

Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 6 2016

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Котик О.А., Котлярова А.Б., Поліщук А.О., Марченко С.М.</i> Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура	3
<i>Drachuk K.O., Dorofeyeva N.A., Sagach V.F.</i> The role of hydrogen sulfide in diastolic function restoration during aging	9
<i>Zapukhliak O.S., Netsyk O.V., Rasulova O.S., Isaev D.S.</i> Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy	19
<i>Бойчук Т.М., Ніка О.М., Ткачук С.С.</i> Співвідношення р53-про- та Bcl-2-антиапоптотичної активності в гіпокампі щурів з ішемією-реперфузією головного мозку та експериментальним діабетом	25
<i>Палагіна І.А., Кудря М.Я., Лалименко О.С.</i> Роль метаболітів оксиду азоту при дії субтоксичних доз сукцинамідів на стан гомеостазу	34
<i>Mokrii V.Y., Ziablytsev S.V.</i> Polymorphism Pro ₁₂ →Ala of the peroxisome proliferator-activated receptors gamma gene effect on lipid peroxidation and antioxidant defense in patients with type 2 diabetes	43
<i>Шаповал Л.М., Кон'як Б.С., Дмитренко О.В., Майський В.О., Маньковська О.П., Сагач В.Ф.</i> NO-ергічний контроль функції кровообігу у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом за умов тривалого цілодобового освітлення	50
<i>Кривопустов О.С., Досенко В.Є.</i> Варіанти гена рецептора прогестерону як генетичний фактор ризику розвитку загрозливого абортів	60
<i>Лінник О.О., Древицька Т.І., Тарасова К.В., Портніченко Г.В., Досенко В.Є., Маньковська І.М.</i> Порушення скоротливої активності кардіоміоцитів за дії доксорубіцину	65

<i>Розова К.В., Болгова Т.В., Тимошенко К.Р., Вінничук Ю.Д., Гуніна Л.М., Безугла В.В.</i> Перестроєння тканин скелетних м'язів, легень та серця щурів за умов гіпоксії навантаження	72
<i>Коробейнікова Л.Г., Макаруч М.Ю., Коробейніков Г.В., Міщенко В.С., Заповітряна О.Б.</i> Стан психофізіологічних функцій у висококваліфікованих спортсменів різних вікових груп	81
<i>Янко Р.В.</i> Морфологічні зміни підшлункової залози після введення мелатоніну у різні сезони року	88
<i>Гнатюк В.В., Кононенко Н.М.</i> Взаємозв'язок активності епіфіза та гонад у щурів-самців у різні сезони року	95
<i>Грищенко В.А., Чернишенко Т.М., Горницька О.В., Платонова Т.М.</i> Оцінка функціонального стану печінки та ефективності терапії за ентеропатології телят	102
<i>Pohranychna Kh. R.</i> Reparative processes in jaw bones under using of different plastic materials .	110
<i>Веселовська Н.М., Жеребо І.Б.</i> Оцінка функціональних змін сльозопродукції під дією очних крапель на основі природної молекули ектоїну та штучної сльози у хворих на синдром сухого ока на тлі ендокринної офтальмопатії	118
ХРОНІКА	
<i>Резніков О.Г., Павлович С.І.</i> VII конгрес наукового товариства патофізіологів України	122
НЕКРОЛОГИ	
Пам'яті Руслана Федоровича Макулькіна	125

Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура

О.А. Котик, А.Б. Котлярова, А.О. Поліщук, С.М. Марченко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: smm1003@gmail.com

З використанням методу patch-clamp у конфігурації nucleus attached встановлено, що ядерна мембрана кардіоміоцитів щура містить різні типи іонних каналів з провідністю у діапазоні від 10 до 400 пСм. Зокрема, зареєстровано інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори з провідністю 384 ± 5 пСм, а також катіонні канали – 209 ± 13 пСм, подібні за властивостями до LCC-каналів, описаних раніше у нейронах. Крім того, нами зареєстровано принаймні два типи іонних каналів, провідність яких є значно більшою, ніж у LCC-каналів і декілька типів іонних каналів з нижчою провідністю (10-90 пСм). Ключові слова: іонні канали; ядерна мембрана; кардіоміоцити; Ca^{2+} -сигналізація; інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори.

ВСТУП

Ядерна оболонка є напівпроникним бар'єром між цитоплазмою та нуклеоплазмою. Транспорт крізь ядерну мембрану забезпечується наявністю у ній численних ядерних пор та іонних каналів з різними біофізичними властивостями. Незважаючи на велику різноманітність іонних каналів у ядерній мембрані [1-7] та численні дослідження, присвячені внутрішньоклітинним сигнальним механізмам, зокрема Ca^{2+} -сигналізації, фізіологічна роль катіон-селективних іонних каналів у ядерній мембрані залишається остаточно нез'ясованою. Ключова роль іонів кальцію у скороченні кардіоміоцитів є загальновизнаною. Значно менш дослідженим залишається питання механізмів участі Ca^{2+} у регуляції транскрипції генів, адже відомо, що кальцієві сигнали поширюються не лише в цитозолі, але й у ядрі [8-10]. Іони кальцію можуть пасивно дифундувати із цитоплазми у ядро через ядерні пори [11]. Крім пор у ядерній мембрані наявні специфічні системи транспортування Ca^{2+} – інозитол-1,4,5-трифосфатні [1, 12] і ріанодинові рецептори [13, 14]. Таким чином іонні канали ядерної мембрани

є невід'ємною частиною системи Ca^{2+} -сигналізації, а відтак відіграють важливу роль у функціонуванні серцевого м'яза і можуть стати мішенню нових типів медичних препаратів для лікування захворювань серця. Також слід зазначити важливість досліджень іонних каналів ядерної мембрани на різних об'єктах, адже відомо, що їх експресія та, відповідно, характер поширення Ca^{2+} -сигналів можуть відрізнятися залежно від типу клітин. Раніше ми запропонували спосіб ізолювання ядер, придатних для дослідження методом patch-clamp та описали високопровідні катіонні канали (LCC-channels), інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори та інші іонні канали ядерної мембрани нейронів центральної нервової системи [1].

Метою цієї роботи було ідентифікувати іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано на щурах лінії Вістар віком 2–3 тиж. Після анестезії і декапітації швидко ізолювали міокард, поміщали його в попередньо окисенований розчин Креб-

са-Хенке (NaCl–118,1; NaHCO₃–25; KCl–4,7; NaH₂PO₄–1,36; MgCl₂–1,2; CaCl₂–1; глюкоза–11,1 ммоль/л, рН 7,4), відмивали від крові та подрібнювали. Для ізолювання ядер кардіоміоцитів тканину переносили у розчин для гомогенізації такого складу (ммоль/л): цукроза–300; KCl–60; HEPES–10; ЕДТА–1 (рН 7,2), який містив інгібітори протеаз Sigmafast Protease Inhibitor Tablets («Sigma», США) або Complete protease Inhibitor cocktail tablets («Roche», Німеччина) у концентраціях, зазначених виробниками, дитіотриетол (1 ммоль/л) та гомогенізували на холоді протягом 30–40 с у скляному гомогенізаторі з тефлоновим поршнем.

Отриманий гомогенат центрифугували при 1000 g упродовж 10 хв. Супернатант зливали, а осад ресуспендували в 1 мл розчину такого самого складу, як і для заповнення піпеток та камери (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; ЕДТА–1 (рН 7,2).

У серіях експериментів для визначення селективності іонного каналу розчин у піпетці замінювали на (ммоль/л): калію глюконат–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; ЕДТА–1 (рН 7,2) – при визначенні селективності для Cl[–] або на (ммоль/л): CaCl₂–100; HEPES–20 (рН 7,2) – при визначенні селективності для Ca²⁺. Для реєстрації інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів до розчину додавали CaCl₂–0,384 ммоль/л ([Ca²⁺]_(вільний) ≈ 100 мкмоль/л), АТФ (0,5 ммоль/л) та інозитол-1,4,5-трифосфат у концентрації 3 мкмоль/л. Концентрацію вільного Ca²⁺ розраховували за допомогою програми Maxchelator. Усі використані в розчинах реагенти фірми «Sigma» (США).

Реєстрацію іонних струмів здійснювали методом patch-clamp у конфігурації nucleus attached за допомогою установки, зібраної на базі інвертованого мікроскопа LEICA DM IRB, підсилювача Visual-Patch 500 та комп'ютера. Patch-піпетки виготовляли з боросилікатних заготовок («Sutter Instrument», США). Опрацювання результатів здійсню-

вали з використанням програм Clampfit та Origin. Результати представлено у вигляді $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосовуючи метод patch-clamp, нами підтверджено наявність у ядерній мембрані кардіоміоцитів щура інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів з середньою провідністю 384 ± 5 пСм ($n = 4$; рис. 1 а, б), експресію яких раніше встановлено з використанням специфічних антитіл [15]. Слід зазначити також, що в ізолюваних міоцитах шлуночків серця наявні інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори виключно другого типу [16], в той час як у нейронах, зокрема клітинах Пуркінє мозочка, переважає перший тип [1].

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори є Ca²⁺-селективними каналами, проникними також для K⁺ і Ba²⁺ [17, 18]. Ми припускаємо, що не лише кальцієві канали можуть брати участь у поширенні кальцієвого сигналу. При вивільненні Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо позитивно заряджені частинки з люмену переміщуються у цитоплазму. За відсутності протилежно спрямованого потоку позитивно заряджених іонів, мембранний потенціал швидко змиститься до значення кальцієвого рівноважного потенціалу і вивільнення Ca²⁺ з депо припиниться. LCC-канали, описані нами раніше у ядрах нейронів центральної нервової системи, роблять мембрану депо легко проникною для іонів калію [1]. Можна припустити, що зміна потенціалу люмену, що виникає при вивільненні Ca²⁺, компенсується протилежно спрямованим потоком K⁺ через LCC-канали, полегшуючи цим самим подальше вивільнення Ca²⁺ з депо. Оскільки за властивостями ядерна та ендоплазматична мембрани є подібними [19], LCC-канали можуть бути наявні й у мембранах ендоплазматичного ретикулула.

Серед іонних каналів, зареєстрованих у ядерній мембрані кардіоміоцитів, найчастіше спостерігали активність каналу з середньою

провідністю 209 ± 13 пСм ($n = 44$). За провідністю та кінетичними характеристиками ці канали подібні до описаних нами раніше LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє, середня провідність яких становила 198 ± 27 пСм [1]. Вони характеризуються повільною динамікою (рис. 2, а) і їх активність суттєво залежить від потенціалу. На позитивних значеннях потенціалу ці канали практично весь час були відкритими, а на негативних – їх активність знижувалася. Вольт-амперна характеристика LCC-подібного каналу представлена на рис. 2, б.

Для визначення селективності зареєстрованого каналу ми замінили стандартний розчин KCl в піпетці на еквімолярний розчин К-глюконату (ммоль/л): калію глюконат–150;

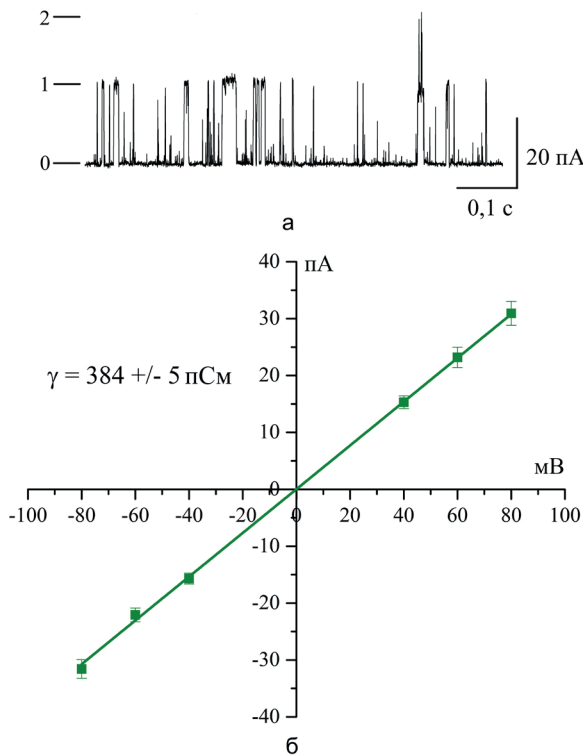


Рис. 1. Типова реєстрація активності інозитол-1,4,5-трифосфатного рецептора ядерної мембрани кардіоміоцитів при потенціалі +80 мВ (а) та його усереднена вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; CaCl_2 –0,384 ($[\text{Ca}^{2+}]$ вільний ≈ 100 мкмоль/л); АТФ–0,5; інозитол-1,4,5-трифосфат–0,003; pH 7,2

HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1. За цих умов спостерігали струми вхідного й вихідного напрямку, що свідчить про непроникність цього каналу для Cl^- ($n = 10$). За наявності у піпетці розчину (ммоль/л): CaCl_2 –100; HEPES–20 канали вдалося зареєструвати лише за негативних значень потенціалу, що є підтвердженням їх непроникності для Ca^{2+} ($n = 4$). Крім того, CaCl_2 (100 ммоль/л) призводить до зменшення калієвого струму через ці канали, оскільки амплітуда їх відкривання за таких умов була меншою, ніж за наявності у піпетці KCl чи К-глюконату (результати не представлено). Подібні дані раніше були отримані для LCC-каналів ядерної мембрани нейронів центральної нервової системи [1, 3]. Таким чином, цілком вірогідно, що канали з провідністю 209 ± 13 пСм є LCC-каналами.

