл. 1). Ці факти вказують на те, що зниження презентації поверхневого маркера в кріоконсервованих клітинах може бути зумовлено популяцією нестабільних клітин з порушеною структурою, які видаляються в процесі відмивання (див. табл. 2).

Очевидно, що зміни поверхневого маркера CD44 в еритроцитах в процесі заморожування–відтавання пов'язані зі змінами фізико–хімічних показників середовища. У розморожених зразках, як було вище зазначено, зменшилася кількість CD44⁺-клітин, і знижувався рівень експресії цього маркера. Однак видалення кріопротекторів, яке супроводжується втратою частини клітин в процесі відмивання, відновлювало показники розподілу CD44 в суспензії кріоконсервованих еритроцитів до стану, порівнянного з контрольними характеристиками. Ці факти свідчать про те, що зміни охоплюють тільки частину клітин в суспензії і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44. Основні пошкодження субклітинних структур, зокре-

Таблиця 2. Гемолітичні ушкодження еритроцитів після розморожування і відмивання від кріопротекторів.

Схема досліджу	Гемоліз еритроцитів, %
Кріоконсервування за наявності гліцерину	5,2 ± 1,5
ПЕГ –1500	2,5 ± 1,6
Відмивання від гліцерину	18,2 ± 3,5
ПЕГ-1500	25,7 ± 3,7

ма мембран, у процесі заморожування–відтавання можуть бути пов'язані з процесами дегідратації макромолекул при зниженні температури нижче від 0°C або контактом клітинних компонентів з кристалами льоду, які утворюються в процесі заморожування або рекристалізації на етапі відтавання [14, 15]. Унаслідок цього відбуваються конформаційні порушення білків і зміни структурного порядку ліпідів у мембрані. Кріопротектори істотно згладжують несприятливі процеси і перешкоджають розвитку пошкодження клітин. Тим не менш у будь-якій системі існує неоднорідність фізико-хімічних показників середовища, яка пов'язана, зокрема, з різною віддаленістю клітин від стінок контейнерів, і, отже, від джерела холоду і тепла. Наявність теплового градієнта зумовлює ризик формування кристалів льоду в окремих ділянках системи та пошкодження частини клітин. Інший важливий фактор, який зумовлює можливість пошкодження частини клітин у суспензії, пов'язаний з віковою гетерогенністю еритроцитів. У зв'язку з тим, що старі еритроцити характеризуються меншою стійкістю до різних стресових впливів [16] можна очікувати, що вони будуть більше піддаватися руйнуванню в процесі кріоконсервування. Поєднання вищенаведених факторів зумовлює можливість пошкодження частини клітин в суспензіях, які кріоконсервуються. Такі пошкодження асоціюються з втратою інтегрального білка CD44 на стадії сублетальних порушень, коли клітини ще здатні зберігати цілісність, і можуть бути ідентифіковані методом проточної цитометрії. Видалення таких клітин у процесі відмивання призводить до відновлення характеристик CD44 в кріоконсервованих клітинних суспензіях, які успішно пережили стрес, пов'язаний із заморожуванням–відтаванням і видаленням кріопротектора.

Зниження експресії CD44 на поверхні еритроцитів може бути зумовлено везикуляцією мембрани. Серед факторів, що сприяють везикуляції, важливу роль може відігравати трансформація форми клітин [17]. Важливо

відзначити, що в суспензіях розморожених еритроцитів постійно спостерігаються трансформовані клітини. Відомо, що везикуляція мембран еритроцитів може відбуватися як в стресових [18], так і в фізіологічних умовах, зокрема, в процесі старіння *in vivo* [19]. Таким чином клітини позбавляються від ділянок мембрани, які несуть в собі специфічні ознаки старіння і можуть розпізнаватися імуннокомпетентними клітинами, що дає змогу їм безпечно залишатися довгий час у руслі крові [19]. Молекулярні механізми, які лежать в основі формування везикул та зміни показників поверхневого маркера CD44 в процесі кріоконсервування, можуть бути пов'язані зі структурними модифікаціями ліпідного бішару та/або змінами в системі білок-білкових взаємодій у мембрано-цитоскелетному комплексі. Зміни структури ліпідного бішару на окремих ділянках мембрани можуть індукувати процес формування везикул з включенням інтегральних білків, не пов'язаних з цитоскелетом, що призводить до зниження їх експресії на поверхні мембрани. Сприяти втраті поверхневого маркера можуть також зміни зв'язків між мембранними білками і цитоскелетом еритроцитів під впливом факторів кріоконсервування. Відомо, що молекули CD44 пов'язані з білками цитоскелета. Ці зв'язки є динамічними і можуть відрізнятися в різних ділянках мембрани [3, 4]. В еритроцитах людини виявлена здатність CD44 взаємодіяти з цитоскелетом через анкірин і білок смуги 4.1 [20, 21]. Раніше було показано, що зміна білкових взаємодій у макромолекулярному комплексі до складу, якого входять білок смуги 4.1 та CD44 може впливати на експресію поверхневого маркера CD44, сприяючи її зниженню [21]. Якщо припустити, що під впливом факторів середовища в процесі кріоконсервування ослаблюються взаємодії в системі цього макрокомплексу білків, то втрата CD44 буде посилюватися. Важливо відзначити, що зміни вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} можуть відігравати ключову роль в ініціації таких процесів, оскільки

Ca^{2+} і кальмодулін знижують спорідненість взаємодії білка смуги 4.1 з CD44 [20]. Зміни вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} [22, 23] та активності Ca^{2+} -АТФази [24, 25], пов'язані із застосуванням гліцеролу і ПЕГ-1500 можуть сприяти цій тенденції.

При гіпотермічному зберіганні еритроцитів зміни структури плазматичної мембрани пов'язані з метаболічними порушеннями і окисними процесами, які торкаються ліпідних і білкових компонентів мембрани [18]. Оскільки зберігання еритроцитів за умов гіпотермії до 10 діб несуттєво впливало на характеристики CD44, можна зробити висновок, що цей період часу не є критичним для розвитку пошкоджень мембрани, які б позначалися на стабільності клітин, зокрема, не було виявлено сублетальних ушкоджень, пов'язаних з змінами характеристик CD44. Дійсно, під час проведення всіх етапів експерименту, пов'язаного з визначенням характеристик маркера CD44 в еритроцитах, які зберігалися в умовах гіпотермії, не було відзначено гемолізу еритроцитів. Порівнюючи результати впливу низькотемпературного та гіпотермічного зберігання еритроцитів на показники CD44, можна відзначити що, швидка втрата поверхневого маркера після кріоконсервування (протягом 1 год) може бути зумовлена структурними порушеннями мембрани під впливом фізико-хімічних факторів кріоконсервування, оскільки метаболічні ушкодження розвиваються досить повільно. В основі таких пошкоджень можуть лежати порушення зв'язків між білками макрокомплексів, які об'єднують цитоскелет і мембрану в єдину систему, і структурна модифікація ліпідів мембрани на окремих ділянках.

Отримані результати вказують на те, що оцінка гемолізу в суспензіях розморожених еритроцитів як основного тесту ефективності нових розроблених способів кріоконсервування, зокрема, з використанням ПЕГ-1500, без урахування змін поверхневих характеристик клітин, може призвести до завищення очікуваних показників життєздатності ери-

троцитів у руслі крові. Зміни характеристик поверхневого маркера CD44 в суспензії кріоконсервованих клітин, як відображення порушень білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій у мембранах еритроцитів у процесі кріоконсервування, можуть також вказувати на зміну механо-еластичних властивостей мембрани, відповідальних за проходження еритроцитів через капілярну систему, і ризик розвитку внутрішньосудинного гемолізу. У перспективі, вивчення адгезивних властивостей кріоконсервованих еритроцитів, зумовлених наявністю в мембранах молекул адгезії CD44, дасть змогу охарактеризувати безпеку таких клітин для пацієнтів при трансфузії і знизити ризик вазооклюзивних процесів.

Таким чином, в еритроцитах, кріоконсервованих під захистом гліцерину і ПЕГ-1500, відзначається зниження кількості CD44⁺-клітин і рівня експресії поверхневого маркера. Використання ПЕГ-1500 призводить до більш вираженого зсуву характеристик CD44 у розморожених еритроцитах порівняно з гліцерином. Видалення кріопротекторів і втрата частини клітин у процесі відмивання призводять до відновлення характеристик CD44 в суспензіях кріоконсервованих еритроцитів. Отримані результати вказують на те, що під впливом заморожування-відтавання зміни торкаються тільки частини клітин, і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44, оскільки після видалення кріопротекторів із супутнім даній процедурі гемолізом, параметри CD44 в еритроцитарній суспензії відновлюються. На відміну від кріоконсервування гіпотермічне зберігання до 10 діб не впливало суттєво на характеристики CD44 еритроцитів.

Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук

ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО МАРКЕРА CD44 ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ

В работе исследованы изменения поверхностного маркера CD44 в эритроцитах, криоконсервированных под защитой

глицерола и ПЭГ–1500 или хранившихся в гипотермических условиях. Показано, что при гипотермическом хранении характеристики CD44 в суспензии эритроцитов не менялись на протяжении 10 сут. В криоконсервированных эритроцитах отмечалось снижение количества CD44⁺-клеток и уровня экспрессии поверхностного маркера. Использование ПЭГ–1500 приводит к более выраженным изменениям характеристик CD44 в эритроцитах после размораживания в сравнении с глицеролом. Удаление криопротекторов и потеря части клеток в процессе отмывки вели к восстановлению характеристик CD44 в суспензии размороженных эритроцитов, которые успешно пережили стресс. Полученные результаты свидетельствуют, что в криоконсервированных эритроцитах выявленные изменения охватывают только часть клеток, и ассоциируются с нестабильностью популяции эритроцитов с измененными характеристиками CD44, поскольку после удаления криопротекторов с сопутствующим гемолизом нестабильных клеток, параметры CD44 в эритроцитарной суспензии восстанавливаются. Механизмы, лежащие в основе изменений параметров поверхностного маркера CD44 в размороженных эритроцитах, могут быть связаны с нарушением межмолекулярных взаимодействий в мембране под влиянием физико–химических факторов среды, и процессом везикуляции мембран с включением CD44 в состав везикул.

Ключевые слова: эритроцит; мембрана; CD44; замораживание; криопротектор; гипотермия.