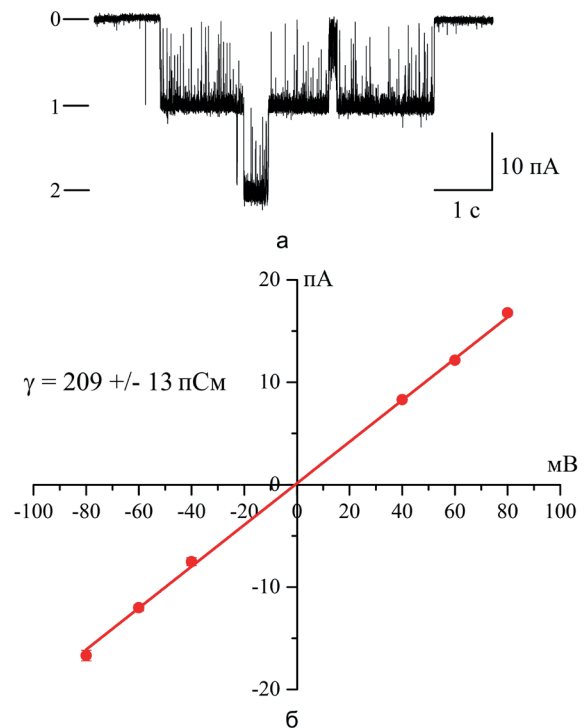


Рис. 2. Іонний струм через LCC-подібний катіонний канал ядерної мембрани кардіоміоцитів з провідністю 209 ± 13 пСм при потенціалі –80 мВ (а) та його вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; pH 7,2

У ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано також канал з середньою провідністю 312 ± 8 пСм ($n = 5$). Типова реєстрація його активності та вольт-амперна характеристика представлені на рис. 3 а і б відповідно. Цей канал за кінетикою нагадує типові LCC-канали, але має більшу амплітуду і спостерігається значно рідше (в 5 петчах з 54). Крім нього вдалося зареєструвати іонний канал з провідністю 340 пСм ($n = 1$), який відрізняється від попереднього повільнішою кінетикою (рис. 4 а, б).

Yazawa і співавт. у 2007 р. клонували іонні канали двох типів TRIC-A і TRIC-B, які є селективними до моновалентних катіонів і складаються з трьох гомотримерів [20]. Згодом Zhou і співавт. висунули гіпотезу участі TRIC-каналів у внутрішньоклітинній кальцієвій сигналізації [21], подібну за змістом до запропонованої нами раніше для участі LCC-каналів у нейтралізації зміни заряду в люмені кальцієвого депо при вивільненні Ca^{2+} з нього [1].

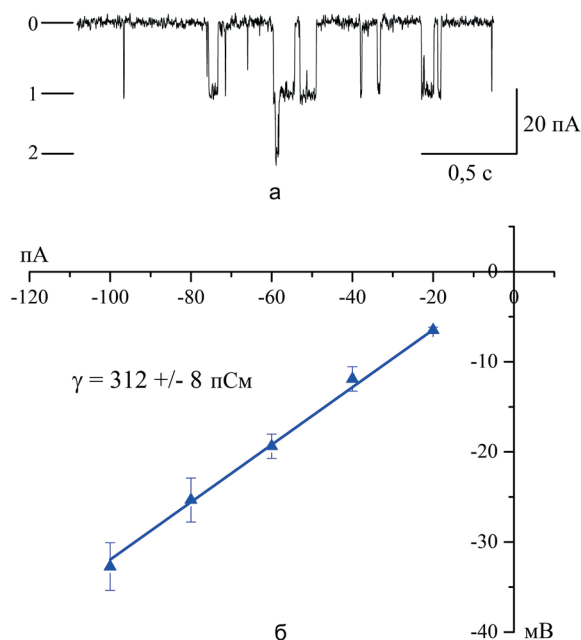


Рис. 3. Активність іонного каналу з провідністю 312 ± 8 пСм при потенціалі -80 мВ (а) та його усереднена вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; pH 7,2

Згідно з цим припущенням канали TRIC-A безпосередньо модулюють вивільнення Ca^{2+} через ріанодинові рецептори, в той час, як TRIC-B регулюють функціонування інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів [21]. TRIC-A експресуються переважно у збудливих тканинах, зокрема нервовій і м'язовій, а TRIC-B ідентифіковані у більшості тканин ссавців. Обидва підтипи цих каналів наявні у мембранах ендоплазматичного ретикулула, але відсутні у плазматичній мембрані [20]. При цьому провідність каналу TRIC-B у середовищі, що містило 210 ммоль/л K^+ , становить 199 пСм [22]. Можна висунути припущення, що зареєстрований нами катіонний канал з провідністю 209 ± 13 пСм є еквівалентний TRIC-каналу типу В, а канал з провідністю 312 ± 8 пСм відповідає типу А. Крім вищеписаних каналів, у ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано

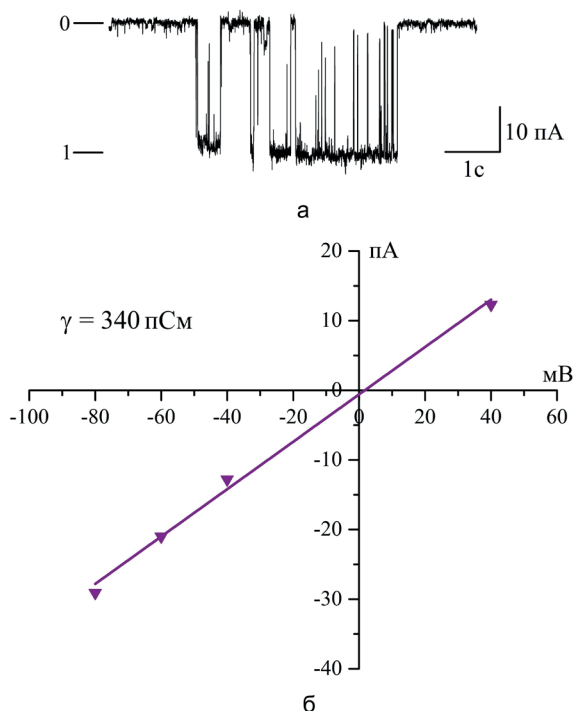


Рис. 4. Реєстрація струму через іонний канал з провідністю 340 пСм при потенціалі -80 мВ (а) та його вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; pH 7,2

($n = 12$) іонні канали з відносно невеликою провідністю (10–90 пСм).

Отже, нашими дослідженнями підтверджено наявність у ядерній мембрані кардіоміоцитів інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів з провідністю 384 ± 5 пСм. До того ж, ідентифіковано катіонні канали з провідністю 209 ± 13 пСм, подібні до LCC-каналів [1], раніше описаних у нейронах. У ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано також канали з провідністю 312 ± 8 пСм, 340 пСм та декілька типів іонних каналів з відносно невеликою провідністю (10–90 пСм), дослідження біофізичних властивостей і функцій яких стане наступним етапом нашої роботи.

О.А. Котик, А.Б. Котлярова, А.О. Полищук, С.М. Марченко

SINGLE-CHANNEL ION CURRENTS IN THE NUCLEAR ENVELOPE OF RAT CARDIOMYOCYTES

Using the patch clamp technique in nucleus attached configuration we have found that the nuclear membrane of rat cardiomyocytes contains different types of ion channels with conductances in the range from 10 to 400 pS. In particular, we recorded inositol 1,4,5-trisphosphate receptors with conductance of 384 ± 5 pS and 209 ± 13 pS cation channels similar to LCC-channels, previously reported in neurons. In addition, we found at least two types of ion channels with significantly higher conductance than that of LCC-channels and several types of ion channels with lower conductance (10-90 pS).

Key words: ion channels; nuclear envelope; cardiomyocytes; Ca^{2+} -signalling; inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.

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

Е.А. Котык, А.Б. Котлярова, А.А. Полищук, С.М. Марченко

ИОННЫЙ ТОК ОДИНОЧНЫХ КАНАЛОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

С использованием метода patch-clamp в конфигурации nucleus attached установлено, что ядерная мембрана кардиомиоцитов крысы содержит различные типы ионных каналов с проводимостью в диапазоне от 10 до 400 пСм. В частности, нами зарегистрировано инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы с проводимостью 384 ± 5 пСм,

а так же катионные каналы – 209 ± 13 пСм, сходные с LCC-каналами, описанными ранее в нейронах. Кроме того, мы зарегистрировали по крайней мере два типа ионных каналов, проводимость которых существенно больше, чем у LCC-каналов и несколько типов ионных каналов с низкой проводимостью (10-90 пСм).

Ключевые слова: ионные каналы; ядерная оболочка; кардиомиоциты; Ca^{2+} -сигнализация; инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы.

REFERENCES

1. Marchenko SM, Yarotsky VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC. Spontaneously active and InsP_3 -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons. *J Physiol.* 2005;565(3):897–910.
2. Fedorenko EA, Duzhii DE, Marchenko SM. Spontaneously active ion channels of membranes of the nuclear envelope of hippocampal pyramidal neurons. *Neirofiziolohiya/Neurophysiology.* 2007;39(1):3–8.
3. Fedorenko O, Yarotsky V, Duzhyy D, Marchenko S. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2010;460(6):1045–50.
4. Fedorenko OA, Duzhyy DE, Marchenko SM. Nuclear ion channels of the granule cells from the dentate gyrus. *Fiziol Zh.* 2007;53(3):18–25 [Ukrainian].
5. Fedorenko OA, Marchenko SM. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus.* 2014;24(7):869–76.
6. Fedorenko OA, Marchenko SM. Properties of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in the nuclei of neurons of the rat CNS. *Neurophysiology.* 2014;46(3):293–6.
7. Mazzanti M., Defelice L, Cohen J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature.* 1990;22(343):764–7.
8. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. ATP dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell.* 1995;80(3):439–44.
9. Ibarra C, Vicencio JM, Varas-Godoy M, Jaimovich ED, Beverly A, Rothermele F, et al. An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear Ca^{2+} signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;75:40–8.
10. Oliveira AG, Guimarães ES, Andrade LM, Menezes GB, Fatima LM. Decoding Calcium signaling across the nucleus. *Physiology (Bethesda).* 2014; 29(5):361–8.
11. Ljubojevic S, Walther S, Asgarzoei M, Sedej S, Pieske B, Kocksamper J. In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic $\text{Ca}^{(2)+}$ concentration in adult cardiomyocytes. *Biophys J.* 2011;100(10):2356–66.
12. Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biol Chem.* 2005;280(16):15912–20.
13. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular

- and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* 1994;74(3):595–637.
14. Zheng J, Chen Z, Yin W, Miao L, Zhou Z, Ji G. Ryanodine receptors are involved in nuclear calcium oscillation in primary pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(2):207–11.
15. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al. Local InsP_3 -dependent perinuclear Ca^{2+} signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 2006;116(3):675–82.
16. Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23961–9.
17. Bezprozvanny I, Ehrlich BE. Inositol 1,4,5-trisphosphate InsP_3 -gated Ca^{2+} channels from cerebellum, conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J General Physiol.* 1994;104(5):821–56.
18. Boehning D, Mak DO, Foskett JK, Joseph SK. Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} channels. *J Biol Chem.* 2001;276(17):13509–12.
19. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle. *Cell Calcium.* 2002;32(5–6):235–49.
20. Yazawa M, Ferrante C, Feng J, Mio K, Ogura T, Zhang M, et al. TRIC channels are essential for Ca^{2+} handling in intracellular stores. *Nature.* 2007;448:78–82.
21. Zhou X, Lin P, Yamazaki D, Park KH, Komazaki S, Chen SRW, et al. Trimeric intracellular cation channels and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Calcium homeostasis. *Circ Res.* 2014;114(4):706–16.
22. Venturi E, Matyjaszkiewicz A, Pitt SJ, Tsaneva-Atanasova K., Nishi M, Yamazaki D, et al. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch – Eur J Physiol.* 2013;465(8):1135–48.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.06.2016*

The role of hydrogen sulfide in diastolic function restoration during aging

K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, V.F. Sagach

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: 8701dk@ukr.net

The objective of the study was to examine the effect of exogenous hydrogen sulfide donor, sodium hydrosulfide (NaHS), on the free radical generation, cNOS uncoupling in the myocardium, and diastolic function in old rats. To evaluate diastolic function of the heart, we used pressure-volume (PV) conductance catheter system (Millar Instruments, USA). It was shown that H_2S levels in the isolated mitochondria and whole heart homogenates obtained from old age rats were significantly lower comparing with adult animals. The markers of combined oxidative and nitrosative stress (the rate of $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ generation, pools of H_2O_2 , diene conjugates, malondialdehyde, uric acid, the activity of iNOS, nitrate reductase, and NO_3^- pools) were increased in the old hearts in line with cNOS uncoupling. Such changes in NOS coupling resulted in the loss of diastolic relaxation (decrease of the rate of relaxation of the left ventricle (dp/dt_{min}) by 33%, 3-times increase of the end-diastolic pressure, 1.5-time increase of the time constant of left ventricular relaxation (Tau g) and 2-time increase of the end-diastolic stiffness). It has been found that NaHS inhibits oxidative and nitrosative stress, restores cNOS coupling and constitutive de novo synthesis of nitric oxide (NO), which promotes an improvement of the diastolic function (increase of the dp/dt_{min} by 20% and decrease of Tau g by 13%).

Key words: aging; cNOS uncoupling; heart; hydrogen sulfide; nitrosative stress; oxidative stress.

INTRODUCTION

Progressive reduction in functional reserves of the cardiovascular system in the elderly increases the risk of diseases such as atherosclerosis, hypertension, coronary heart disease, diabetic angiopathy, etc. According to the literature, aged people have abnormal diastolic relaxation which appears before the changes in systolic function of the heart [1, 2]. At the molecular level, most of functional disorders of the heart tissues and blood vessels are often related to oxidative and nitrosative stress, which results from the overproduction of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) and generation of excess nitric oxide (NO) [3, 4]. Nowadays, there has been increasing evidence for cNOS uncoupling as the primary source of $O_2^{\bullet-}$ in the cells [5, 6]. On the other hand, it was shown that hydrogen sulfide (H_2S) has positive cardiovascular effect through cNOS stimulation [7, 8]. That stimulation could be a result of cNOS recoupling. Thus H_2S can lead to cNOS

coupling and improve the functional state of the cardiovascular system with aging.

H_2S , like NO and CO, belongs to the family of gastransmitters, possesses a powerful cardio- and vasoprotective properties, particularly during ischemia-reperfusion injury, atherosclerosis, and hypertension. This effect is due to antioxidant, anti-inflammatory properties of the gas, as well as its ability to regulate the constitutive de novo synthesis of NO [7-10].

The aim of the study was to investigate the effect of NaHS as exogenous H_2S donor on the heart redox status, cNOS coupling and diastolic function in old rats.

METHODS

The study was conducted on male Wistar rats weighing 280-350 g, which were divided into two groups each of eight animals: adult (6-8 months old) and old (22-24 months old). All experimental procedures were performed in accor-

dance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 / EEC).

Measurement of cardiac function in vivo. The rats were anesthetized using urethane (1.25 g / kg, i. p.). The left ventricle (LV) pressure and volume during the cardiac cycle were determined using ultra-miniature pressure transducer catheter 2F for rats («Millar Instruments», USA). Catheter was introduced in the LV retrogradely through the carotid artery, which enabled simultaneous recording of pressure and volume signals with their curves visualization during the cardiac cycle [11]. Left ventricular pressure-volume ratio was determined using PVA 3.6 program («Millar Instruments», USA). LV diastolic function was assessed according to the changes in the rate of relaxation (dp / dt_{min}), the time constant of active ventricular relaxation (Tau g), end-diastolic pressure (EDP), and end-diastolic stiffness (EDS). We used an exogenous hydrogen sulfide donor, sodium hydrosulfide (NaHS, «Sigma», USA), which was injected intraperitoneally in the concentration of 56.06 mg/kg. This dose allowed us to achieve the plasma NaHS concentration of 10^{-3} mol/l, which was consistent with that used in research performed on aortic SM [12].

Measurement of endogenous H_2S pools and biochemical markers of the oxidative and nitrosative stress and constitutive NO synthesis. In the mitochondria and homogenates of the heart, we determined the markers of oxidative stress such as the rate of superoxide ($O_2^{\bullet-}$) [13], and hydroxyl ($\bullet OH$) generation [14], pools of hydrogen peroxide (H_2O_2) [15], eicosanoids thromboxane B2 (TxB2) and leukotriene C4 (LTC4) [16], arachidonic and uric acids, as well as the markers of lipid peroxidation (LPO), namely diene conjugates (DC) [17] and malonic dialdehyde (MDA) [18]. We also determined nitrosative stress- and constitutive NO synthesis markers and such as inducible-NO synthase (iNOS) [19, 20] and constitutive NO-synthase (cNOS) activity, pools of nitrate anion (NO_3^-)

(marker of peroxynitrite production) [21, 22] and pools of nitrite anion (NO_2^-) [22]. H_2S pools were determined by method [23].

For determine iNOS and cNOS activity, we calculated total activity of NO-synthase using a combination of a classic method [19] and its modification [20], adapted to spectrophotometric measurement of the reaction product - L-citrulline. For incubation of aliquot samples, we used a substrate mixture (1 ml) of the following composition (mmol / ml): KH_2PO_4 (analytically pure) - 50, $MgCl_2$ (analytically pure) - 1, $CaCl_2$ (analytically pure) - 2, NADPH («Sigma», USA) - 1, L-arginine (analytically pure) - 2, pH 7.0 for 60 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 0.3 ml 2 N $HClO_4$ (analytically pure). After determining the total activity of NO-synthase, we determined the activity of inducible NO-synthase using the method similar to the previous one with some differences: in the incubation mixture, we added 2 mmol EDTA instead of $CaCl_2$. Then we calculated the activity of cNOS (eNOS + nNOS), subtracting the activity of iNOS from the total NOS activity. The level of nitrosative stress was based on excessive de novo NO synthesis through calcium-independent activity of inducible NO-synthase (iNOS), salvage synthesis of NO through the activity of nitrate reductase.

The measurement of cNOS coupling index. An activity of cNOS-dependent way of $O_2^{\bullet-}$ formation was assessed from the changes in the index of cNOS coupling, and it was calculated as cNOS activity related to the rate of $O_2^{\bullet-}$ generation [5, 12, 16].

Mitochondrial fraction was obtained from the rat heart by the method of differential centrifugation [24]. The protein content in mitochondrial suspensions was determined by the Lowry method [25].

In addition to steady-state pools, we determined NaHS -induced changes in these indices in *in vivo* experiments on old rats. NaHS was injected intraperitoneally in the concentration of 56.06 mg/kg (30 min before decapitation). The

results are presented as percentage relative to the values of adult animals that are taken for 100%.

Data are expressed as means \pm SE. Results were processed by methods of variation statistics using programs Excel (MS Office XP) and Origin 8.5 (Microcall Inc., USA). Differences between the groups were assessed by ANOVA and T-test. The value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Left ventricular diastolic function was assessed by analysis of PV-loops obtained from the catheter inserted in the hearts of old and adult rats. We have shown a significant decrease of the rate of relaxation, dp/dt_{\min} (-5.466 mm Hg/sec \pm 391 mm Hg/sec in old hearts compared to -8.131 mm Hg/sec \pm 308 mm Hg/sec in the adult group). The time constant of LV relaxation, Tau g in old rats was 1.5 times higher than in the control group (15.8 ± 0.49 ms in old rats versus 11.0 ± 0.2 ms in adult rats). In addition, in the old rats, end-diastolic pressure, EDP was three times higher than in adult rats (10.6 ± 0.7 mm Hg compared to 3.45 ± 0.37 mm Hg). We also found that end-diastolic stiffness, EDS in old rats was 2 times higher than in control group (0.23 ± 0.05 mm Hg/ μ L and 0.108 ± 0.03 mm Hg/ μ L, respectively).

Thus, reduction in the rate of LV relaxation together with an increase of the time constant

of left ventricular relaxation, end-diastolic pressure and end-diastolic stiffness reflect LV diastolic dysfunction and abnormal heart relaxation in old rats. Diastolic relaxation is often related to the disrupted energy-dependent Ca^{2+} transport to the sarcoplasmic reticulum and extracellular environment [26]. Reduction of ATP synthesis could be a sequence to the age-associated mitochondrial dysfunction, which develops through oxidative stress [27].

We have found that the injection of NaHS improves ventricular relaxation in old rats. For example, dp/dt_{\min} significantly increased by 20% ($P < 0.05$), and the Tau g decreased by 13% ($P < 0.05$) (Fig. 1). To establish the possible mechanisms of NaHS-induced effects on cardiohemodynamics in old rats, a series of biochemical experiments was conducted.

As shown in Table 1 and Fig. 2, the rates of O_2^{\bullet} generation in the mitochondria and homogenate of the heart from old rats exceed the control values 3.9 and 3.7 times, respectively. Dismutation of unstable O_2^{\bullet} to stable hydrogen peroxide (H_2O_2) was 2.1 and 1.4 times greater, compared to the control values. Hydrogen peroxide in turn may be partially reduced to highly reactive hydroxyl radical ($\cdot OH$) via Fenton reaction. In our experiments, the level of $\cdot OH$ was elevated in the mitochondria and homogenate of the heart from old rats 2.7 and 4.1 times, respectively, which could result from the violation of alternative, non-toxic peroxide metabolism. The

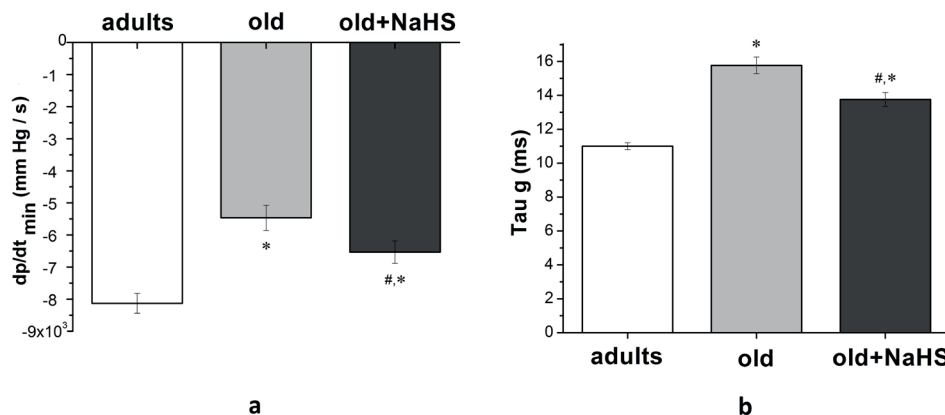


Fig. 1. The effect of NaHS on the rate of left ventricular (LV) relaxation (dp/dt_{\min}) (a) and the time constant of LV relaxation (Tau g) (b) in old rats. * $P < 0.05$ relative to adult animals; # $P < 0.05$ relative to old animals, which were not treated with NaHS

latter involves catalase activity which decreases with aging [28]. It is known that $\cdot\text{OH}$ can initiate LPO, primary and secondary products of which are DC and MDA, respectively. It has been revealed that DC levels in the mitochondria and homogenate of the heart from old rats were 9.2 and 8.4 times over the control values, and MDA pools increased 2.7 and 7.3 times, testifying to high intensity of LPO in old animals. Apart from the rate of generation and content of oxygen free radicals, and LPO intensity, we also examined an intensity of some basic ways of $\text{O}_2\cdot^-$ production (oxidative stress trigger). It is known that degradation products of purine nucleotides, xanthine and hypoxanthine, are oxidized to $\text{O}_2\cdot^-$ and uric acid by xanthine oxidase [29, 30]. Since xan-

thine oxidase is a superoxide-producing enzyme which activity increases in hypoxia, it may serve as a marker of xanthine oxidase way of $\text{O}_2\cdot^-$ production, and, simultaneously, a marker of hypoxia and intensity of ATP degradation. According to the results obtained, the levels of uric acid in old animals exceed the control values 11.9 and 2.6 times. It is also known that free radicals, formed by xanthine oxidase and NADPH oxidase, activate phospholipase A2 by increasing the concentration of intracellular Ca^{2+} , which ensures the release of arachidonic acid from phospholipids of the cell membrane [31-33]. In the heart homogenates from old rats, pools of free arachidonic acid increased 2.2 times. Free arachidonic acids converted to TxB2

Table 1. The absolute values of oxidative stress markers in the mitochondria (MCH) and homogenate of the heart from adults, old and old after NaHS administration rats ($M \pm m$, $n=5$)

		Adults	Old	Old + NaHS
$\text{O}_2\cdot^-$ generation rate, standart units	MCH	4.46 \pm 0.41	17.54 \pm 4.44*	2.6 \pm 0.34 [#]
	Homogenate	3.49 \pm 0.59	12.98 \pm 2.02*	1.73 \pm 0.23 ^{#,*}
H_2O_2 - contents, pmol/ mg protein	MCH	12.2 \pm 1.6	25.71 \pm 3.41*	6.26 \pm 0.51 ^{#,*}
	Homogenate	2.79 \pm 0.35	3.96 \pm 0.36	1.15 \pm 0.19 ^{#,*}
$\cdot\text{OH}$ generation rate, standart units	MCH	4.2 \pm 0.35	11.34 \pm 1.97*	6.57 \pm 0.85 [#]
	Homogenate	0.87 \pm 0.09	3.54 \pm 0.52*	0.83 \pm 0.04 [#]
Diene conjugates, ng/mg protein	MCH	3.6 \pm 0.23	32.98 \pm 2.5*	7.18 \pm 1.29 ^{#,*}
	Homogenate	3.4 \pm 0.47	28.52 \pm 2.28*	6.82 \pm 0.71 ^{#,*}
Malonic dialdehyde, nmol/mg protein	MCH	2.06 \pm 0.38	5.61 \pm 0.48*	1.3 \pm 0.16 [#]
	Homogenate	3.75 \pm 0.43	27.23 \pm 1.86*	7.4 \pm 1.01 ^{#,*}
Arachidonic acid, pmol/ mg protein	MCH	20.6 \pm 3.8	7.03 \pm 1.15*	21.9 \pm 2.49 [#]
	Homogenate	5.43 \pm 0.58	11.85 \pm 1.55*	1.62 \pm 0.09 ^{#,*}
Thromboxane B2, pmol/ mg protein	MCH	2.37 \pm 0.16	2.62 \pm 0.33	0.41 \pm 0.02 ^{#,*}
	Homogenate	2.25 \pm 0.2	2.4 \pm 0.46	0.6 \pm 0.02 [#]
Leukotriene C4, pmol/ mg protein	MCH	1.26 \pm 0.12	1.35 \pm 0.15	0.3 \pm 0.05 ^{#,*}
	Homogenate	0.9 \pm 0.02	0.98 \pm 0.16	0.29 \pm 0.02 [#]
Uric acid, nmol/mg protein	MCH	1.19 \pm 0.26	14.18 \pm 1.27*	4.05 \pm 0.47 ^{#,*}
	Homogenate	1.98 \pm 0.38	5.12 \pm 0.5*	1.57 \pm 0.27 [#]

* P < 0.05 relative to adult animals (100%). # P < 0.05 relative to old rats, which were not treated with NaHS.