N.G. Zemlianskykh, L.A. Babijchuk

CHANGES IN ERYTHROCYTE SURFACE MARKER CD44 DURING HYPOTHERMIC AND LOW TEMPERATURE STORAGE

We studied the changes in surface marker CD44 in erythrocytes, cryopreserved under the protection of glycerol and PEG–1500, or stored in hypothermic conditions. It was shown that during hypothermic storage the CD44 characteristics in erythrocyte suspension were unchanged within 10 days. In cryopreserved erythrocytes a reduction in CD44–positive cells and in the level of expression of the surface marker were marked. Using PEG–1500 resulted in more pronounced change in erythrocyte CD44 characteristics after freeze–thawing in comparison with glycerol. Removal of cryoprotectants and the loss of a part of cells during the washing process led to the restoration of the CD44 characteristics in freeze–thawed erythrocytes suspension which successfully survived after the stresses. The results indicate that revealed changes in cryopreserved erythrocytes cover only a part of the cells, and they are associated with the instability of the population of erythrocytes with altered CD44 characteristics wherethrough after the removal of cryoprotectants with concomitant hemolysis of unstable cells the CD44 parameters in erythrocyte suspensions recovered. The mechanisms underlying the changes in the parameters of the surface marker CD44 in freeze–thawed erythrocyte may

be related to the disruption of intermolecular interactions in the membrane under the influence of physical and chemical environmental factors, followed by the membrane vesiculation with the inclusion of the CD44 into the vesicles.

Key words: erythrocyte; membrane; CD44; freezing; cryoprotectant; hypothermia.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv.

REFERENCES

- Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A, Weiss A, Berman KC, Fibach E, Meyron–Holtz EerG. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica*. 2012;97(7):994–1002.
- Dinkla S, Novotný VM, Joosten I, Bosman GJ. Storage–induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. *PLoS One*. 2012;7(8):1–9.
- Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44 *Immunology*. 1998;93(2):139–148.
- Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*. 1997; 5(2): 57–71.
- Telen MJ, Udani M, Washington MK, Levesque MC, Lloyd E, Rao N. A blood group–related polymorphism of CD44 abolishes a hyaluronan–binding consensus sequence without preventing hyaluronan binding. *J Biol Chem*. 1996;271(12):7147–53.
- Xu Z, Duffett L, Tokessy M, Cote J, Goldman M, Sainenberg E. Anti–AnWj causing acute hemolytic transfusion reactions in a patient with aplastic anemia. *Transfusion*. 2012; 2(7):1476–81.
- Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol*. 2000;37(2):130–142.
- Hale LP, Singer KH, Haynes BF. CD44 antibody against In(Lu)–related p80, lymphocyte–homing receptor molecule inhibits the binding of human erythrocytes to T cells. *J Immunol*. 1989 143(12):3944–48.
- Funaro A, Spagnoli GC, Momo M, Knapp W, Malavasi F. Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte–function–associated antigen interactions and interleukin–2 production. *Hum Immunol*. 1994;40(4):267–78.
- van den Akker E, Satchwell TJ, Pellegrin S, Flatt JF, Maigre M, Daniels G, Delaunay J, Bruce LJ, Toye AM. Investigating the key membrane protein changes during in vitro erythropoiesis of protein 4.2(–) cells (mutations Chartres 1 and 2). *Haematologica*. 2010;95(8):1278–86.
- Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, Truijens–de Lange R, Stekkinger PS, Bakker JC, Lagerberg JW, Brand A, Verhoeven AJ. Stability after thawing of RBCs frozen with the high– and low–glycerol method. *Transfusion*. 2003;43(2):157–64.
- Stoll C, Holovati JL, Acker JP, Wolkers WF. Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch

- for cryopreservation of human erythrocytes. *Biotechnol Prog.* 2012;28(2):364–71.
13. Feuerecker M, Kaufmann I, Salam AP, Choukèr A. Effects of cryopreservation with polyethylene glycol on the expression of CD11b and CD62L on the surface of polymorphonuclear leukocytes. *Cryo Letters.* 2012;33(2):151–60.
14. Gabellieri E, Strambini GB. ANS fluorescence detects widespread perturbations of protein tertiary structure in ice. *Biophys J.* 2006;90(9):3239–45.
15. Wolkers WF, Balasubramanian SK, Ongstad EL, Zec HC, Bischof JC. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(3):728–36.
16. Celedón G, González G, Barrientos D, Pino J, Venegas F, Lissi EA, Soto C, Martínez D, Alvarez C, Lanio ME. Stycholysin II, a cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* promotes higher hemolysis in aged red blood cells. *Toxicon.* 2008;51(8):1383–90.
17. Iglic A, Veranic P, Jezernik K, Fosnaric M, Kamin B, Hägerstrand H, Kralj-Iglic V. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes *Bioelectrochemistry.* 2004;62(2):159–61.
18. Holovati JL, Wong KA, Webster JM, Acker JP. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. *Transfusion.* 2008;48(8):1658–68.
19. Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Döpp YA, Willekens FL, Werre JM. The proteome of erythrocyte– derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J Proteomics.* 2012;76(Spec.):203–10.
20. Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N. Regulation of CD44 – protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD44–ankyrin interaction. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30322–8.
21. Jeremy KP, Plummer ZE, Head DJ, Madgett TE, Sanders KL, Wallington A, Storry JR, Gilsanz F, Delaunay J, Avent N.D. 4.1R– deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins. *Haematologica.* 2009;94(10):1354–61.
22. Kofanova OA, Zemlyanskikh NG, Ivanova L, Bernhardt I. Changes in the intracellular Ca^{2+} content in human red blood cells in the presence of glycerol. *Bioelectrochemistry.* 2008;73(2):151–4.
23. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of Ca^{2+} influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG–1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh.* 2006;78(6):46–52. [Russian].
24. Zemlyanskikh NG, Kofanova OA. Modulation of human erythrocyte Ca^{2+} –ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. *Biochemistry (Moscow).* 2006;71(8):900–05.
25. Zemlianskykh NG, Khomenko MV. Human erythrocyte Ca^{2+} –ATPase activity in a hypertonic media at low and physiological temperature. *Biol Membrane.* 2006;23(№5):375–83. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 28.02.2015

Тривале обмеження калорійності харчового раціону попереджає вікові зміни вмісту біологічно активних сфінго- та гліцероліпідів у тканинах щурів

Н.О. Бабенко, Г. В. Стороженко

НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Харків;
e-mail: babenko@univer.kharkov.ua

Вивчали вікові особливості впливу калорійно обмеженої дієти на вміст біологічно активних сфінго- і гліцероліпідів у серці, печінці та мозку щурів 3- та 24-місячного віку. Калорійність раціону щурів дослідної групи протягом експерименту зберігали на рівні 20-30% від контрольної групи. Дієта щурів дослідної групи була повноцінна за складом мікроелементів, вітамінів і білків. Встановлено, що обмеження харчового раціону знижувало вміст церамиду, сфінгомієліну, кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в усіх тканинах щурів вже у віці 3 міс, що, певно, є наслідком пригнічення біосинтезу цих ліпідів через обмежене надходження жирних кислот з їжею. Водночас у тканинах 24-місячних тварин обмеження калорійності харчового раціону запобігало віковому накопиченню церамиду і фосфатидної кислоти, зростанню відношення церамід/сфінгомієлін та зниженню вмісту сфінгомієліну і кардіоліпіну, згладжуючи вікові розбіжності вмісту сфінго- та гліцероліпідів. Разом із тим встановлена тканинна специфічність ефектів калорійно обмеженої дієти. Так, у серці та печінці підвищувався вміст кардіоліпіну та знижувався фосфатидної кислоти порівняно з тваринами, які отримували стандартний раціон віварію. Тоді як у мозку калорійне обмеження харчового раціону мало протилежні ефекти. Наші результати дають змогу припустити, що зміни метаболізму таких сигнальних месенджерів, як церамід та фосфатидна кислота можуть попереджувати розвиток асоційованих з віком патологій цих органів в умовах калорійного обмеження харчового раціону. Ключові слова: старіння; калорійно обмежена дієта; церамід; сфінгомієлін; кардіоліпін; фосфатидна кислота.

ВСТУП

Вікові порушення метаболізму сфінголіпідів асоціюються з виникненням та розвитком цілої низки патологічних станів, які спостерігаються в пізньому онтогенезі: жирова дистрофія печінки, інсулінрезистентність, різні нефропатії, атеросклероз, синдром Альцгеймера тощо [1]. Відомо, що церамід, внутрішньоклітинний вміст якого зростає при старінні, має антипроліферативні властивості, модулює фосфорилювання різних білків та є індуктором апоптозу [2]. Показано його накопичення та підвищення співвідношення церамід/сфінгомієлін у клітинах старіючого організму [3–5].

© Н.О. Бабенко, Г. В. Стороженко

Крім того, церамід впливає на функції мітохондрій, пригнічуючи роботу респіраторного ланцюга, збільшуючи продукцію активних форм кисню та активуючи протеїн-фосфатазу PP2A, яка дефосфорилує та інактивує такі антиапоптотичні білки, як Bcl2 і Akt, що у свою чергу призводить до апоптозу [6]. Водночас зміни активності фосфатидилгліцерофосфатсинтази та фосфоліпази опосередковані накопиченням церамиду змінюють метаболізм кардіоліпіну [7] – фосфоліпиду, потрібного для функціонування мітохондрій і зв'язування в їх мембранах цитохрому C, 3 і 4 комплексів електронно-транспортного ланцюга [8, 9]. Показано, що зменшення вмісту кардіоліпіну,

як правило, поєднується зі зниженням інтенсивності електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Так, зменшення вмісту цього фосфоліпиду спостерігається при ішемії-реперфузії, гіпотиреозі, оксидативному стресі, серцевій недостатності й старінні [8] та може бути однією з ключових причин входження клітини в апоптоз, в той час як підтримка нормального вмісту кардіоліпіну має антиапоптотичні ефекти. Відомо, що біохімічні особливості тканини є основою її фізіологічної функції. Так, тканини головного мозку, які характеризуються високим вмістом і різноманіттям ліпідів, особливо чутливі до їх перебудов [10]. Водночас печінка відіграє ключову роль у ліпідному метаболізмі та є основним місцем утворення ліпопротеїдів і ліпідів [4, 11]. Крім того, серце характеризується підвищеним вмістом кардіоліпіну, зміна якого, як правило, пов'язана з розвитком асоційованих з віком патологій [8].