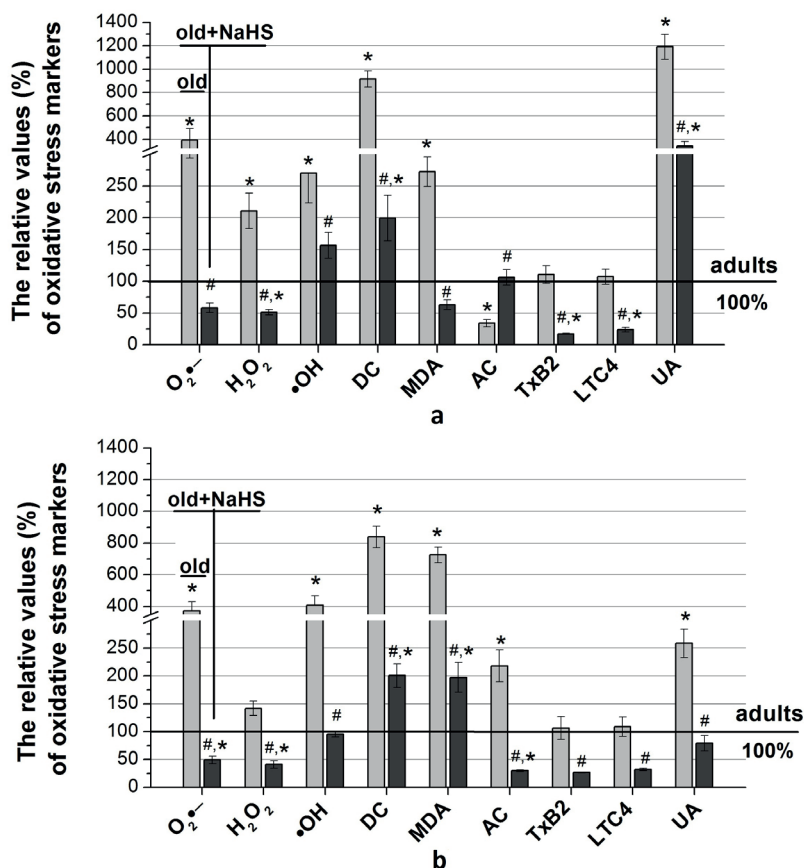


Fig. 2. The relative values of oxidative stress markers in the mitochondria (a) and homogenate (b) of the heart from old rats before and after NaHS injection: $O_2^{\bullet-}$ generation rate, the contents of H_2O_2 , the rate of $\bullet OH$ generating, the content of diene conjugates (DC), the content of malondialdehyde (MDA), the content of arachidonic acid (AC), the content of thromboxane B2 (TxB2), the content of leukotriene C4 (LTC4) and uric acid (UA). * $P < 0.05$ relative to adult animals (100%). # $P < 0.05$ relative to old rats, which were not treated with NaHS

and LTC4, by cyclooxygenase and lipoxygenase, respectively, with simultaneous $O_2^{\bullet-}$ generation. In our experiments, the levels of TxB2 and LTC4 did not differ from the control values either in the mitochondria or in homogenate of the heart from old animals.

Thus, in the heart tissues of old rats, xanthine- and NADPH- oxidase pathways of $O_2^{\bullet-}$ generation are activated, and ROS generation ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$) is enhanced, resulting in the development of oxidative stress and LPO.

Table 2 and Fig. 3 show that in old rats, disruption of constitutive de novo NO syntheses develop simultaneously with oxidative stress. Nitric oxide, synthesized by cNOS (eNOS + nNOS) through the oxidation of L-arginine as

the substrate, is a powerful cardiovascular regulator. At that, both the gas itself and its oxidized form, NO_2^- , are involved in the cardiovascular regulation [34]. However, it should be noted that in some cases cNOS may act as a catalyst for $O_2^{\bullet-}$ generation instead of NO, due to cNOS uncoupling. The latter is observed at lowering of L-arginine bioavailability, in particular, due to enhancing of either arginase activity or a cNOS cofactor, BH4, as a result of its oxidation by radicals $O_2^{\bullet-}$ or $ONOO^-$ [35]. It has been revealed that in the mitochondria and homogenate of the heart from old animals, cNOS activity decreases 2.1 and 2 times, respectively, relative to controls; NO_2^- pools as a marker of both constitutive synthesis of NO and oxygenation

Table 2. The absolute values of nitrosativestress-, constitutive synthesis of NO markers and H₂S levels in the mitochondria (MCH) and homogenate of the heart from adults, old and old after NaHS administration rats (M±m, n=5)

		Adults	Old	Old + NaHS
cNOS, pmol/min/ mg protein	MCH	3.64±0.27	1.71±0.12*	12.53±2.81 ^{#,*}
	Homogenate	6.99±1.11	3.37±0.45*	8.56±1.32 [#]
iNOS, pmol/min/ mg protein	MCH	1.5±0.06	3.66±0.62*	1.39±0.25
	Homogenate	1.78±0.26	15.88±1.18*	3.84±0.68 ^{#,*}
Nitrate- nitrite reductase, pmol/min/ mg protein	MCH	0.86±0.05	2.77±0.45*	0.51±0.03 [#]
	Homogenate	0.49±0.05	2.42±0.32*	0.63±0.04 ^{#,*}
Arginase, pmol/min/ mg protein	MCH	2.11±0.17	8.78±1.05*	2.23±0.36 ^{#,*}
	Homogenate	1.07±0.1	4.23±0.31*	0.54±0.05 ^{#,*}
NO ₂ ⁻ , pmol/ mg protein	MCH	488.2±60.3	159.33±30.68*	655.6±97.13 [#]
	Homogenate	354.4±22.6	214.88±30.6	825.57±68.61 ^{#,*}
NO ₃ ⁻ , nmol/mg protein	MCH	76.3±4.1	83.41±11.72	17.8±1.09 ^{#,*}
	Homogenate	11.72±0.64	75.45±8.28*	16.78±2.9 [#]
LMWNT, pmol/ mg protein	MCH	735.24±84.9	375.66±26.03*	1305.51±144.17 ^{#,*}
	Homogenate	178.52±16.36	67.84±7.12*	128.12±9.46 ^{#,*}
cNOS coupling index, standart units	MCH	0.8±0.08	0.1±0.02*	4.85±0.99 ^{#,*}
	Homogenate	1.94±0.43	0.26±0.05*	4.94±0.34 ^{#,*}
H ₂ S, nmol/mg protein	MCH	4.58±0.3	2.38±0.45*	9.69±1.53 ^{#,*}
	Homogenate	22.97±2.13	12.1±1.47*	39.49±2.05 [#]

* P < 0.05 relative to adult animals (100%). # P < 0.05 relative to old rats, which were not treated with NaHS.

are reduced 3.1 and 1.6 times; arginase activity increases 4.2 and 4 times, and cNOS coupling index is reduced 8 and 7.5 times (see Fig. 3, 4). Thus, during oxidative stress, not only constitutive de novo synthesis of NO is reduced, but also cNOS uncoupling develops, leading to enhanced O₂^{•-} production, and hence deepening of oxidative stress.

Apart from the well-known role of nitric oxide as a physiological regulator in the cardiovascular system, excessive simultaneous NO- and oxidant production may cause nitrosative stress. At present, some ways of excessive NO production have been identified: through increased iNOS activity, due to salvage of NO metabolites (NO₃⁻ and NO₂⁻) by relevant reductases, or decomposition of low-

molecular weight nitrosothiols (LMWN). In our studies, iNOS activity increased 2.4 and 8.9 times, the total reductase activity increased 3.2 and 4.9 times, but the levels of LMWNs were reduced 2 and 2.6 times (see Fig. 3). Excess NO when interacting with O₂^{•-} promotes generation of a toxic compound, ONOO⁻, possessing the wide range of damaging actions – from LPO, inactivation of enzymes and ion channels to inhibition of mitochondrial respiration. Peroxynitrite decomposes to form NO₃⁻ [36, 37]. The pools of the latter in the heart homogenate of old animals exceeded the control value 6.4 times.

Thus, oxidative stress in old animals results in cNOS uncoupling, a decrease in constitutive NO synthesis, enhanced generation of O₂^{•-} and

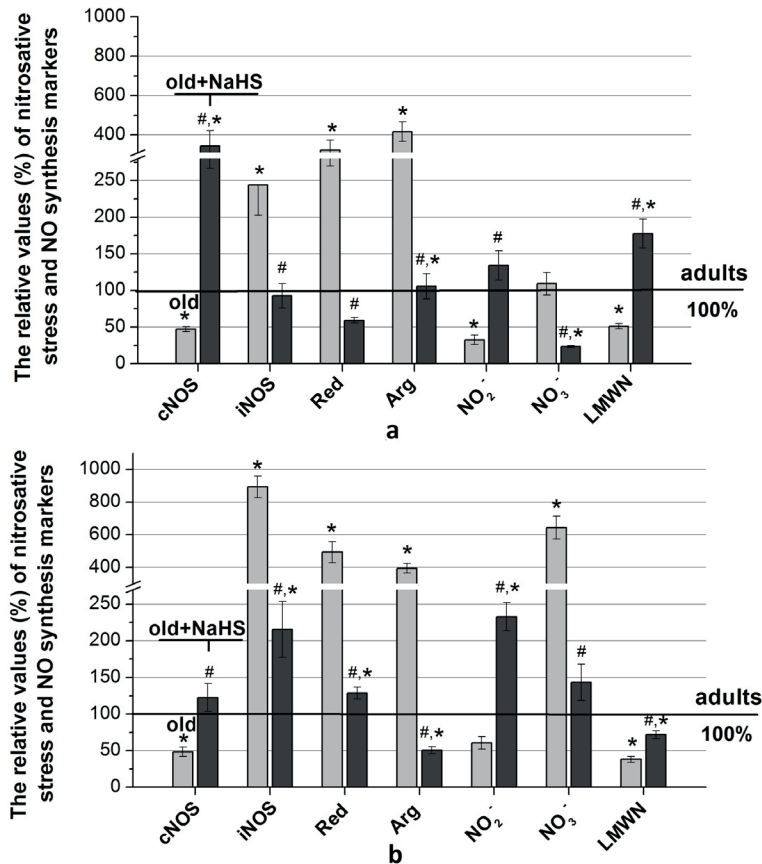


Fig. 3. The relative values of nitrosative stress and constitutive synthesis of NO markers in the mitochondria (a) and homogenate (b) of the heart from old rats before and after NaHS injection: activity of cNOS, activity of iNOS, nitratereductase activity (Red), arginase activity (Arg), NO₂⁻ content, content of NO₃⁻, the content of low-molecular-weight nitrosothiols (LMWN). *P < 0.05 relative to adult animals (100%). # P < 0.05 relative to old rats, which were not treated with NaHS

its highly toxic derivative ONOO⁻, which results in diastolic dysfunction.