Враховуючи вікове накопичення кераміду і його ефекти на функції мітохондрій та метаболізм кардіоліпіну, важливим є дослідження моделей, що дають змогу коригувати вміст сфінго- і гліцероліпідів у клітинах і тканинах старіючого організму. Показано, що обмеження калорійності харчового раціону істотно впливає на розвиток вікової патології, знижуючи частоту виникнення діабету, нейродегенеративних та серцево-судинних захворювань [12] та пролонгує життя лабораторних тварин [13]. Однак механізми реалізації ефекту калорійного обмеження лишаються недостатньо з'ясованими. Припускається, що калорійно обмежена дієта впливає на функціональну активність мітохондрій, знижуючи окисне пошкодження, активацію апоптозу і вміст про-апоптотичних білків Bcl-XS/Bcl-XL, а також попереджає транслокацію Вах у мітохондрії і вивільнення цитохрому С до цитозолу [14, 15]. З іншого боку ефекти калорійно обмеженої дієти можуть реалізовуватися через зміну метаболізму

сфінголіпідів, знижуючи вміст кераміду в нирках мишей [16] і мозку щурів [5, 17].

Мета нашої роботи – вивчення вікових особливостей впливу калорійно обмеженої дієти на вміст біологічно активних сфінго- і гліцероліпідів та можливості корекції вікових змін їх вмісту у функціонально різних тканинах щурів.

МЕТОДИКА

Всі дослідження проводили з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Щурів-самців лінії Вістар віком 3 і 24 міс (контроль) утримували на стандартному раціоні віварію. Маса тіла 3-місячних щурів становила $172,44 \pm 6,16$ г, а 24-місячних – $445,14 \pm 11,89$ г. Дослідну групу тварин у віці 1 міс переводили на експериментальну калорійно обмежену дієту за Маккеєм–Нікітіним [13] до 3- або 24-місячного віку. Маса тіла 3-місячних тварин дослідної групи становила $87,20 \pm 3,14$ г, 24-місячних – $122,80 \pm 4,63$ г.

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Екстракцію ліпідів з тканин печінки, серця та мозку проводили за методом Bligh, Dyer [18]. Ліпіди фракціювали методом одномірної висхідної хроматографії у системах: діетиловий ефір (система 1) і хлороформ:метанол:вода (40:10:1 за об'ємом; система 2) для сфінголіпідів та хлороформ:метанол:оцтова кислота:вода (80:12:8:0,3, за об'ємом) – для кардіоліпіну та фосфатидної кислоти. Плями ліпідів проявляли в парах йоду та ідентифікували порівнянням зі стандартами: сфінгомієлін («Sigma», США), керамід («Sigma», США), кардіоліпін («Sigma», США) та фосфатидна кислота («Sigma», США). Кількісний вміст фосфоліпідів у хроматографічних фракціях визначали за

неорганічним фосфором [19], вміст кераміду – за методом, описаним раніше [3], вміст білка в пробах – за методом Lowry [20]. Для порівняння значень вмісту ліпідів контрольної та дослідних груп використовували однофакторний дисперсійний аналіз one-way Anova, за критерієм Фішера, та для порівняння вмісту білка в дослідних групах – критерій *t* Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спостерігали вікове збільшення вмісту кераміду і зменшення вмісту сфінгомеліну у всіх вивчених тканинах 24-місячних щурів, які отримували їжу *ad libitum*. Відомо, що в клітині керамід синтезується із пальмітоіл-КоА та серину за участю серинпальмітоїлтрансферази та керамідсинтази. Крім того, на вміст кераміду у клітинах різних тканин значно впливає активність сфінгомеліназ – ферментів які піддають гідролізу мембранний сфінгомелін. Надалі керамід під дією керамідаз перетворюється на сфінгозин, що фосфорилується сфінго-

зинкіназами до сфінгозин-1-фосфату. Деякі дослідники вказують на вікове підвищення активності кислих сфінгомеліназ у печінці [4] і нейтральних сфінгомеліназ у гіпокампі та корі головного мозку старих щурів [5]. Водночас показано можливість модуляції підвищеного з віком вмісту кераміду і його метаболітів обмеженням калорійності харчового раціону [16,5]. У нашій роботі в серці, печінці та мозку 3-місячних щурів, яких з 1-місячного віку перевели на низькокалорійну дієту спостерігалось зниження вмісту кераміду і сфінгомеліну порівняно зі значеннями цих ліпідів у контрольних 3-місячних щурів (див. рис. 1, а, б). Подібне зниження вмісту кераміду та сфінгомеліну може бути пов'язано зі зменшенням їх синтезу *de novo* внаслідок дефіциту насичених жирних кислот харчового раціону, які є попередниками в синтезі сфінголіпідів. Тривале утримання тварин на калорійно обмеженій дієті до 24-місячного віку збільшувало вміст сфінгомеліну (див. рис. 1. б) та зберігало вміст кераміду на рівні 3-місячних тварин, які отримували калорійно обмежену дієту (див. рис. 1, а). Причому вміст сфінгомеліну у старих тварин, які

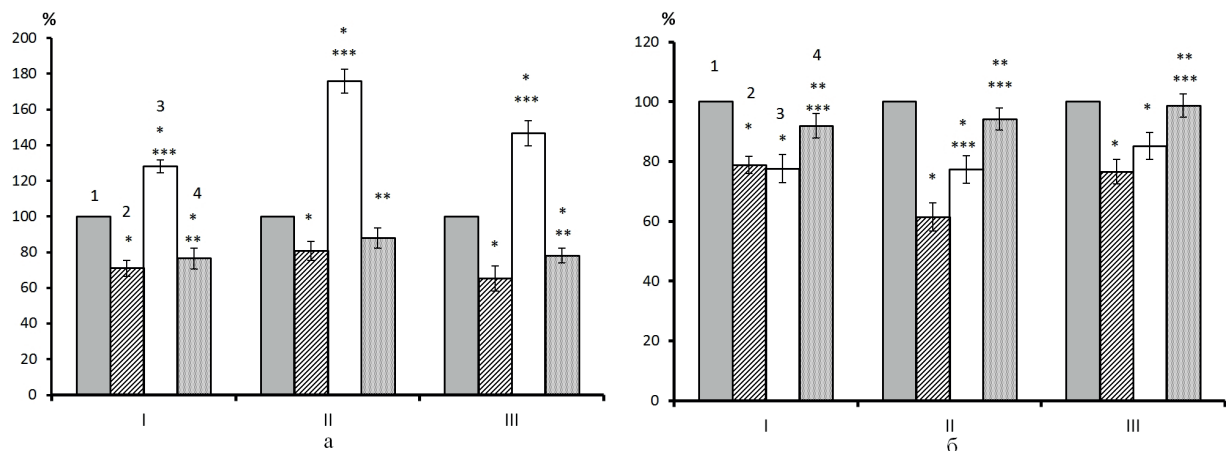


Рис. 1. Вплив калорійного обмеження харчового раціону на вміст кераміду (а) та сфінгомеліну (б) у тканинах щурів різного віку: 1 – інтактні 3-місячні щури, 2 – 3-місячні щури, що перебувають на калорійно обмеженій дієті, 3 – інтактні 24-місячні щури, 4 – 24-місячні щури, що перебувають на калорійно обмеженій дієті; I – серце, II – печінка, III – кора півкуль головного мозку. * $P < 0,05$ порівняно з інтактними 3-місячними щурами, ** $P < 0,05$ порівняно з інтактними 24-місячними щурами, *** $P < 0,05$ порівняно з 3-місячними щурами, які отримували калорійно обмежену дієту. Результати представлені у відсотках від значень 3-місячних щурів

отримували калорійно обмежену дієту, відновлювався до рівня інтактних 3-місячних щурів у всіх досліджених органах (див. рис. 1, б). Враховуючи те, що в нирках мишей [16] і мозку щурів [5] калорійно обмежена дієта пригнічувала підвищену з віком активність церамідсинтази і сфінгомеліназ, можна припустити, що в нашій роботі модуляція вмісту сфінголіпідів за його допомогою також пов'язана зі зменшенням активності цих ферментів в серці, печінці та мозку.

Зміщення балансу в метаболізмі сфінголіпідів у бік утворення цераміду може призводити до індукції апоптозу кластеризацією мембранних рецепторів, задіяних у передачі апоптотичних сигналів [2] або завдяки утворенню пор у мітохондріях внаслідок активації каспаз церамідом [2, 6]. Водночас зниження співвідношення церамід/сфінгомелінін підвищує життєздатність клітин і зменшує їх чутливість до сигналів апоптозу. У нашій роботі воно збільшувалося з віком у печінці, серці і мозку щурів, які отримували стандартну дієту віварію (див. рис. 2). Ці результати добре узгоджуються з даними, отриманими раніше [3–5], та свідчать про активацію сфінгомеліназ, які гідролізують сфінгомелінін до цераміду в клітинах старих щурів. Разом з тим калорійне обмеження протягом життя 24-місячних щурів попереджало зміни балансу церамід/сфінгомелінін у серці і мозку, і знижувало це співвідношення в печінці щурів порівняно з молодими тваринами, які отримували калорійно обмежену дієту (див. рис. 2). Вочевидь, калорійно обмежена дієта модулює активність сфінгомеліназ в тканинах старих щурів, що підтверджується зростанням вмісту сфінгомелініну в серці, печінці та мозку 24-місячних щурів, які отримували калорійно обмежену дієту.