A decrease in endogenous H₂S pools 1.9 times (see Fig. 4) in both the mitochondria

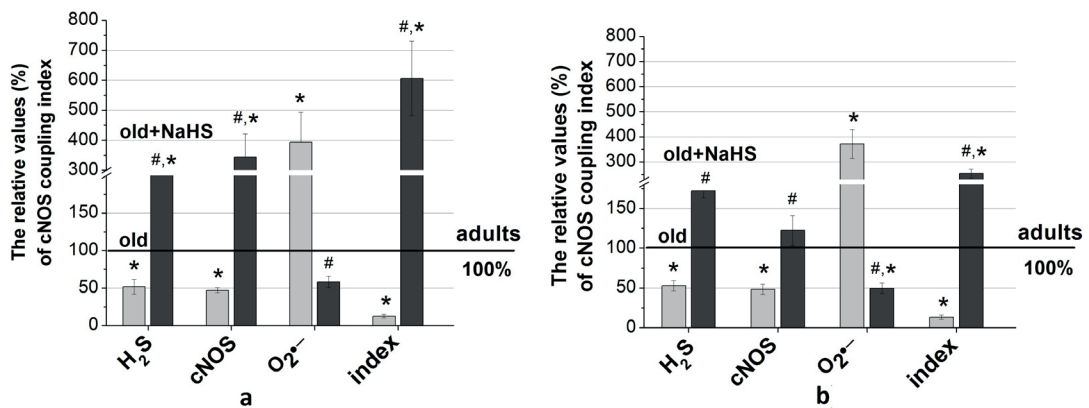


Fig. 4. The relative values of constitutive NO-synthase coupling index and related indices in the mitochondria (a) and homogenate (b) of the heart from old rats before and after NaHS injection: H₂S pools, cNOS activity, the rate of O₂^{•-} generation, cNOS coupling index (index). * P < 0.05 relative to adult animals (100%). # P < 0.05 relative to old rats, which were not treated with NaHS

and homogenate of the heart from old rats should be separately noted, as the latter serves as a regulator of NO synthesis and powerful cardio- and vasoprotector [7-10]. The injection of exogenic hydrogen sulfide donor, NaHS, significantly increased the amount of H₂S both in the mitochondria and homogenate of the heart from old animals, which was accompanied by a significant inhibition of both oxidative and nitrosative stress. Oxidative stress (see Fig. 2) was diminished due to the inhibition of all the studied ways of O₂^{•-} generation, and nitrosative stress (see Fig. 3) was inhibited by reducing the excessive generation of NO and its highly toxic derivative peroxynitrite. At the same time, the recovery of cNOS coupling (see Fig. 4) and increased constitutive de novo synthesis of NO were observed. Restoration of redox status quickly led to an improvement in diastolic function of the heart in old animals.

CONCLUSIONS

1. In the heart of old rats, we observed both oxidative and nitrosative stress, cNOS uncoupling and reduced constitutive de novo synthesis of nitric oxide. These changes are accompanied by a decrease of H₂S pools.

2. The diastolic function of the heart in old rats was impaired (decreased rate of relaxation, increased time *constant* of left ventricular *relaxation*, end-diastolic pressure and end-diastolic stiffness).

3. Sodium hydrosulfide (NaHS) suppresses oxidative and nitrosative stress, restores NO coupling and enhances constitutive de novo synthesis of nitric oxide.

4. Administration of NaHS improves left ventricular relaxation in old rats.

К.О. Драчук, Н.О. Дорофеева, В.Ф. Сагач

РОЛЬ СІРКОВОДНЮ У ВІДНОВЛЕННІ ДІАСТОЛІЧНОЇ ФУНКЦІЇ СЕРЦЯ ПІД ЧАС СТАРІННЯ

Вивчали вплив донора сірководню NaHS на вільнорадикальний стан серця, на стан спряження конститутивних

NO-синтаз (cNOS) та показники діастолічної функції серця у старих щурів. Встановили розвиток оксидативного і нітрозативного стресу в мітохондріях і гомогенаті серця. Наслідком цього є неспряження (uncoupling) стану cNOS і зниження конститутивного синтезу NO. В результаті, у старих щурів порушувалася діастолічна функція серця (зменшення на 33% максимальної швидкості зниження тиску (dp/dt_{min}), збільшення в 1,5 раза константи активного розслаблення (Tau g), кінцево-діастолічного тиску (в 3 рази) та кінцево-діастолічної жорсткості (в 2 рази)). Встановлено, що NaHS суттєво пригнічував оксидативний і нітрозативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез NO. Це покращувало діастолічну функцію серця у старих щурів внаслідок зростання dp/dt_{min} і зменшення Tau g.

Ключові слова: старіння; серце; оксидативний стрес; нітрозативний стрес; неспряження cNOS; сірководень.

К.О. Драчук, Н.А. Дорофеева, В.Ф. Сагач

РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В ВОССТАНОВЛЕНИИ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА ПРИ СТАРЕНИИ

Изучали влияние донора сероводорода NaHS на свободнорадикальное состояние сердца, сопряжение конститутивных NO-синтаз (cNOS) и показатели диастолической функции сердца. Установлено развитие оксидативного и нитрозативного стресса в митохондриях и гомогенате сердца старых крыс. Следствием этого есть несопряжение (uncoupling) cNOS и снижение конститутивного синтеза NO. В результате, у старых крыс развивалась диастолическая дисфункция (снижение на 33% максимальной скорости падения давления (dp/dt_{min}), увеличение в 1,5 раза константы активного расслабления (Tau g) конечно-диастолического давления (в 3 раза) и конечно-диастолической жесткости (в 2 раза)). Введение NaHS существенно угнетало оксидативный и нитрозативный стресс, восстанавливало сопряжение cNOS и увеличивало конститутивный синтез NO. Это способствовало улучшению диастолической функции в результате увеличения на 20% dp/dt_{min} и уменьшения на 13% Tau g.

Ключевые слова: старение; сердце; оксидативный стресс; нитрозативный стресс; несопряжение NO; сероводород.

REFERENCES

1. Hollingsworth KG, Blamire AM, Keavney BD, Macgowan GA. Left ventricular torsion, energetics, and diastolic function in normal human aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302:885–92.
2. Schmidt U, Zhu X, Lebeche D, Huq F, Guerrero JL, Hajjar RJ. In vivo gene transfer of parvalbumin improves diastolic function in aged rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:318–23.
3. Zhang Y, Tocchetti CG, Krieg T, Moens AL. Oxidative

- and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(8):1531–40.
4. Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; 3(3):221–9.
 5. Dorofeyeva NA, Kotsjuruba AV, Sagach VF. NOS uncoupling evokes oxidative stress and the cardiohemodynamic disorders in hypertension. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2016; 7(1):71–79.
 6. Roe ND, He EY, Wu Z, Ren J. Folic acid reverses nitric oxide synthase uncoupling and prevents cardiac dysfunction in insulin resistance: role of Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II. *Free Radic Biol Med.* 2013; 65:234–43.
 7. Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S, et al. H₂S Protects Against Pressure Overload Induced Heart Failure via Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). *Circulation.* 2013; 127(10):1116–27.
 8. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111(8):3182–7.
 9. Shen Y, Zhen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ. The cardioprotective effects of hydrogen sulfide in heart diseases: from molecular mechanisms to therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015 [Electronic resource]. Access mode <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/925167/>
 10. Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014; 114(4):730–7.
 11. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008; 9:1422–34.
 12. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Sagach VF. Hydrogen sulfide donor, NaHS, recovers constitutive NO synthesis and endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats. *Fiziol Zh.* 2015; 61(6):3–10. [Ukrainian].
 13. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60(11):1346–52.
 14. Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge J. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal.* 1988; 33:59–90.
 15. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem.* 1984; 141(1):69–74.
 16. Sharipov RR, Kotsjuruba AV, Kopchuk BS, Sagach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria under focal cerebral ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Int J Phys Pathophysiol.* 2015; 6(2):157–64.
 17. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem.* 1996; 42:498–506.
 18. Mihara M, Uchiyama M. Determination malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978; 86(1):271–8.
 19. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991; 291(1):145–149.
 20. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer J Physiol.* 1999; 277(5):797–804.
 21. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in
 22. biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(5):645–57.
 23. Green LL, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [5N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1):131–8.
 24. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal. Biochem.* 1980; 107:51–5.
 25. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyn'ska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh.* 2004; 50(2): 49–63 [Ukrainian].
 26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265–75.
 27. Asp ML, Martindale JJ, Heinis FI, Wang W, Metzger JM. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(4):895–900.
 28. Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, et al. Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell.* 2014; 13(1):39–48.
 29. Sullivan-Gunn MJ, Lewandowski PA. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatr.* 2013; 13:104.
 30. Griguer CE, Oliva CR, Kelley EE, Giles GI, Lancaster JR Jr, Gillespie GY. Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66(4):2257–63.
 31. Kayyali US, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R, Hassoun PM. Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; 276(17):14359–65.
 32. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem.* 2008; 106(1):45–55.
 33. Brown WJ, Chambers K, Doody A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators

- of membrane shape and function. *Traffic*. 2003; 4(4):214–21.
34. Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res*. 2004; 45(2): 205–13.
35. Jensen FB. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787(7):841–8.
36. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiry C, Sónchez-Ferrer CF, Rodríguez-Macas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol*. 2012; [Electronic resource]. Access mode <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00132/full>
37. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5):1424–37.
38. Szaby C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 1996; 6(2):79–88.

Received 24.05.2016

Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy

O.S. Zapukhliak, O.V. Netsyk, O.S. Rasulova, D.S. Isaev

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

The CA3 and CA1 regions are the main stages of the “three-synaptic pathway”, which plays a role in the generation of hyper-synchronous events in the hippocampus. Under certain experimental conditions, this brain structure might support pathological epileptiform synchronization that is independent of active chemical synaptic transmission. In present work, we estimated the conditions that would facilitate non-synaptic synchronization of the hippocampus. Non-synaptic epileptiform activity was induced in hippocampal slices by the omission calcium ions from the extracellular milieu. The propensity of hippocampal regions to nonsynaptic interactions was estimated by measuring the delay time needed for the development of low- Ca^{2+} discharges in the CA3 and CA1. Next, an increase of neuronal excitability was induced by the pre-incubation of hippocampal slices in 4-aminopyridine (4-AP) and by the reduction of extracellular osmolarity. Pre-incubation of hippocampal slices with 4-AP under normal osmotic conditions resulted in decreased latency for non-synaptic discharges in the CA3, but not in the CA1. However, hypo-osmotic conditions caused increased excitability of the CA3 region, which resulted in decreased delay time for nonsynaptic discharges and this level of cellular excitability was not further enhanced by the pre-incubation with 4-AP.

Key words: low- Ca^{2+} seizure-like activity; 4-aminopyridine; hypo-osmolarity; hippocampus.

INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of partial epilepsy that is characterized by the recurrent seizures generated in temporal lobe structures, such as hippocampus, amygdala, and parahippocampal gyrus [1]. Furthermore, the hippocampus is considered one of the primer seats of seizure generation in the temporal lobe and hippocampal sclerosis is among the most common causes of TLE [2]. Since the mid of the last century, unilateral excision of the hippocampal formation is known to terminate seizures in humans [3]. However, the dramatic effect of hippocampal removal on memory functioning makes temporal lobectomy the least-choice procedure for seizure termination, and the lack of therapeutic methods for epilepsy treatment remains to be one the problems in modern neuroscience.

The question of how the process of seizure generation can be interrupted or prevented is one of the intensively studied. During the last several decades a multitude of *in vitro* and *in vivo* experimental models of hippocampal seizures has been developed, but still, the precise identification of functional deficits that underlie seizure generation and spread, remains to be illusive [4]. One of the modern experimental approaches in epilepsy research is to study the molecular conditions that arise in the nerve tissue during seizures and to model these conditions *in vitro* in order to manipulate them with various pharmacological agents [5].

In the 1980s it was demonstrated that lowering extracellular calcium (to the levels that block Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release) induces seizure-like activity in the hippocampus *in vitro* [6]. Similar discharges were later evoked

with Ca^{2+} -chelating agents *in vivo* [7]. Additionally, the observation that during seizures local calcium levels may drop to as low as 0.2 mmol/l, which is sufficient to block chemical synaptic transmission, indicates that low- Ca^{2+} (zero- Ca^{2+}) model of epileptic discharges represents a relevant tool for studying molecular and electric processes that occur in the brain during seizures [8].

The CA3 and CA1 regions are the main stages of the “three-synaptic pathway” of the hippocampus, which might play a role in the generation of hyper-synchronous events in this brain structure [9]. Hippocampal region CA1, due to its tight and laminar cellular organization and decreased extracellular volume fraction, can support local neuronal synchronization and give a way to synaptically free propagation of epileptiform events under low- Ca^{2+} conditions [8]. The region CA3 of the hippocampus has more recurrent synaptic connections than CA1 and is known to facilitate synchronized “inter-ictal” discharges due to CA3 pacemaker activity [10]. However, under non-synaptic conditions of low- Ca^{2+} milieu CA3 zone is reported to be less prone to seizure-like discharges than CA1 [6]. Thus, in present work, we aimed to estimate conditions that would facilitate synchronization of the CA3 neuronal net through non-synaptic interactions. We estimated the propensity of hippocampal regions to nonsynaptic interactions by measuring the delay time needed for the development of low- Ca^{2+} discharges in the CA3 and CA1. Next, we studied the effect of “epileptic experience” induced by pre-incubation of brain slices in potassium channel blocker 4-aminopyridine, on the delay time of low- Ca^{2+} -induced discharges. To evaluate how facilitation of non-synaptic interactions may affect hippocampal synchronization, we also studied the impact of decreased osmotic pressure of extracellular aCSF on hippocampal propensity to develop non-synaptic bursting.

METHODS

All experimental procedures were performed on Wistar rats according to the guidelines set

by the National Institutes of Health for the humane treatment of animals and approved by the Animal Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine.

Hippocampal slice preparation. Postnatal day 12-14 rats were deeply anesthetized using sevoflurane and decapitated. Transverse brain slices were prepared according to the technique described previously [11]. Briefly, brains were removed and placed in the ice-cold aCSF of the following composition, (in mmol/l): NaCl - 125, KCl - 3.5, CaCl_2 - 2, MgCl_2 - 1.3, NaH_2PO_4 - 1.25, NaHCO_3 - 24, and glucose - 11; pH of the aCSF was adjusted to 7.3-7.35. The cerebellum and the frontal lobe were removed, and 500 μm thick slices were cut using Vibroslice NVSL (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Slices were allowed to equilibrate at the room temperature and under constantly oxygenated aCSF for at least 1.5 - 2 hours before the experiment.