Збільшення цераміду у плазматичної мембрані може посилювати сигнал смерті, впливаючи на зміну співвідношення про- та антиапоптотичних білків сімейства Bcl-2 на зовнішній мембрані мітохондрій [1,

2]. Крім того, церамід пригнічує дихальну активність респіраторного ланцюга і регулює проникність мітохондріальної пори і зовнішньої мембрани мітохондрій для цитохрому C, діючи самостійно або разом з білком Вах [1,2]. Водночас зниження продукції АТФ і активності електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, як правило, характеризується зниженням рівня кардіоліпіну – фосфоліпиду, розташованого виключно на внутрішній мембрані мітохондрій і що бере участь у стабілізації мембран та біоенергетиці цих органел [8]. Встановлене в нашій роботі зниження вмісту кардіоліпіну і фосфатидної кислоти у серці, печінці та мозку 3-місячних щурів, з 1-місячного віку переведених на калорійно обмежену дієту порівняно з інтактними 3-місячними тваринами (див. рис. 3) може спостерігатися внаслідок уповільнення метаболічних процесів і адаптації організму до обмеження калорійності харчового раціону. Слід зазначити, що вміст кардіоліпіну в серці і печінці старих щурів, яких утримували на калорійно обмеженій дієті, відповідав такому у ін-

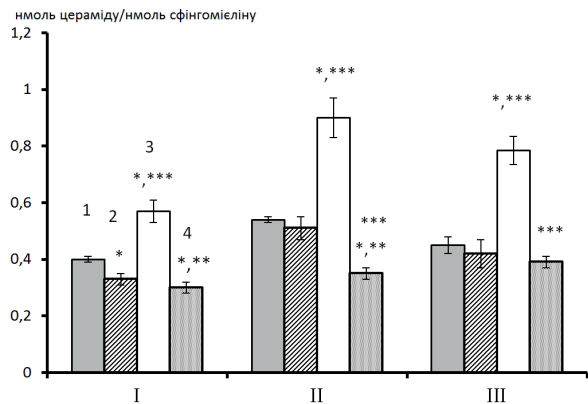


Рис. 2. Вплив калорійно обмеженої дієти на відношення церамід/сфінгомелінін у різних тканинах 3- та 24-місячних щурів. I – серце, II – печінка, III – кора півкуль головного мозку; 1 – інтактні 3-місячні щури, 2 – 3-місячні на калорійно обмеженій дієті, 3 – інтактні 24-місячні щури, 4 – 24-місячні на калорійно обмеженій дієті. * $P<0,05$ щодо значень інтактних 3-місячних щурів, ** $P<0,01$ порівняно з групою інтактних 24-місячних щурів, *** $P<0,001$ щодо 3-місячних щурів, які отримували калорійно обмежену дієту

тактних молодих щурів, тоді як у тканинах старих щурів, які отримували стандартну дієту, спостерігалось значне зниження вмісту кардіоліпіну (див. рис. 3, а). Однак у мозку цей показник з віком не змінювався як у тварин, які отримували калорійно обмежену дієту, так і у щурів на стандартному раціоні (див. рис. 3, а). Відомо, що основною причиною зниження кардіоліпіну є посилення його деградації (гідроліз фосфоліпазами), пригнічення синтезу *de novo* в результаті порушення роботи ферментів, що беруть участь у його біосинтезі або зниження біодоступності прекурсорів. Водночас вікове збільшення вмісту кераміду може безпосередньо впливати на вміст кардіоліпіну, модулюючи фосфатидилгліцерофосфатсинтазу, яка є ключовим ферментом в синтезі кардіоліпіну [7] або підвищуючи активність фосфоліпази А2 і продукцію активних форм кисню, які посилюють деградацію кардіоліпіну [7]. Таким чином, можна припустити, що спостережуване зниження вмісту кардіоліпіну в серці і печінці старих тварин (див. рис. 3, а) може бути опосередковано зростанням вмісту кераміду в цих тканинах, тоді як калорійно обмежена дієта попереджає накопичення кераміду в серці і печінці щурів з віком

(див. рис. 2, а) і збільшує вміст кардіоліпіну до рівня молодих інтактних тварин. Відомо, що фосфатидна кислота модулює активність таких ферментів, як фосфоліпаза С, протеїнкінзи, АМФ-циклічнафосфодіестераза, білок Ras, протеїнтирозинфосфатаза 1 [21]. Відмічають, що фосфатидна кислота і керамід здійснюють протилежні ефекти на такі процеси в клітинах як проліферація, активація протеїнкінз, активація НАДФН оксидази і активність протеїнфосфатази 1 [22]. У нашій роботі фосфатидна кислота, яка є прекурсором у синтезі фосфоліпідів і кардіоліпіну, накопичувалась у печінці (див. рис. 3, б) і знижувалась у мозку (див. рис. 3, б) старих 24-місячних щурів, які отримували їжу без обмежень. Відомо, що фосфатидна кислота, яка синтезується з гліцерол-3-фосфату та ацил-S-CoA, надалі бере участь у синтезі фосфоліпідів, або тріацилгліцеролів. Розподіл фосфатидної кислоти між цими двома шляхами має важливе значення в регуляції синтезу ліпідів. Фосфоліпіди утворюються за розгалуженим біосинтетичним шляхом, що починається з фосфатидної кислоти і збільшення її вмісту в печінці при старінні може свідчити або про пригнічення її використання в синтезі

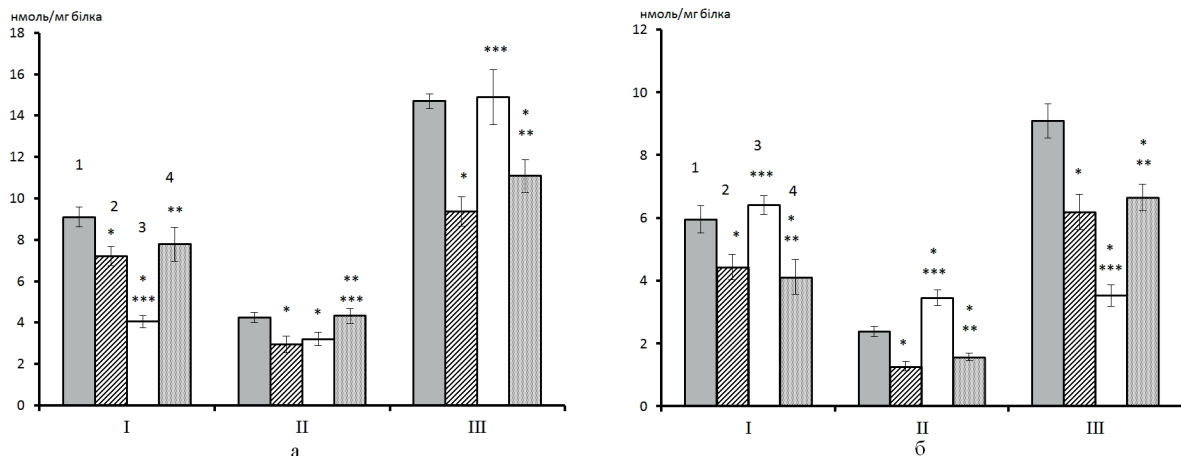


Рис. 3. Вплив калорійно обмеженої дієти на вміст кардіоліпіну (а) і фосфатидної кислоти (б) у тканинах щурів. 1 – інтактні 3-місячні щури, 2 – 3-місячні на калорійно обмеженій дієті, 3 – інтактні 24-місячні щури, 4 – 24-місячні на калорійно обмеженій дієті; I – серце, II – печінка, III – кора півкуль головного мозку. * $P<0,05$ порівняно з групою інтактних 3-місячних щурів, ** $P<0,05$ порівняно з групою інтактних 24-місячних щурів, *** $P<0,05$ щодо 3-місячних щурів, які отримували калорійно обмежену дієту

фосфоліпідів та тригліцеридів або за рахунок активації фосфоліпази Д. Нами встановлено, що вміст фосфатидної кислоти в серці та печінці старих щурів (див. рис. 3, б), які отримували калорійно обмежену дієту, нижче відносно такого в 24-місячних щурів, що знаходилися на стандартному раціоні. Беручи до уваги зростання вмісту кардіоліпіну в цих умовах, можна припустити що калорійно обмежена дієта призводила до активації шляхів синтезу фосфоліпиду з фосфатидної кислоти. Однак у мозку старих щурів, які її отримували, спостерігалось зниження вмісту фосфатидної кислоти та кардіоліпіну порівняно з контролем (див. рис. 3, а, б), що передбачає спрямування фосфатидної кислоти на шляхи синтезу нейтральних ліпідів. Раніше було показано, що калорійне обмеження харчового раціону призводить до збільшення вмісту тріацилгліцеролів в головному мозку 24-місячних щурів, тоді як вміст фосфоліпідів лишається незмінним, що передбачає використання фосфатидної кислоти переважно в синтезі тріацилгліцеролів [22].

Таким чином, у нашій роботі встановлені тканинно-специфічні та вікові особливості дії калорійно обмеженої дієти на вміст біологічно активних ліпідів у тканинах щурів. Так, калорійно обмежена дієта у тканинах щурів 3-місячного віку знижувала вміст цераміду, сфінгомієліну, кардіоліпіну та фосфатидної кислоти, що може бути наслідком обмеженого надходження жирних кислот з їжею. Водночас тривале обмеження калорійності харчового раціону знижувало підвищений вміст цераміду та фосфатидної кислоти і відновлювало рівень сфінгомієліну та кардіоліпіну в серці та печінці 24-місячних щурів порівняно зі старими тваринами, що отримували стандартний раціон віварію. Подібні зміни вмісту сфінголіпідів можуть бути зумовлені модуляцією сфінгомієліназової активності під дією факторів дієти. У мозку 24-місячних тварин обмеження калорійності харчового раціону знижувало

вміст кардіоліпіну та підвищувало вміст фосфатидної кислоти, відносно вмісту цих ліпідів в мозку старих щурів, які отримували їжу без обмежень. Враховуючи, те, що церамід значно впливає на метаболізм кардіоліпіну і фосфатидної кислоти [7], можна припустити, що калорійно обмежена дієта, перешкоджаючи накопиченню цераміду в клітинах різних органів, з віком сприяє відновленню вмісту мітохондріального ліпиду кардіоліпіну і таким чином згладжує суттєві вікові зміни вмісту фосфоліпиду, що у свою чергу може бути важливою причиною відновлення функцій мітохондрій в старості [9].

Н.А. Бабенко, Г. В. Стороженко

ДЛИТЕЛЬНОЕ ОГРАНИЧЕНИЕ КАЛОРИЙНОСТИ ПИЩЕВОГО РАЦИОНА ПРЕДУПРЕЖДАЕТ ВОЗРАСТНЫЕ НАРУШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СФИНГО- И ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ В ТКАНЯХ КРЫС

Изучали возрастные особенности влияния калорийноограниченной диеты на содержание биологически активных сфинго- и глицеролипидов в сердце, печени и мозгу 3- и 24-месячных крыс. Калорийность рациона крыс опытной группы в течение всего эксперимента сохраняли на уровне 20-30% от контрольной группы. Диета животных опытной группы была полноценной по составу микроэлементов, витаминов и белков. Установлено, что ограничение пищевого рациона приводило к снижению содержания церамида, сфингомиелина, кардиолипина и фосфатидной кислоты во всех изученных тканях крыс в возрасте 3 мес, что, вероятно, является следствием подавления биосинтеза этих липидов в результате сниженного поступления жирных кислот с пищей. В то же время в тканях 24-месячных животных ограничение калорийности пищевого рациона предупреждало возрастное накопление церамида и фосфатидной кислоты, увеличение соотношения церамид/сфингомиелин и снижение содержания сфингомиелина и кардиолипина, сглаживая возрастные различия содержания сфинго- и глицеролипидов. Кроме того, установлена тканевая специфичность эффектов калорийно ограниченной диеты. Так в сердце и печени наблюдалось повышение содержания кардиолипина и снижение содержания фосфатидной кислоты по сравнению с животными, которые получали стандартный рацион вивария. Тогда как в мозгу ограничение калорийности пищевого рациона оказывало противоположные эффекты. Полученные результаты позволяют предположить, что изменения

метаболизма таких сигнальных мессенджеров, как церамид и фосфатидная кислота может предупреждать развитие ассоциированных с возрастом патологий в условиях калорийного ограничения пищевого рациона.
Ключевые слова: старение; калорийно ограниченная диета; церамид; сфингомиелин; кардиолипин; фосфатидная кислота.

N.A. Babenko, G.V. Storozhenko

LONG-TERM FOOD RESTRICTION PREVENTS THE AGE-RELATED CHANGES OF THE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SPHINGO- AND GLYCEROLIPIDS CONTENTS IN THE RAT TISSUES.

Age peculiarities of the calorie-restricted diet effects on the contents biologically active sphingo- and glycerolipids were studied in the heart, liver and brain of 3- and 24-month-old rats. Rats were either kept on the ad libitum diet or on a calorie restricted diet (70-80% reduction in total calories) without reduction in essential nutrients. It has been determined that calorie restricted diet decreased the ceramide, sphingomyelin, cardiolipin and phosphatidic acid levels in the all investigated tissues of the rats. At the same time, calorie restriction diet prevented the age-induced ceramide and phosphatidic acid accumulation, ceramide/sphingomyelin ratio elevation, and sphingomyelin and cardiolipin content decrease in the tissues of 24-month-old rats. In addition, tissue specificity of calorie-restricted diet effects has been determined. The Elevated levels of cardiolipin and phosphatidic acid were determined in the heart and liver of 24 months-old rats under calorie-restricted diet, in comparison to control animals, whereas in the brain the caloric restriction diet had the opposite effects. These results suggest that calorie-restricted diet may prevent the development of age-associated pathologies due to the modulation of biologically active lipid turnover in the old tissues.
Keywords: aging; calorie restricted diet; ceramide; sphingomyelin; cardiolipin; phosphatidic acid.

Research Institute of Biology of the V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

REFERENCES

1. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2):139-50.
2. Tirodkar TS, Voelkel-Johnson C. Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol.* 2012; 34(3):231-42.
3. Babenko NA, Kharchenko VS. Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. *Biochemistry (Moscow).* 2012; 77(2):180-6.
4. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. *Exp Gerontol.* 2006; 41(1):32-39.
5. Babenko NA, Shakhova EG. Long-term food restriction

- prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain. *Arch Gerontol Geriatr.* 2014; 58(3):420-6.
6. Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res.* 2008; 49:625-34.
7. Xu FY, Kelly SL, Hatch GM. N-Acetylsphingosine stimulates phosphatidylglycerolphosphate synthase activity in H9c2 cardiac cells. *Biochem J.* 1999; 337:483-90.
8. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292:C33-C44.
9. Claypool SM. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788:2059-68.
10. Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2005; 102(31):10858-63.
11. Babenko NA, Nikitin VN. Age peculiarities of the periodical calory-insufficient nutrition influence on the lipid composition of liver, small intestine, adipose tissue cells and blood serum in white rats. *Fiziol Zh.* 1990; 36(1):60-5. [Russian].
12. Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS letters.* 2011; 585(11):1537-42.
13. Nikitin VN. 1984. Experimental approaches to prolongation of life. In NM Emanuel, TL Nadzharyan (Eds.). *Itogi Nauki Tekhniki. Common problems of biology.* Moscow: VINITI. P. 6-43. [Russian].
14. Niemann B, Chen Y, Issa H, Silber RE, Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. *Cardiovasc Res.* 2010; 88(2):267-76.
15. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochem Biophys Acta.* 2006; 1757:496-508.
16. Hernandez-Corbacho MJ, Jenkins RW, Clarke CJ, Hannun YA, Obeid LM, Snider AJ, Siskind LJ. Accumulation of long-chain glycosphingolipids during aging is prevented by caloric restriction. *PLoS One.* 2011; 6(6):e20411.
17. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of a calorie-restricted diet on the content of phospholipids in the brain and cognitive functions in rats. *Neurophysiology.* 2012; 44(3):201-7.
18. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8):911-7.
19. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959; 234:466-8.
20. Lowry ON, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.
21. English D, Cui Y, Siddiqui RA. Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem Phys Lipids.* 1996; 80(1-2):117-132.
22. Babenko NA, Basanets LM, Ezhova OA. Age peculiarities of changes in lung, heart and brain lipids of albino rats under the effect of dietary factors. *Fiziol Zh.* 1990; 36(6):59-63. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 30.03.2015

Безпечні та критичні рівні фізичних навантажень для тренуваних та нетренуваних осіб в умовах м'язової діяльності силової спрямованості

А.А. Чернозуб

Чорноморський державний університет ім. Петра Могили, Миколаїв; chernozub@gmail.com

Досліджували проблему пошуку оптимальної методики визначення безпечних і критичних режимів навантаження для організму тренуваних та нетренуваних людей у процесі занять силовим фітнесом. Встановлено, що для тренуваних людей, які мають достатній рівень адаптації організму до силових навантажень, використання «стандартних» режимів роботи в процесі занять силовим фітнесом є безпечним. Однак проблемним питанням є те, що для нетренованого контингенту, майже неможливо визначити безпечні параметри навантаження використовуючи загальноприйняті методики, які переважно застосовуються в циклічних видах спорту. Так, вирішення цієї проблеми полягає в тому, що використовуючи інтегральний метод оцінки силових навантажень та комп'ютерну програму для визначення відносної маси обтяження, були розраховані безпечні та критичні показники навантаження для нетренуваних осіб. При цьому досліджувані біохімічні показники крові (концентрації тестостерону, кортизолу та активності лактатдегідрогенази) фіксовані після тренування порівняно зі станом спокою досить чітко підтверджували наші розрахунки.

Ключові слова: безпечні та критичні навантаження; інтегральний метод визначення навантаження; концентрація кортизолу та тестостерону в сироватці крові людини; активність лактатдегідрогенази; тренувані та нетренувані особи.

ВСТУП

У сучасній літературі широко представлено дані досліджень, які свідчать про досить поглиблене вивчення проблеми процесів адаптації організму людини до фізичних навантажень. Однак більшість з них присвячена вивченню механізмів адаптації в професійному спорті, особливо в циклічних його видах (плавання, легка атлетика). При цьому, незважаючи на світову популяризацію занять силовим фітнесом, що обґрунтовано можливістю всім без винятку верствам населення використовувати цей вид рухової активності для фізичного розвитку та оздоровлення їх організму в цілому, наукові дослідження щодо вивчення особливостей адаптаційно-компенсаторних реакцій в таких умовах м'язової діяльності, а найголовніше для розробки найбільш безпечних та ефек-

тивних режимів роботи – практично відсутні [1-4].

Значні фізичні навантаження, особливо при їх тривалій дії, спричиняють помітні морфофункціональні зрушення в організмі людини. Найчастіше вони трапляються на початкових етапах навантажень, які проводяться за умов невідповідності можливостей організму рівням пропонованих тренувальних програм. Запобігання розвитку цих явищ передбачає системне вивчення адаптаційно-компенсаторних реакцій організму на силові навантаження, що виникають в умовах тривалої рухової активності різної спрямованості [5-7].

Виходячи з вищевикладеного, можна стверджувати, що однією з основних проблем сучасної системи фізичної підготовки силової спрямованості є відсутність ефективних методів кількісної оцінки навантаження,

вирішення якої дасть змогу диференційовано, залежно від умов м'язової діяльності та рівня тренуваності людини, розробити найбільш оптимальні та безпечні режими тренувальної роботи для досягнення високого рівня адаптаційних змін організму.

Мета нашої роботи – визначити безпечні та критичні показники фізичних навантажень для тренуваних та нетренуваних осіб в умовах м'язової діяльності силової спрямованості різного обсягу та інтенсивності.

МЕТОДИКА

Обстежено 2 групи юнаків (по 40 у кожній) віком від 20 до 21 року. Першу контрольну групу склали особи, які протягом останніх 3 років займалися силовим фітнесом і мали достатній рівень адаптації до тренувальних навантажень у режимі середньої інтенсивності та великого обсягу роботи ($R_a=0,64$ ум.од.), другу – здорові за критерієм ВООЗ нетреновані молоді люди.

У процесі досліджень фіксували індивідуальні значення реалізованих фізичних навантажень спочатку у тренуваних осіб. Їх контролювали для встановлення декількох сигнальних показників функціонування організму, придатних для оцінки безпечності реалізованих м'язових напружень. Контроль складався з двох етапів – перший передбачав фіксацію комплексу показників до навантаження (у стані спокою), другий – безпосередньо після виконання тренувального заняття. По суті показники другого етапу давали можливість виявити адекватність рівня фізичних навантажень у різних режимах тренувальної роботи функціональним можливостям досліджуваного контингенту.

Використовуючи інтегральний метод оцінки силових навантажень [8] та комп'ютерну програму для визначення відносної маси обтяження [9], розраховували безпечні та критичні показники навантаження для нетренуваних осіб. Дослідження були заплановані в такій послідовності: формування

групи → первинне тестування учасників (у стані спокою) → реалізація фізичних навантажень → вторинний комплекс контролю після тренувального заняття. Контролем були результати групи тренуваного контингенту (40 осіб).

Для проведення вказаних досліджень було сформовано із числа учасників дослідної групи нетренуваного контингенту дві підгрупи (I і II) по 20 осіб у кожній. Їм було запропоновано два варіанти обсягів фізичних навантажень, вищі за оптимальні, які встановлено в попередніх дослідженнях аналогічного контингенту. При цьому обсяг навантажень збільшували не за рахунок маси снаряду, а завдяки змінам темпу виконання вправ та кількості повторень під час проведення тренувальних занять, що також впливало і на інтенсивність роботи.