Extracellular recordings and data acquisition. For extracellular recordings slices were transferred to a submerged recording chamber and perfused with oxygenated aCSF (25-27°C) at a rate of 2-3 ml/min. Temperature control was performed with the Dual Temperature Controller (TC-144, Warner Instruments). Field potentials were obtained from the CA3 and CA1 pyramidal cell layer with extracellular glass microelectrodes (2–3 M Ω) filled with normal aCSF. Signals were amplified using a differential amplifier (A-M Systems, Carlsborg, WA), digitized at 10 kHz using analog-to-digital converter (NI PCI-6221; National Instruments, Austin, TX); online analysis was performed using the WinWCP program (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Offline analysis was performed using Clampfit (Axon Instruments) and Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA). Two-sample *t*-test, was used for statistical analysis. Data is presented as mean \pm SE.

Induction of epileptiform discharges by low- Ca^{2+} aCSF and pre-incubation in 4-aminopyridine containing aCSF. In the first set of experiments, non-synaptic epileptiform discharges were induced by perfusion hippocampal slices ($n = 9$) with “normal osmolarity” low- Ca^{2+} aCSF of the following composition, (in mmol/l): NaCl - 125, KCl - 5, MgCl_2 - 1, NaH_2PO_4 - 1.25, NaHCO_3 - 24, D-glucose - 11; pH = 7.35-7.4. In the experiments with pre-incubation of slices with 4-aminopyridine (4-AP), prior to switching to low- Ca^{2+} aCSF, hippocampal slices ($n = 9$) were perfused with “4-AP aCSF” of the following composition, (in mmol/l): 125 NaCl - 125, KCl - 5, CaCl_2 - 2, MgCl_2 - 1, NaH_2PO_4 - 1.25, NaHCO_3 - 24, D-glucose - 11, 4-AP - 100 μM . Following 20 min of 4-AP pre-incubation, perfusion solution was switched to the aCSF with omitted Ca^{2+} ions (“low- Ca^{2+} + 4-AP aCSF”) to induce non-synaptic epileptiform activity.

Induction of epileptiform discharges in hypo-osmotic aCSF. In next set of experiments ($n = 30$), non-synaptic epileptiform discharges were induced under hypo-osmotic conditions using “hypo-osmotic low- Ca^{2+} aCSF” of the following composition (in mmol/l): NaCl - 115, KCl - 5, MgCl_2 - 1, NaH_2PO_4 - 1.25, NaHCO_3 - 24, D-glucose - 11. Similarly, pre-incubation with 4-AP was performed in “hypo-osmotic 4-AP aCSF” ($n = 10$), of the following composition, (in mmol/l): NaCl - 115, KCl - 5, CaCl_2 - 2, MgCl_2 - 1, NaH_2PO_4 - 1.25, NaHCO_3 - 24, D-glucose - 11, 4-AP - 100 μM . Following 20 min of 4-AP pre-incubation, perfusion was switched to hypo-osmotic aCSF with omitted Ca^{2+} ions (“hypo-osmotic low- Ca^{2+} + 4-AP aCSF”) to induce non-synaptic epileptiform activity. A total of 58 hippocampal slices were used in this study. All chemicals were purchased from «Sigma» (USA).

RESULTS AND DISCUSSION

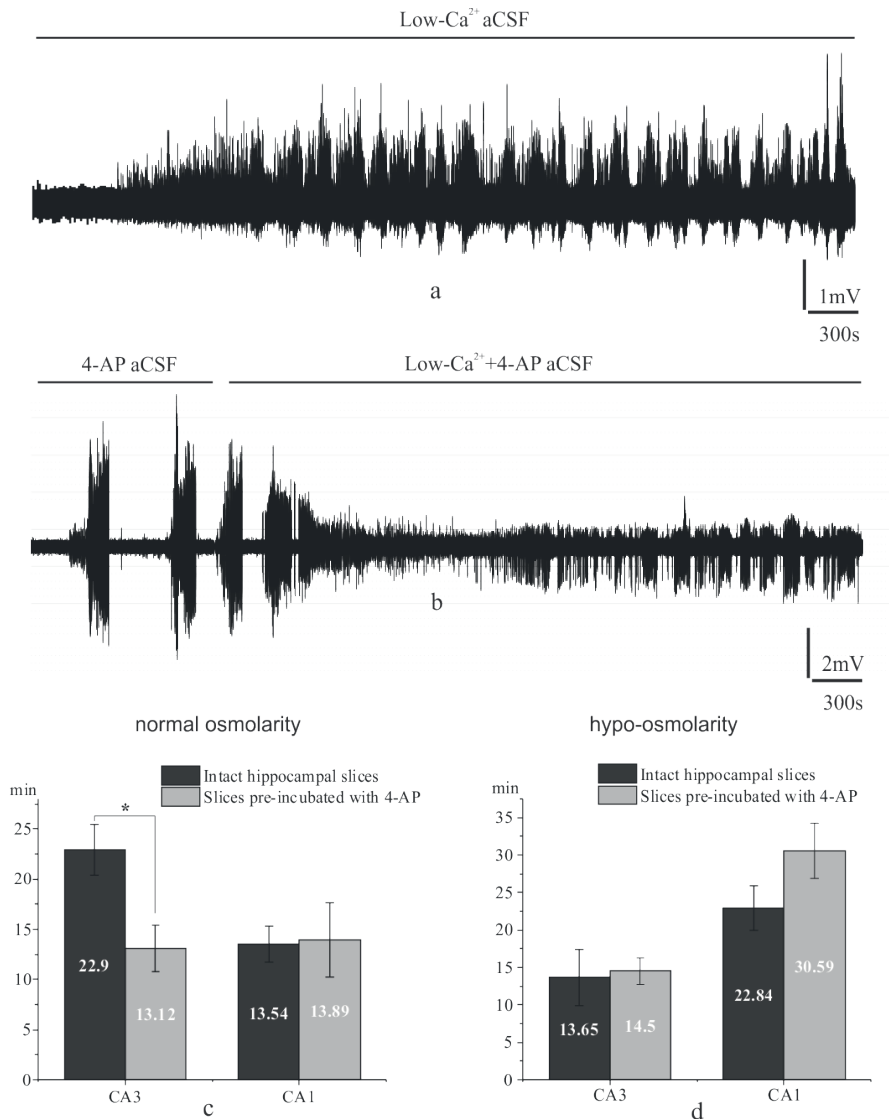
Perfusion hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF is known to block active chemical

synaptic transmission and induce non-synaptic epileptiform discharges in rat hippocampal slices [12]. Low- Ca^{2+} -induced epileptiform discharges represent synchronized action potentials of thousands of pyramidal cells, which can be recorded extracellularly in the CA3 and CA1 regions as continuously firing population spikes (Figure, a), [13,14]. Unlike the most *in vitro* models of epilepsy (low- Mg^{2+} , bicuculline, and 4-AP), in low- Ca^{2+} aCSF epileptiform discharges are not synchronized between the CA3 and CA1 zones due to the absence of active chemical synaptic transmission [6,15,16,17]. Therefore, low- Ca^{2+} milieu induces “local” hippocampal synchronization, which originates mostly in the CA1 region. The hippocampal propensity to non-synaptic synchronization depends on several factors among which are: *i*) laminar organization of neuronal structure; *ii*) resistivity and composition of extracellular medium; *iii*) excitability of neuronal membranes and number of electrical contacts between them [6,8].

In the first part of present work, we compared the delay time for low- Ca^{2+} epileptiform activity in “control” hippocampal slices with the delay time in hippocampal slices exposed to 4-AP pre-incubation. These experiments were performed under normal osmotic conditions (NaCl - 125 mmol/l). The delay time was measured as latent period in minutes from the start of perfusion slices with low- Ca^{2+} aCSF until the occurrence of non-synaptic epileptiform activity in the CA3 and CA1. Perfusion hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF induced non-synaptic bursting with the latency of 22.9 ± 2.54 min in CA3 and 13.54 ± 1.82 min in CA1 ($n_{\text{CA3}} = 5$, $n_{\text{CA1}} = 8$, $P = 0.01$, Figure, a-c). This observation is consistent with previous results that CA1 region is more prone to low- Ca^{2+} epileptiform activity than CA3, possibly due to more tight cellular organization in CA1 compared to CA3 [8]. Pre-incubation with 4-AP resulted in decreased latency time of low- Ca^{2+} discharges in CA3 but not in CA1: the delay time for non-synaptic discharges in 4-AP pre-incubated slices was

13.12±2.34 min in CA3 and 13.89±3.70 min in CA1 ($n_{CA3} = 8$, $n_{CA1} = 8$, $P = 0.86$, Figure, c). Thus, under normal osmotic conditions (NaCl - 125 mmol/l), compared to the control, pre-incubation with 4-AP resulted in decreased latency of low- Ca^{2+} discharges in the CA3, but not in the CA1 zone.

Decrease in extracellular osmolarity is known to promote non-synaptic interactions between the cells [8]. Shrinkage of extracellular space due the cell swelling under hypo-osmotic conditions results in the increased proximity of cellular membranes. The latter enables currents produced on the one membrane to affect the



Non-synaptic epileptiform discharges induced by perfusion hippocampal slices with low- Ca^{2+} aCSF. a – extracellular recording obtained from CA3 region in low- Ca^{2+} aCSF of normal osmolarity (Na 125 mmol/l). b – extracellular recording of epileptiform activity obtained from CA3 region, slice was pre-incubated with 4-AP, 100 μ M, perfusion solution was then switched to the low- Ca^{2+} aCSF, which resulted in appearance of non-synaptic epileptiform discharges. c – delay time (min) for low- Ca^{2+} non-synaptic epileptiform discharges under normal osmotic conditions (NaCl – 125 mmol/l): pre-incubation of slices with 4-AP significantly decreased the delay time for low- Ca^{2+} epileptiform activity in CA3 ($P = 0.019$), but not in CA1 ($P = 0.93$). d – under hypo-osmotic conditions (NaCl - 115 mmol/l), pre-incubation of hippocampal slices with 4-AP had no significant effect on delay time of low- Ca^{2+} epileptiform discharges both in CA3 ($P = 0.84$) and CA1 ($P = 0.17$)

membrane potential of the opposing membrane and to reduce action potential threshold of it. Therefore, we also studied the impact of 4-AP pre-incubation on the latency of low- Ca^{2+} epileptiform discharges under hypo-osmotic conditions, induced by reducing extracellular sodium concentration from 125 mmol/l to 115 mmol/l. Under hypo-osmotic conditions, (NaCl - 115 mmol/l), CA3 region became more prone to non-synaptic bursting than CA1. The delay time for low- Ca^{2+} discharges was 13.65 ± 3.74 min in CA3 and 22.84 ± 2.97 min in CA1 ($n_{\text{CA3}} = 8$, $n_{\text{CA1}} = 20$, $P = 0.09$, Figure, d). Pre-incubation with 4-AP in hypo-osmotic conditions had no effect on the latency of low- Ca^{2+} discharges both in CA3 and CA1: the delay time in CA3 was 14.5 ± 1.76 min and in CA1 30.59 ± 3.70 min ($n_{\text{CA3}} = 8$, $n_{\text{CA1}} = 7$, $P = 0.001$, Figure, d).

Our results indicate that “epileptic experience” induced by 4-AP pre-incubation can increase CA3 propensity to non-synaptic discharges under normal osmotic conditions. However, under hypo-osmotic conditions increased excitability of the CA3 region results in decreased delay time for nonsynaptic discharges and this level of cellular excitability cannot be further enhanced by the pre-incubation with 4-AP.

While low- Ca^{2+} aCSF is a model of artificial epileptiform discharges, conditions that promote non-synaptic hippocampal activity occur *in vivo* during seizures and include: drop in extracellular calcium, increase in extracellular potassium, and decrease in extracellular volume fraction (due to activity-dependent cell swelling) [8, 18, 19]. Thus, during seizure episodes in the brain, mechanisms of non-synaptic neuronal interactions might affect cellular excitability and contribute to pathological hippocampal synchronization.

Decreased osmotic pressure of extracellular medium in the brain may occur during various pathological states that may include over-hydration, hypothalamic or renal dysfunction, and seizures [8]. Reduction of extracellular osmolarity results in neuronal swelling and promotes increased cellular excitability, which is crucial for seizure generation. Thus, under-

standing the mechanisms that affect hippocampal susceptibility to non-synaptic epileptiform discharges may contribute to the better understanding and control of the pathological synchronization in the brain.

CONCLUSIONS

1. Under normal osmotic conditions, CA1 region of hippocampus is more prone to non-synaptic epileptiform discharges than CA3.

2. Pre-incubation of hippocampal slices with 4-AP under normal osmotic conditions results in decreased latency for non-synaptic discharges in CA3 but not in CA1.

3. Under hypo-osmotic conditions, CA3 area of hippocampus becomes more prone to non-synaptic discharges than CA1.

4. Pre-incubation of hippocampal slices with 4-AP under hypo-osmotic conditions has no effect on the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform discharges.