Для вирішення проблеми об'єктивної, диференційної оцінки впливу різних за показниками обсягу та інтенсивності режимів роботи, в умовах м'язової діяльності різної спрямованості, на організм людини та визначення адекватності подібних силових навантажень її функціональним можливостям, використовували біохімічні методи дослідження. Так, активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) у сироватці крові визначали кінетичним методом на обладнанні фірми «High Technology Inc» (США) [10], а концентрацію тестостерону та кортизолу методом імуноферментного аналізу [11, 12].

Математичну обробку цифрових результатів досліджень проводили за допомогою програмного забезпечення пакетів Microsoft Excel 2010 та IBM SPSS Statistics 20 з використання загальноприйнятих методів щодо статистичних узагальнень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи те, що для спортивної практики ключове значення має саме розвиток максимальної м'язової сили людини та обхватних розмірів її тіла, яке вимагає відповідної ак-

тивної тренувальної стимуляції з постійним збільшенням навантажень (за рахунок обсягу чи інтенсивності), ми визначали критичні межі максимально безпечного рівня робочих навантажень, які можна пропонувати для виконання нетренованим контингентом.

Указана задача в силовому фітнесі завжди була проблемна через реальну загрозу перенавантажень і на практиці вирішувалася по суті методом «проб і помилок», що не сприйнятливий при роботі з нетренованим контингентом, який тренується виключно для досягнення оздоровчого ефекту. Відповідно суть нашого дослідження полягала в застосуванні найбільш ефективних обсягів навантажень, обмеженням для яких є критично високі (на межі норми) значення контрольних показників стану організму.

Принципи та конкретні показники розрахунку вказаних обсягів фізичного навантаження для основних груп відображені на рисунку. Згідно з цією схемою, визначення кількісних значень силового навантаження при тренувальному занятті є прямо залежним від: а) первинних результатів, фіксованих у тренуваних та нетренуваних юнаків; б) змін компонентів силових вправ, які регулюють режим тренувальної роботи; в) підвищення рівня інтенсивності або обсягу фізичного навантаження при тренувальному занятті. Базовою умовою реалізації вказаної схеми є триразова перевірка безпечності тренувальних навантажень, які контролювали відносно аналогічних показників, фіксованих у: а) тренуваних осіб з трирічним досвідом занять силовим фітнесом; б) нетренуваних юнаків; в) за показниками функціонування організму в стані м'язового напруження.

Безпосередньо під час досліджень контролювали комплексом тестових показників: фізичні навантаження та біохімічні показники. Останні дали змогу не допустити перенавантаження учасників досліджень та чітко встановити безпечні межі – індивідуальні та середньогрупові обсяги фізичного навантаження для нетренованого контин-

генту, саме для якого і було виконано цю серію досліджень. У цьому разі як критичні, фіксували ті обсяги навантажень, при яких хоча б один із числа комплексних показників (реєстрованих відразу після тренувального заняття) стану організму сягав верхніх меж норми.

Результати досліджень щодо встановлення біохімічних показників стану організму тренуваних осіб в умовах «стандартного» режиму тренувальної роботи ($Ra=0,64$ ум. од.) вірогідно свідчать про безпечність реалізованих учасниками дослідження тренувальних обсягів фізичних навантажень та їх адекватність компенсаторним можливостям організму. Концентрації тестостерону, кортизолу та активність ЛДГ у сироватці крові у межах групи демонструють певну амплітуду (від 4,4 до 20,1%) відхилень від середньогрупового рівня як у стані спокою, так і після навантаження, але в жодному разі вони не виходили за критичні межі норми (таблиця).

Отримані під час попереднього дослідження безпечні обсяги силових навантажень встановлені на тренуваних учасниках і, звичайно, в подібних розмірах непридатні для застосування на нетренованому контингенті. Відповідно ці показники важливі лише як первинні, орієнтуючись на які можна застосовувати як стартові цілком безпечні рівні фізичного навантаження для нетренованого контингенту. Так, вони були використані при створенні авторської комп'ютерної програми для індивідуального визначення режимів та рівня силового навантаження в фітнесі [9].

Отримані результати щодо перевірки рівня розвитку максимальної м'язової сили юнаків без тренувального досвіду в цілому мали прогнозований характер, відповідаючи сучасному досвіду тренувальної роботи в силовому фітнесі. За умови відносної оцінки останніх на межі «слабких – потужних», самі силові показники втрачали значення критерію та виступали як самостійні, малоінформативні компоненти оцінки мож-

**Зміни біохімічних показників крові в умовах різних режимів силового навантаження на початку досліджень
($M \pm m$, $n=40$)**

Режим силового навантаження	Етапи контролю					
	До навантаження			Після навантаження		
	Кортизол, нмоль/л	Тесто- стерон, нмоль/л	Лактатде- гідрогеназа, од/л	Кортизол, нмоль/л	Тестостерон, нмоль/л	Лактатдегідро- геназа, од/л

Група тренуваних осіб

Середньої
інтенсивності
та великого
обсягу роботи
($R_a=0,64$,
ум.од.)

255,45±4,17 9,49±0,24 353,40±9,49 303,39±8,65* 11,40±0,16* 338,20±3,66

Група нетрениваних осіб ($n=40$)

Середньої
інтенсивності
та великого
обсягу роботи
($R_a=0,64$
ум.од.)

398,86±16,27 15,98±0,43 368,32±4,89 364,84±14,61* 14,19±0,26* 376,65±11,09

I підгрупа нетрениваних осіб ($n=20$)

Низької
інтенсивності
та великого
обсягу роботи
($R_a=0,67$
ум.од.)

391,74±14,78 15,34±0,46 359,76±7,92 224,01±9,35* 16,77±0,21* 420,71±10,77*

II підгрупа нетрениваних осіб ($n=20$)

Високої
інтенсивності
та малого
обсягу роботи
($R_a=0,71$
ум.од.)

393,22±15,31 14,79±0,35 362,51±6,54 294,42±10,11* 17,55±0,28* 382,41±7,23*

* $P < 0,05$ порівняно зі станом спокою (до навантаження).

ливостей організму. Орієнтація на них не підкріплена «прямими» показниками стану організму, що на практиці часто призводить до розвитку перенавантаження та прояву патологічних змін.

Біохімічні показники в організмі групи нетренованого контингенту в умовах використання режиму навантаження середньої інтенсивності та великого обсягу роботи ($R_a=0,64$ ум.од.) не виходять за межі нор-

ми (див. таблицю). Встановлені значення концентрації кортизолу, тестостерону та активності ЛДГ у сироватці крові можна використовувати як орієнтовну норму при порівняльних оцінках аналогічних функціональних станів (спокою та гострого м'язового напруження) для фізично розвинених і здорових юнаків віком від 20 до 21 років без попередньої тренувальної адаптації до силових навантажень.

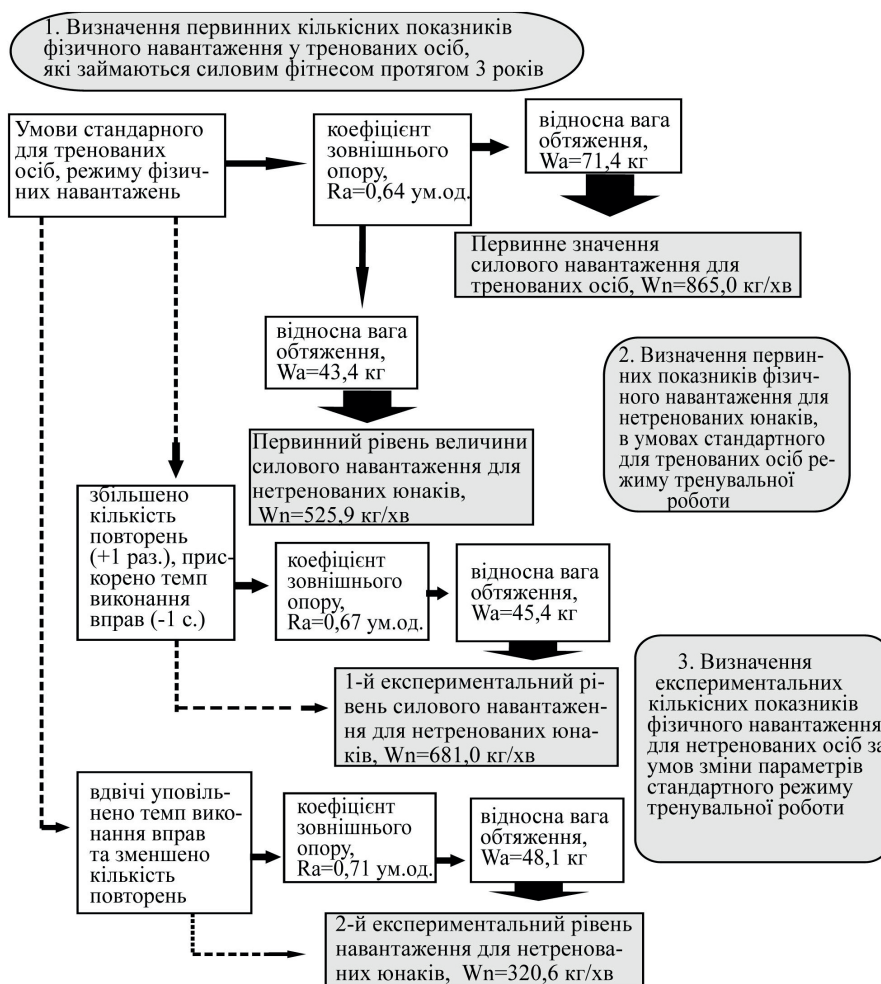


Схема визначення максимально критичного рівня фізичного навантаження при різних режимах тренувальної роботи та рівня тренуваності

Враховуючи, що для практики силового фітнесу ключове значення має саме розвиток м'язової сили та обхватних розмірів тіла людини, який вимагає відповідної активної тренувальної стимуляції з постійним збільшенням навантажень (за рахунок обсягу чи інтенсивності), наступним завданням стало визначення критичних меж максимально безпечного рівня робочих навантажень, які можливо пропонувати для виконання нетренованим контингентом.

Дослідження безпосередньо контролювали за звичайним комплексом тестових показників (кількісні значення навантажень

та результати біохімічного контролю). Останні дали змогу забезпечити учасників досліджень від перенавантажень та чітко встановити безпечні межі (індивідуальні та середньогрупові) обсягів фізичного навантаження для нетренованого контингенту. При цьому як критичні фіксували ті обсяги навантажень, при яких хоча б один із числа комплексних показників (зареєстрованих відразу після тренувального заняття) сягав верхніх меж норми (див. таблицю).