О.С. Запукхляк, О.В. Нецик, О.С. Расулова, Д.С. Ісаєв

МОДУЛЯЦІЯ ГІПОКАМПАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ ДО НЕСИНАПТИЧНОЇ СИНХРОНІЗАЦІЇ У МОДЕЛІ ЕПІЛЕПСІЇ ІЗ ЗНИЖЕНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ КАЛЬЦІЮ

Несинаптичну епілептиформну активність викликали у зрізах гіпокампа вилученням іонів кальцію з позаклітинного середовища. Схильність ділянок гіпокампа до несинаптичної взаємодії між клітинами була визначена вимірюванням часової затримки (латентного періоду), необхідної для розвитку низькокальцієвої розрядки у зонах CA1 і CA3. Збільшення нейронної збудливості було викликане преінкубацією гіпокампальних зрізів з 4-амінопіридином (4-AP) і зниженням позаклітинного осмотичного тиску. Преінкубація гіпокампальних зрізів з 4-AP за умов нормального осмотичного тиску зменшила латентний період несинаптичного розряду у зоні CA3, але не в CA1. Отримані результати показали, що гіпоосмотичні умови та преінкубація з 4-AP можуть впливати на здатність CA3 ділянки гіпокампа генерувати несинаптичні епілептиформні явища.

Ключові слова: низькокальцієві епілептиформні явища; 4-амінопіридин; гіпоосмолярність; гіпокамп.

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

**О.С. Запыхляк, О.В. Нецык, О.С. Расулова,
Д.С. Исаев**

МОДУЛЯЦИЯ ГИППОКАМПАЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ К НЕСИНАПТИЧЕСКОЙ СИНХРОНИЗАЦИИ В МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ С ПОНИЖЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ КАЛЬЦИЯ

Несинаптическая эпилептиформная активность индуцировалась в срезах гиппокампа методом инкубации срезов в безкальциевом внеклеточном растворе. Склонность участков гиппокампа к несинаптическому взаимодействию оценивалась измерением времени задержки, необходимого для развития низкокальциевых разрядов в зонах СА1 и СА3. Увеличение нейронной возбудимости было вызвано преинкубацией гиппокампальных срезов с 4-аминопиридином (4-АР) и снижением внеклеточного осмотического давления. Преинкубация срезов с 4-АР при условиях нормального осмотического давления вызывала уменьшение латентного периода несинаптической разрядки в зоне СА3, но не в СА1. Полученные результаты показали, что гипоосмотические условия и преинкубация с 4-АР моделируют способность гиппокампальной зоны СА3 к генерации несинаптических эпилептоформных явлений. Ключевые слова: низкокальциевые эпилептиформные явления; 4-аминопиридин; гипоосмолярность; гиппокамп.

REFERENCES

1. Ko DY, Sahai-Srivastava S. Temporal lobe epilepsy. Retrieved May. 2006;7:2008.
2. Kuzniecky RI, Jackson GD. Magnetic resonance in epilepsy: neuroimaging techniques. Academic Press; 2005.
3. Penfield W, Milner B. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. AMA Arch Neurol Psychiatry. 1958 May 1;79(5):475-97.
4. Yin YH, Ahmad N, Makmor-Bakry M. Pathogenesis of epilepsy: Challenges in animal models. Iran J Basic Med Sci. 2013 Nov;16(11):1119.
5. Wong M. Epilepsy in a dish: an in vitro model of epileptogenesis. Epilepsy Curr. 2011 Sep;11(5):153-4.
6. Haas HL, Jefferys JG. Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices. J Physiol. 1984 Sep;354:185.
7. Feng Z, Durand DM. Low-calcium epileptiform activity

- in the hippocampus in vivo. J Neurophysiol. 2003 Oct 1;90(4):2253-60.
8. Jefferys JG. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. Physiol Rev. 1995 Oct 1;75(4):689-723.
9. Schwartzkroin PA, Prince DA. Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. Brain res. 1978 May 19;147(1):117-30.
10. Schwartzkroin PA, Prince DA. Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. Brain res. 1978 May 19;147(1):117-30.
11. 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 Jan 1;107(1):417-23.
12. Yaari Y, Konnerth A, Heinemann U. Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. Exp brain res. 1983 Jun 1;51(1):153-6.
13. Bikson M, Ghai RS, Baraban SC, Durand DM. Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero-Ca²⁺ model of epileptiform activity. J Neurophysiol. 1999 Nov 1;82(5):2262-70.
14. Snow RW, Dudek FE. Synchronous epileptiform bursts without chemical transmission in CA2, CA3 and dentate areas of the hippocampus. Brain res. 1984 Apr 30;298(2):382-5.
15. Perreault PA, Avoli MA. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. J Neurophysiol. 1991 Apr 1;65(4):771-85.
16. Köhling R, Gladwell SJ, Bracci E, Vreugdenhil M, Jefferys JG. Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg²⁺ in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. Neuroscience. 2001 Aug 15;105(3):579-87.
17. Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. GABA A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ménage à trois. Trends neurosci. 1997 Nov 1;20(11):523-9.
18. Feng Z, Durand DM. Effects of Potassium Concentration on Firing Patterns of Low-Calcium Epileptiform Activity in Anesthetized Rat Hippocampus: Inducing of Persistent Spike Activity. Epilepsia. 2006 Apr 1;47(4):727-36.
19. Fox JE, Bikson M, Jefferys JG. Tissue resistance changes and the profile of synchronized neuronal activity during ictal events in the low-calcium model of epilepsy. J Neurophysiol. 2004 Jul 1;92(1):181-8.

Received 03.08.2015

Співвідношення p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичної активності в гіпокампі щурів з ішемією-реперфузією головного мозку та експериментальним діабетом

Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці; e-mail: ajnora14@rambler.ru

Досліджено динаміку балансу показників p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичних процесів у гіпокампі щурів з експериментальним цукровим діабетом (ЦД), ускладненим неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку. Показано, що у тварин без ЦД після 20-хвилинної ішемії/одногодинної реперфузії в усіх полях гіпокампа активуються p53-проапоптотичні процеси на тлі посилення Bcl-2-антиапоптотичних у полях CA1, CA2, CA4 та їх депресії – у полі CA3. У ранньому постішемічному періоді в щурів із ЦД активність p53-проапоптотичних процесів у полях CA1, CA3, CA4 достовірно перевищує таку в щурів без діабету (площа p53-ІРМ на 110, 60, та 27 %), а в полі CA2 є суттєво нижчою. На 12-ту добу постішемічного періоду активація апоптозу в полі CA1 відбувається на тлі інертних антиапоптотичних процесів як у тварин без ЦД, так і з його наявністю, однак показники активності апоптозу в щурів із ЦД вищі (питомий вміст білка p53 та площа p53-ІРМ на 38 і 43 %). У цей період у полі CA2 тварин без ЦД виявлено деяку депресію антиапоптотичних процесів із незначним переважанням проапоптотичних, а на тлі ЦД – депресію обох механізмів, більше – антиапоптотичного; у полі CA3 щурів без ЦД – збереження активності проапоптотичних процесів та поглиблення в динаміці депресії антиапоптотичних, а за умов ЦД – пригнічення обох механізмів при суттєвішій депресії антиапоптотичного. На 12-ту добу експерименту в полі CA4 спостерігалися найзбалансованіші взаємовідносини вивчених процесів за рахунок їх паралельних та односпрямованих змін як у щурів без ЦД, так і з його наявністю. Результати свідчать про модифікуючий вплив ЦД на чутливість полів гіпокампа до ішемічно-реперфузійних пошкоджень.

Ключові слова: гіпокамп; цукровий діабет; ішемія-реперфузія головного мозку; апоптоз.

ВСТУП

Наслідки активації глутамат-кальцієвого каскаду упродовж перших годин ішемічно-реперфузійного ушкодження головного мозку зберігають свою значущість і в більш пізні терміни [1-4]. Вони індукують і підтримують віддалені наслідки ішемії, і в першу чергу – реакцію геному на гостру церебральну ішемію з включенням молекулярних програм [5-7]. Відомо, що разом з іншими відстроченими наслідками ішемії, активну участь у «доформуванні» вогнища інфаркту бере апоптоз, додатково пошкоджуючи зону пенумбри [8, 9]. Стійкість нейронів до ішемічних впливів значною мірою визначається співвідношенням їх про- та антиапоптотичного

© Т.М. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

потенціалу, яке суттєво залежить від балансу продуктів активації проапоптотичного гена p53 та антиапоптотичного – Bcl-2 [9, 10].

Важлива роль процесам апоптозу належить також у формуванні діабетичної енцефалопатії [11-13]. Взаємозв'язок цукрового діабету (ЦД) і зростання частоти та тяжкості перебігу інсультів доведений [14, 15], однак його механізми залишаються дослідженими недостатньо. У зв'язку з цим ми поставили за мету проаналізувати динаміку співвідношення p53-про- та Bcl-2-антиапоптотичної активності в полях гіпокампа щурів із ЦД, ускладненим неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на самцях білих нелінійних щурів, яких поділили на 6 груп. До I групи увійшли контрольні тварини, до II – щури, яким моделювали двобічну 20-хвилинну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією, до III – щури, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії, до IV – тварини з експериментальним ЦД, до V – щури з ЦД, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одногодинною реперфузією, до VI – щури з ЦД, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії.

ЦД відтворювали внутрішньоочеревинним введенням стрептозотозину («Sigma», США, 60 мг / кг) двомісячним щурам [16]. Через 4 міс у частини щурів із ЦД та в групі щурів аналогічного віку без діабету кліпсуванням обох загальних сонних артерій протягом 20 хв моделювали неповну глобальну ішемію мозку [17]. Ранні наслідки ішемічно-реперфузійного пошкодження гіпокампа вивчали через 1 год від початку реперфузії, а відстрочені – на 12-ту добу після моделювання ішемії. Наявність ЦД верифікували визначенням вмісту глюкози в крові (глюкозооксидазним методом) та вивченням морфологічного стану підшлункової залози; експериментальні групи формували з щурів, в яких рівень глікемії дорівнював або перевищував 10 ммоль/л.

Оперативні втручання та евтаназію тварин здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг внутрішньоочеревинно). Головний мозок якомога швидше вилучали в умовах низької температури, згідно з координатами стереотаксичного атласу [18] виділяли ділянки, що містять поля гіпокампа CA1, CA2, CA3 та CA4 і поміщали їх для 24-годинної фіксації в 10 %-й розчин Буена. Після відповідної гістологічної проводки здійснювали заливку препаратів у парафінові блоки.

Білки Bcl-2 та p53 виявляли методом імунофлуоресценції у серійних зрізах полів гіпокампа товщиною 5 мкм. Зрізи депарфінували в ксилолі, регідрували в нисхідних концентраціях етанолу, тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4). Для визначення вмісту білка Bcl-2 зрізи протягом 18 год інкубували у вологій камері при 4° C із первинними мишачими моноклональними антитілами до Bcl-2 щура (mouse IgG1 isotype, виробництва «Sigma Chemical», США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв (37° C) зі вторинними антитілами (козячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон'юговані з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC, «Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64.

Для визначення вмісту білка p53 регідровані зрізи гіпокампа упродовж 18 год інкубували у вологій камері при 4° C одночасно з первинними кролячими моноклональними антитілами до p53 щура та мишачими моноклональними антитілами до CD4 щура («Beckman Coulter», США), кон'югованими з FITC, промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії.

Bcl-2⁺ та p53⁺-клітини гіпокампа ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина) [19].

Дослідження здійснювали з дотриманням основних положень GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм t Стьюдента для незалежних виборок. Результати представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У полі гіпокампа СА1 шурів без ЦД після 20-хвилинної ішемії з одногодинною реперфузією у 2,1 раза зросла площа p53-імунореактивного матеріалу та питомий вміст білка p53, а також площа Bcl-2-IPM (в 1,4 раза) та питомий вміст білка Bcl-2 (в 1,2 раза) на тлі зниження на 33 % концентрації білка Bcl-2 (табл. 1, 2). Таким чином, у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді тут суттєво переважала активація проапоптотичних механізмів. У полі СА2 в цей час також виявлено активацію обох механізмів, що проявилось зростанням концентрації, питомого вмісту білка p53 та площі p53-IPM (у 2,9, 4,3 і 1,3 раза відповідно) на тлі збільшення питомого вмісту білка Bcl-2, площі Bcl-2-IPM (в 1,3 раза та на 63 %) і зниження концентрації цього білка (на 25 %). Отже, як і в полі СА1, активація проапоптотичних механізмів переважала над такою антиапоптотичних. У полі СА3 активація апоптозу (зростання питомого вмісту білка p53 та площі p53-IPM) відбувалася на тлі депресії антиапоптотичних процесів (зниження питомого вмісту білка Bcl-2 та площі Bcl-2-IPM), а в полі СА4 активація обох процесів була більш збалансованою, хоча активність апоптозу дещо переважала.

На 12-ту добу спостереження в полі гіпокампа СА1 шурів без фонового ЦД активність p53-залежних апоптотичних процесів залишалася приблизно на тому ж рівні, що й у ранньому терміні, а показники Bcl-2-залежних антиапоптотичних механізмів повернулися до рівня контрольних шурів. Отже, активація апоптозу в пізньому постішемічному періоді в полі СА1 відбувалася на тлі інертних антиапоптотичних процесів. У полі СА2 в цей час активність p53-проапоптотичних процесів дещо зменшувалася порівняно з раннім постішемічним терміном: повернулися до значень показників у тварин контрольної групи концентрація білка p53 та площа p53-IPM, а також знизився стосовно попереднього терміну спостереження питомий вміст білка p53.