Встановлено, що у нетренованих юнаків I підгрупи у разі зміни режиму тренувальної роботи суттєво збільшились обсяги

навантаження на 29,5% ($P < 0,05$) порівняно з первинними результатами, які було визначено безпечними для цього контингенту в попередньому дослідженні. У II підгрупі, навпаки – за рахунок підвищення інтенсивності на 10,9% ($P < 0,05$), обсяг виконаної роботи зменшується на 39,0% ($P < 0,05$) щодо первинних значень.

Результати біохімічного аналізу крові нетренираних юнаків обох підгруп, фіксовані після тренувального заняття, демонструють значні зміни (від +11,7 до -38,6%; $P < 0,05$) контрольних значень порівняно з результатами попередніх досліджень (див. таблицю). Встановлено, що в умовах підвищення інтенсивності навантаження, контрольовані біохімічні показники залишаються в межах норми. При цьому при збільшенні обсягу роботи порівняно з режимом середньої інтенсивності фіксували підвищення активності ЛДГ щодо стану спокою, практично до верхніх меж норми. Це вказує на передчасний початок процесів гліколізу і дає змогу зробити припущення про різке підвищення енерговитрат в умовах тривалого застосування цих навантажень і можливого виникнення стану перетренованості.

Отже, враховуючи особливості зміни досліджуваних біохімічних показників крові в умовах гострого силового навантаження, було визначено кількісні показники, які демонструють безпечні (індекс тренувального навантаження – $ITNA < 0,85$) та критичні ($ITNA > 0,91$) рівні силових навантажень для людей різного рівня тренованості.

А.А. Чернозуб

БЕЗОПАСНЫЕ И КРИТИЧЕСКИЕ УРОВНИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК ДЛЯ ТРЕНИРОВАННЫХ И НЕТРЕНИРОВАННЫХ ЛИЦ В УСЛОВИЯХ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СИЛОВОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

В работе исследовали проблему поиска оптимальной методики определения безопасных и критических режимов нагрузки для организма тренированных и нетренированных людей в процессе занятий силовым

фитнесом. Установлено, что для тренированных людей, которые имеют достаточный уровень адаптации организма к силовым нагрузкам, использование «стандартных» режимов работы в процессе занятий силовым фитнесом безопасно. Однако проблемным вопросом является то, что для нетренированного контингента, почти невозможно определить безопасные параметры нагрузки, используя общепринятые методики (в основном в циклических видах спорта). Так, решение этой проблемы заключается в том, что используя интегральный метод оценки величины силовых нагрузок и компьютерную программу для определения относительной массы отягощения, были рассчитаны безопасные и критические значения нагрузки для нетренированных лиц. При этом исследуемые биохимические показатели крови (концентрации тестостерона, кортизола и активности лактатдегидрогеназы) фиксированные после тренировки по сравнению с состоянием покоя достаточно четко подтверждали наши расчеты.

Ключевые слова: безопасные и критические нагрузки; интегральный метод определения величины нагрузки; концентрация кортизола и тестостерона в сыворотке крови человека; активность лактатдегидрогеназы; тренированные и нетренированные лица.

А.А. Chernozub

THE SECURITY AND CRITICAL LEVELS OF PHYSICAL ACTIVITY FOR TRAINED AND UNTRAINED PERSONS IN MUSCLE PERFORMANCE POWER ORIENTATION

The paper studied the problem of finding the optimal methodology for determining the safety and critical load conditions for the body trained and untrained people in the process of training the force pool. It was found that for trained individuals who have a sufficient level of adaptation to the power load, the use of “standard” modes of operation in the course of employment by fitness power safely. However, the problematic issue is that to the untrained troops, it is almost impossible to determine the safe load parameters using conventional techniques, which are mainly used in cyclic sports. Thus, the solution to this problem lies in the fact that using the integral method for estimating the value of power loads and a computer program for determining the relative weight of the index weights, safety and critical load parameters were calculated for untrained persons. At the same time, studied the biochemical parameters of blood (testosterone, cortisol, and lactate dehydrogenase activity) fixed after exercise, compared with the state of rest, confirmed our calculations clearly enough.

Key words: safety and critical loads; integral method for determining the size of the load; the concentration of cortisol and testosterone in human serum lactate dehydrogenase activity; trained and untrained persons.

Chernomorsk State University named after P.Mogila, Nikolayev.

REFERENCES

1. Cochran A. J. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp Physiol.* 2014; 99 (5): 782-91.
2. Cantrell G. S. Maximal strength, power, and aerobic endurance adaptations to concurrent strength and sprint interval training. *Eur J Appl Physiol.* 2014; 114 (4): 763-71.
3. Emini N. N. Motivational and psychological correlates of bodybuilding dependence. *J Behav Addictions.* 2014; 3 (3): P. 182-8.
4. Wahl P. Mathes S, Köhler S, Mester J. Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different endurance training protocols. *Horm Metab Res.* 2013; 45 (11): 827-33.
5. Goto K, Ishii N, Kizuka R, Kraemer R. Hormonal and metabolic responses to slow movement resistance exercise with different durations of concentric and eccentric actions. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106 (5): P. 731-9.
6. Chernozub A. Peculiarities of cortisol level changes in the blood of athletes and untrained boys in response to heavy power training loads. *Eur Int J Sci and Technol.* 2013; 2 (9): 52-7.
7. Chernozub A. Dynamics of the condition of autonomic heart rhythm regulation in athletic trainings. *Eur Int J Sci and Technol.* 2013; 2(6): 17-22.
8. Chernozub A.A. Method of determining the index of training load in athleticism. *Pat. UA 76705 U, MPK A61B 5/22 (2006.01), № u201208376.*
9. Certificate of registration of copyright number 48519 of 29/03/2013. The computer program «Computer program for determination of the relative weight of the burden in athletics.» Authors: Bulgakova A.S., Chernozub A.A.
10. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* 1985; 15: 674.
11. Seynnes OR, Kamandulis S, Kairaitis R. Effect of androgenic-anabolic steroids and heavy strength training on patellar tendon morphological and mechanical properties. *J Appl Physiol.* 2013; 115 (1): 84-9.
12. Kraemer RR, Hollander DB, Reeves GV, Ramadan ZG. Similar hormonal responses to concentric and eccentric muscle actions using relative loading. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 96 (5): 551-7.

*Матеріал надійшов до
редакції 28.06.2015*

НЕКРОЛОГИ



Всеволод Олексійович Цибенко

Всеволод Олексійович Цибенко народився в м. Харкові 4 жовтня 1933 р. У 1956 р. закінчив Київський державний університет ім. Т.Г. Шевченка. Його дипломна робота була присвячена дії ацетилхоліну на передачу вагусних впливів на ізольоване серце жаби. Після закінчення університету Всеволод Олексійович працював на кафедрі фізіології людини і тварин КДУ, а згодом вступив до аспірантури. Він активно проводив дослідження на кролях і собаках в умовах як гострого, так і хронічного досліджу.

У 1964 р. В.О. Цибенко захистив кандидатську дисертацію на тему: «Вплив подразнення гіпоталамуса на діяльність серцево-судинної системи». Було показано, що електричне подразнення різних зон гіпоталамуса чинить диференційований вплив на регіонарний кровообіг (у скелетних м'язах, легенях, мозку) та на діяльність серця.

Після закінчення аспірантури він працював спочатку асистентом, а згодом доцентом кафедри фізіології людини і тварин КДУ. У 1967 р. В.О. Цибенко був у творчому науковому відрядженні в Італії, під час якого він

ознайомився з роботою однієї з провідних лабораторій Європи з вивчення нейрогуморальної регуляції системи кровообігу.

В.О. Цибенко багато років читав загальний курс «Фізіологія людини і тварин» та спецкурс «Фізіологія крові і кровообігу». Разом з цим впродовж наступних двох десятиліть він продовжував наукову діяльність. У 1984 р. захистив докторську дисертацію «Гіпоталамічна регуляція кровообігу у великому і малому колах». У цій фундаментальній роботі він показав, що роль гіпоталамуса в регуляції діяльності серцево-судинної системи полягає не тільки у гемодинамічному супроводі емоційно-поведінкових реакцій, але й у підтриманні кисневого гомеостазису, регуляції постачання O_2 до тканин відповідно до рівня метаболізму в них.

У 1985 р. проф. В.О. Цибенко очолював кафедру фізіології людини і тварин КДУ. У 1988 р. біологічний факультет переїхав у новозбудоване приміщення, що потребувало вмілого розподілу одержаної площі, враховуючи потреби й перспективи розвитку кафедри, забезпечення обладнання лабораторій, водопостачання, підведення електроенергії, заземлення і т.д. У 1990 р. на кафедрі фізіології на базі лабораторії ВНД було обладнано клас, укомплектований 10 персональними комп'ютерами, що надало можливість комп'ютеризувати частину навчального процесу.

Він продовжує активну педагогічну та наукову діяльність. У 1991 р. розробив новий спецкурс «Фізіологія вегетативної нервової системи», а в 1998 - «Фізіологія виділення». Його лекції були глибоко змістовні, насичені найновішим на той час матеріалом вітчизняних і зарубіжних першоджерел. Спецкурси, як правило, супроводжувалися демонстрацією слайдів.

У 1993 р. В.О. Цибенко проходив стажування у лабораторії з дослідження нейрогуморальної регуляції кровообігу проф. В. Лаута (Канада). У 1995 р. він разом із своїм учнем П.І. Янчуком отримав грант і взяв участь у роботі Міжнародного форуму з іннервації

печінки у м. Мацуяма (Японія). У 1999 р. його запрошують зробити доповідь на Міжнародному фальк-симпозіумі у м. Фрайбург (Німеччина).

Під керівництвом В.О. Цибенка успішно захищені 3 докторські та 8 кандидатських дисертацій. Впродовж багатьох років він був членом двох спецрад із захисту докторських і кандидатських дисертацій: при Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка та Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Під редакцією В.О. Цибенка видано університетський підручник «Фізіологія людини і тварин» (2003) та навчальні посіб-

ники «Фізіологія серцево-судинної системи» (2002) та «Кровообіг. Фізіологія з основами патофізіології» (2010). Він співавтор «Російсько-українсько-англійського словника фізіологічних термінів» (2009).

Як людина Всеволод Олексійович був вимогливим до себе і до співробітників та студентів. Він завжди відзначався високою принциповістю, глибиною і об'єктивністю міркувань талановитого дослідника, педагога і організатора науки.

Цибенко Всеволод Олексійович залишив глибокий слід в українській фізіологічній науці і в серцях своїх вихованців, які завжди будуть його пам'ятати.



Пам'яті Анатолія Вікторовича Коцюрubi

26 листопада 2016 р. пішов з життя провідний науковий співробітник відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, професіонал найвищого класу і великий патріот України Анатолій Вікторович Коцюрuba.

Народився він 16 серпня 1949 р. на Черкащині. Закінчив хімічний факультет Львівського університету, після чого вступив до аспірантури при Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. Захистивши дисертацію доволі довгий час працював на посаді старшого наукового співробітника, вивчаючи обмін нуклеотидів. На це його надихав досвід старших колег - академіка В.А. Беліцера і професора В.П. Венд.

На жаль, його намагання пройти апробацію докторської дисертації двічі супроводжувалися смертю близьких родичів, що він сприйняв як знак, і це спонукало його відмовитися від подальших намірів отримати «корочку». Але це не зупинило Анатолія Вікторовича як фахівця, схильного до постійного наукового пошуку. Найкраще, як дослідник він розкрився, працюючи зі співробітниками відділу фізіології кровообігу і відділу експериментальної кардіології Інституту фізіо-

логії, куди він перейшов у 2009 р. Анатолій Вікторович успішно вів пошук метаболізму ейкозаноїдів, газових трансмітерів - оксиду азоту та сірководню, та з'ясовав їх роль як в фізіологічних реакціях серця і судин, так і в розвитку патологічних змін судинного тонуусу і серцевої діяльності. Але «улюбленцем» був екдистерон, сполука, отримана з рослини, яка росте тільки поруч із сакральним місцем для українців - Кам'яною могилою. В багатьох працях він показав унікальність цієї сполуки як кардіо- і вазопротектора. Анатолій Вікторович був надзвичайно контактною і доброзичливою людиною, тому він успішно співпрацював з молодими колегами не тільки з Києва, але і з Хмельницького, Запоріжжя, Львова та інших міст, часто роблячи їх співавторами нових запропонованих ним методів визначення тих чи інших сполук. З іншого боку, він був часто не згоден з публікаціями своїх праць у закордонних журналах. Він вважав, що треба піднімати рівень української науки - і як наслідок - українських наукових видань. Любов до рідної землі проявлялась у нього і в глибокому знанні історії України і її визначних місць. Разом з дружиною науковцем-біохіміком Вірою Миколаївною вони побували у всіх цікавих куточках нашої країни. Він з успіхом зацікавлював і залучав до знайомства з культурним надбанням нашого народу молодих колег. Любов до України зумовила навіть його хобі. Він був автором і виконавцем більше ніж 10 тисяч українських пісень, диски з якими він часто дарував своїм друзям і колегам. Крім власних досягнень він гордився і опікувався своїми синами і онуками. Анатолій Вікторович був, як тепер кажуть, непублічною людиною. Він намагався уникати участі в різноманітних багатолюдних неформальних зустрічах. Але всі хто потрапляв в тенети його доброзичливості і наукової самовідданості залишалися його друзями на довгі роки. Тому безсумнівно, що добра пам'ять про цю багатогранну, обдаровану людину, великого патріота України назавжди залишиться в пам'яті всіх, хто його знав.



Таміла Максимівна Зеленська

Наприкінці 2015 р. пішла з життя відомий вчений Таміла Максимівна Зеленська, що впродовж багатьох років працювала у відділі імунології та цитотоксичних сироваток Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

Вона народилась в м. Києві 26 червня 1934 р. Лікувальний факультет Київського медичного інституту закінчила у 1958 р. Клінічну ординатуру проходила у Київському інституті переливання крові та невідкладної хірургії. У 1961 р. була направлена на роботу у відділ з вивчення біологічно активних речовин Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН УРСР. У січні 1967 р. підрозділ отримав нову назву - «Відділ експериментальної терапії», а у 1975 р. - «Відділ імунології та цитотоксичних сироваток». У 1968 р. успішно захистила кандидатську дисертацію «Вплив антиоваріальної та антитестикулярної цитотоксичних сироваток на функціональний стан і морфологічну структуру яєчників та сім'яників щурів у віковому аспекті». На момент захисту дисертації мала 59 друкованих праць та була співавтором монографії «Дія специфічних сироваток на статеві залози». Пізніше опублікувала особисту монографію «Ендокринні взаємодії та тестикулярні антитіла».

Експериментальні дослідження Таміли Максимівни знайшли широке впровадження у тваринництві, за що у 1977 р. вона була нагороджена бронзовою медаллю ВДНГ СРСР.

У 1977 р. отримала звання «старший науковий співробітник» та почала експериментальні дослідження стану Т- та Б- ланок імунітету за умов пригнічення або реактивації статевих залоз за допомогою імуноглобулінів, виділених з антитестикулярної сироватки. Брала участь у виконанні державної програми «Механізми імуностимуляції». Активно працювала за програмою міжнародного співробітництва між Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця та Інститутом біологічних досліджень ім. Станковича (Белград) та ветеринарним факультетом Університету Белграда.

Протягом 1981-85 рр. Т.М.Зеленська брала активну участь у виконанні програми міжнародного співробітництва з Інститутом біологічних досліджень академії наук Сербії, які мали важливе теоретичне і практичне значення для тваринництва. У 1982 р. опублікувала на англійській мові результати своїх досліджень у працях V міжнародного симпозіуму у Варні під назвою «Дослідження пригнічуючого і реактивуєного ефекту тестикулярних антитіл». У цьому ж році у матеріалах Всесоюзного з'їзду геронтологів і геріатрів, що відбувався в Кишеневі зробила доповідь «Вікові особливості субмікроскопічних структур ендокринних залоз щурів та їх зміни під дією антитестикулярних імуноглобулінів».

Паралельно з науково-дослідною роботою брала участь у педагогічній діяльності – почасово працювала викладачем кафедри патологічної анатомії Київського медичного інституту.

У 1983 р. за цикл досліджень «Патологічні механізми дії антиорганних цитотоксичних сироваток» у складі групи працівників відділу відзначена премією ім. О.О. Богомольця.

Після призначення пенсії працювала в

районній поліклініці завідувачем фізіотерапевтичного кабінету, отримала кваліфікацію лікаря вищої категорії. За результатами її досліджень Міжнародний біографічний центр в Кембриджі визнав її «жінкою року» (1992-1993), нагородив срібною медаллю та дипломом.

Таміла Максимівна відрзнялася врівноваженим характером, доброзичливістю. Мала схильність до мистецтва, літератури, театру, поезії. За останні роки життя опублікувала декілька збірок власних поезій, які були високо оцінені читачами. Її вразив «бурий ліс» біля Києва. Один з її віршів «Чорнобильська ялина» перекладено на музику Вадимом Федченко. Ця пісня набула широкої популярності, виконувалась дитячим хором «Зірниця», внесена в фонд Національної радіокомпанії України.

... Сумую з тобою, ялино-печаль,

І взимку, і в літку мене тебе жаль...

Тож буре гілля є не радість, а біль –

Тобі дарувала зорина-полинь...

У 2009 р. була видана збірка її віршів «Тобі я хочу все сказати». До нього увійшли 49 віршів та 22 фото її художніх творів, виконаних у техніці пласкої флористики. За цю роботу вона отримала звання «Майстра декоративно-прикладного мистецтва».

До останніх днів вона продовжувала шукати «гармонію життя». З 2011 р. була активним членом клубу «Літературне пере-хрестя» у Дніпровському районі м. Києва. Вона завжди належала до активних членів суспільства, яким притаманно не тільки використовувати цей світ, але й творити його, віддавати свою творчість світу. Ми втратили видатного вченого, видатного митця, справжню людину з великої літери.

CONTENTS

N.A. Strutynska, A.V. Kotsiuruba, A.Yu. Budko, L.A. Mys, V.F. Sagach. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive NO-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress	3
O.H. Minchenko, Y.M. Bashta, D.O. Minchenko, O.O. Ratushna. Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue	12
M.V. Telka, O.V. Rikhalsky, N.S. Veselovsky. Excitability properties of trigeminal ganglion neurons	24
O.S. Zapukhliak, V.O. Kachanovska, E.V. Isaeva, O.V. Netsyk, D.S. Isaev. Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus	35
I.V. Vereshchaka, N.V. Bulgakova, V.V. Kornieiev, K.A. Chaikovskii, A.V. Maznychenko. Modulation of the monosynaptic reflex potentials in the decerebrated rats under the influence of hydroxytryptophan	41
N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba, A.V. Golubenko. Induction of oxidative and nitrosative stress in boys in adapting to physical stress during training and competitive periods	47
T.I. Stanishevskaya, I.P. Anosov. The influence of different thyroid status on electrophysiological and myographical parameters of skeletal muscles contraction in white rats	57
O.S. Panasiuk, A.M. Shysh, O.O. Moibenko. Omega-3 polyunsaturated fatty acids normalize the function of mitochondria, activity of enzymes of prooxidant-antioxidant system and the expression of cytochrome P450 2E1 after isoproterenol-induced myocardial injury	64
T.M. Boychuk, T.I. Kmet. Peculiarities of the influence of streptozotocin-induced diabetes and incomplete ischemia-reperfusion of the brain during apoptosis of various neocortical lobes of rats	72
Daria Dryn, Mariia Melnyk, Ihor Kizub, Hongzhen HU, Anatoliy Soloviev, Alexander Zholos. The role of TRPV4 cation channels in the regulation of phenylephrine-induced contraction of rat pulmonary artery	79
N.O. Ryzhkova, T.I. Gavrilenko, O.M. Parkhomenko. Korvutin reduces the high maintenance of myeloperoxidase in plasma of blood of patients with the acute infarct of myocardium	87
N.G. Zemlianskykh, L.A. Babichuk. Changes in erythrocyte surface marker cd44 during hypothermic and low temperature storage	94
N.A. Babenko, G.V. Storozhenko. Long-term food restriction prevents the age-related changes of the content of biologically active sphingo- and glycerolipids contents in the rat tissues	103
A.A. Chernozub. The security and critical levels of physical activity for trained and untrained persons in muscle performance power orientation	110
NECROLOGS	117