Динаміка Bcl-2-антиапоптотичних процесів полягала в поверненні до рівня контролю площі Bcl-2-IPM та зниженні питомого вмісту білка Bcl-2. Оскільки концентрація білка Bcl-2 залишалася зниженою стосовно контролю, тому можна говорити про деяку депресію в цьому полі гіпокампа антиапоптотичних процесів та не дуже суттєве переважання проапоптотичних. У полі СА3 стосовно контролю знижувалася концентрація білка p53, залишалися підвищеними його питомий вміст та площа p53-IPM, зросла концентрація білка Bcl-2, однак зниження його питомого вмісту та площі Bcl-2-IPM стало суттєвим, ніж у ранньому терміні. Отже, в цьому полі в пізньому постішемічному періоді зберігався дисбаланс між про- та антиапоптотичними процесами, хоча й на іншому кількісному рівні.

Найбільш збалансовані взаємовідносини вивчених процесів на 12-ту добу постішемічного періоду в групі тварин без ЦД спостерігалися в полі СА4, в якому в цей період поверталися до значень у контрольних шурів питомий вміст білків p53 та Bcl-2 і площа матеріалу, імунореактивного за p53 та Bcl-2.

ЦД спричинив неоднозначні зміни досліджуваних показників у різних полях гіпокампа: у полі СА1, стосовно показників у шурів без такого захворювання, достовірно зросла площа p53-IPM, знизилася концентрація та питомий вміст білка Bcl-2, що можна оцінити як зниження антиапоптотичного захисту на тлі деякого посилення апоптозу; у полі СА2 не виявлено змін активності p53-позитивних клітин, але при цьому знизилася концентрація білка Bcl-2, зросли його питомий вміст та площа Bcl-2-IPM. Зміни двох останніх показників свідчать про підвищення як кількості Bcl-2-позитивних клітин, так й експресії ними білка Bcl-2. У полі СА3 шурів із ЦД виявлено зниження в 1,4 раза концентрації білка p53, зростання в 1,5 раза його питомого вмісту та у 2 рази – площі p53-IPM при одночасному зростанні питомого вмісту білка Bcl-2 (на 61 %) та площі Bcl-2-IPM

Таблиця 1. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію p53⁺-клітин полів гіпокампа контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом (M ± m)

Група спостереження	Концентрація білка p53 (E ₁₀₀)	Площа p53-імунореактивного матеріалу на 10 000 мкм ²	Питомий вміст білка p53 (E ₁₀₀)
Поле CA1			
Контроль	0,0041±0,0004	220,023±26,032	0,890±0,195
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0044±0,0003	435,478±44,637*	1,851±0,178*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0049±0,0005	441,657±45,205*	2,120±0,208*
Діабет	0,0037±0,0003	398,466±34,397*	1,286±0,126
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0040±0,0004	916,525±62,99***	3,521±0,368***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0048±0,0004	632,022±59,983***,****	2,928±0,227***
Поле CA2			
Контроль	0,0036±0,0002	625,076±57,356	1,951±0,241
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0104±0,0009*	800,043±69,727*	8,464±3,985*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0042±0,0004**	643,521±64,603	2,647±0,229*,**
Діабет	0,0040±0,0003	699,684±61,109	2,283±0,200
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0047±0,0005	732,827±73,878	3,321±0,361***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0044±0,0004	563,737±55,519****	2,064±0,311****
Поле CA3			
Контроль	0,0042±0,0002	336,359±32,509	1,307±0,130
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0041±0,0001	586,773±54,216*	2,270±0,242*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0037±0,0001***	461,571±44,328*	1,674±0,139*,**
Діабет	0,0031±0,0001*	663,05±67,461*	1,981±0,195*
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0033±0,0002	955,43±97,43***	2,468±0,207
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0038±0,0003***	581,898±58,612****,****	1,976±0,143****
Поле CA4			
Контроль	0,0041±0,0002	363,499±43,946	1,369±0,131
Ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0044±0,0002	701,116±73,506*	2,864±0,243*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0037±0,0001	424,165±49,632**	1,497±0,273**
Діабет	0,0037±0,0007	510,595±52,065*	1,484±0,223
Діабет та ішемія-реперфузія			
20 хв / год	0,0029±0,0001	892,845±87,274***	2,386±0,208***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0033±0,0001****	373,018±39,544****,****	1,185±0,246****

Примітка: тут та в табл. 2 – 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

(на 60 %). Таким чином, у цьому полі зміни вивчених про- та антиапоптотичних механізмів узгоджені і в кількісному відношенні відрізняються несуттєво. У полі СА4 вияв-

Таблиця 2. Вплив ішемії-реперфузії на реакцію Bcl-2⁺ клітин полів гіпокампа контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом (M ± m)

Група спостереження	Концентрація білка Bcl-2 (E _{1Ф})	Площа Bcl-2-імунореактивного матеріалу на 10 000 мкм ²	Питомий вміст білка Bcl-2 (E _{1Ф})
Поле СА1			
Контроль	0,0066±0,0006	286,843±27,545	1,590±0,131
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0052±0,0002*	402,018±41,185*	1,972±0,143*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0063±0,0005**	305,301±32,087**	1,605±0,197
Діабет	0,0047±0,0003*	278,209±30,339	1,198±0,146*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0047±0,0003	567,324±53,737***	2,333±0,234***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0051±0,0004	255,733±60,714****	1,154±0,255****
Поле СА2			
Контроль	0,0060±0,0003	433,303±43,088	2,217±0,232
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0045±0,0003*	707,067±52,372*	2,930±0,192*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0046±0,0002*	379,618±43,872**	1,617±0,202*,**
Діабет	0,00488±0,000009*	735,929±14,771*	3,446±0,059*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,00397±0,0001***	761,191±60,847	2,821±0,209***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0043±0,0002****	378,549±37,637*****	1,516±0,26*****
Поле СА3			
Контроль	0,0049±0,0002	466,054±45,285	2,122±0,241
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0052±0,0003	337,932±33,238*	1,606±0,141*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0064±0,0005*,**	226,167±38,269***	1,234±0,147*,**
Діабет	0,00492±0,00016	746,198±24,45*	3,421±0,064*
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0046±0,0002	507,706±58,156***	2,189±0,238***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0054±0,0003****	322,265±43,649*****	1,60±0,107***,****
Поле СА4			
Контроль	0,0060±0,0006	392,921±47,829	1,885±0,242
Ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0051±0,0002	643,459±42,154*	3,003±0,170*
Ішемія-реперфузія 12 діб	0,0052±0,0004	315,669±42,550**	1,468±0,230**
Діабет	0,0057±0,0005	383,333±33,860	1,889±0,142
Діабет та ішемія-реперфузія 20 хв / год	0,0041±0,0002***	645,847±62,663***	2,498±0,228***
Діабет та ішемія-реперфузія 12 діб	0,0049±0,0003****	278,721±29,850*****	1,27±0,263*****

лено зростання площі p53-IPM при інших незмінних параметрах активності цього гена; вірогідних змін Bcl-2-залежних процесів не виявлено.

У щурів із ЦД після 20-хвилинної ішемії та односторонньої реперфузії в полі СА1 зросли питомий вміст білка p53 та площа p53-IPM у 2,7 і 2,3 раза відповідно й питомий вміст білка Bcl-2 і площа Bcl-2-IPM в 1,95 раза та 2 рази стосовно показників у щурів із ЦД, неускладненим порушенням церебрального кровообігу. Порівняння абсолютних значень показників активності p53- та Bcl-2 залежних процесів свідчать, що в щурів із діабетом, на відміну від тварин контрольної групи, процеси апоптозу були інтенсивнішими, а напруженість антиапоптотичних процесів значно слабша, ніж проапоптотичних. У полі СА2 щурів із ЦД у ранньому постішемичному періоді реакція p53-позитивних клітин, на відміну від тварин із діабетом без ішемічного втручання, обмежилася зростанням питомого вмісту білка p53 в 1,45 раза. Принципово відмінною в цій групі була також реакція продуктів гена Bcl-2, яка полягала в зниженні питомого вмісту білка Bcl-2 на 18 % (у тварин без діабету він зріс на 32 %). Крім того, в щурів із ЦД була відсутня реакція площі Bcl-2-IPM. У сукупності ці факти свідчать про помірну активацію в полі СА2 щурів зазначеної експериментальної групи апоптотичних процесів на тлі депресії антиапоптотичних. У щурів із ЦД в полі СА3 зріс питомий вміст білка p53 та площа p53-IPM в 1,25 та 1,44 раза, тобто спрямування реакції було таким, як у тварин без діабету. Однак абсолютні значення цих показників перевищували такі за аналогічного втручання в щурів без діабету на 8 та 60 % відповідно. Отже, у тварин без ЦД постішемичне посилення проапоптотичних впливів відбувалося рівномірно за рахунок зростання числа p53-позитивних клітин та експресії ними білка p53, а у тварин із його наявністю – переважно за рахунок першого механізму. Крім того, у вказаному полі тварин із ЦД знизився питомий вміст білка Bcl-2 (в 1,6

раза) та площа Bcl-2-IPM (в 1,5 раза), однак значення цих показників перевищували такі у тварин без діабету в 1,4 та 1,5 раза. У полі СА4 щурів із ЦД після 20-хвилинної ішемії з односторонньою реперфузією зросли питомий вміст білка p53 на 74 % та площа p53-IPM – на 40 %, а отже, кратність підвищення цих показників була меншою, ніж у тварин без діабету за такого ж втручання. Збільшилися також на 30 % питомий вміст білка Bcl-2 та на 68 % – площа Bcl-2-IPM. Слід відмітити таку особливість – у даному полі абсолютні постішемичні значення змінених показників у тварин контрольної групи та щурів із діабетом, на відміну від інших полів, відрізняються мало. Це цілком закономірно, адже ЦД у цій зоні гіпокампа спричинив найменш суттєві зміни p53-залежних проапоптотичних механізмів та не призвів до достовірних порушень Bcl-2-процесів, і навіть додаткове навантаження на досліджувані механізми у вигляді ішемії-реперфузії не спровокувало видимих змін.

На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в полі СА1 тварин із ЦД залишалися підвищеними стосовно відповідних параметрів у тварин із діабетом без порушень мозкового кровообігу питомий вміст білка p53 та площа p53-IPM (у 2,3 та 1,6 раза), а отже, процеси апоптозу залишалися посиленними. Водночас, активність Bcl-2-залежних антиапоптотичних процесів поверталася до рівня, притаманного тваринам із ЦД. Таким чином, посилення апоптозу у відстроченому періоді в цьому полі гіпокампа відбувається на тлі відсутності протидії антиапоптотичних процесів. У полі СА2 тварин із ЦД питомий вміст білка p53 повернувся до рівня у тварин із діабетом без ішемічно-реперфузійних ускладнень та достовірно знизилася концентрація білка Bcl-2, його питомий вміст і площа Bcl-2-IPM. Останні два показники суттєво знизилися також і стосовно попереднього терміну спостереження, що свідчить про наростання з часом депресії антиапоптотичного потенціалу, яка перева-

жала над пригніченням антиапоптотичного. Динаміка постішемичних змін вивчених показників у полі СА3 щурів із ЦД полягала в достовірному зростанні стосовно параметрів за діабету без порушення церебрального кровообігу концентрації білка p53 (на 22 %) при одночасному зниженні площі p53-IPM (на 12 %). Питомий вміст білка p53 повернувся до передішемичного рівня у тварин із діабетом. Зазначені зміни відбувалися на тлі зниження стосовно показників у разі діабету без ішемії мозку площі Bcl-2-IPM (у 2,3 раза) та питомого вмісту білка Bcl-2 (у 2,1 раза). Знизилися ці показники і стосовно таких у ранньому постішемичному періоді, що говорить про пролонгацію депресії антиапоптотичної активності, яка переважала над пригніченням p53-проапоптотичної активності. У полі СА4 щурів із ЦД на 12-ту добу постішемичного періоду стосовно показника у тварин з даною патологією без ішемії-реперфузії мозку в 1,4 раза знижувалася площа p53-IPM, а питомий вміст білка p53 повертався до рівня у тварин із діабетом. Отже, активація апоптозу в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді на 12-ту добу змінювалася його пригніченням. Така ж закономірність спостерігалася щодо змін Bcl-2-залежних процесів: на 12-ту добу постішемичного періоду порівняно з показниками в щурів із діабетом в 1,5 раза знижувався питомий вміст білка Bcl-2 і в 1,4 раза – площа Bcl-2-IPM. Крім того, слід зазначити зниження даних показників стосовно раннього ішемічно-реперфузійного періоду. Таким чином, у цьому полі паралельна активація про- та антиапоптотичних механізмів у ранньому терміні змінювалася більш-менш рівномірним пригніченням обох процесів у пізньому, що свідчить про їх збалансовані зміни упродовж всього періоду спостереження.

ВИСНОВКИ

1. У тварин без ЦД після 20-хвилинної ішемії з односторонньою реперфузією у всіх полях гіпокампа спостерігається активація

p53-залежних проапоптотичних процесів, кількісно найсуттєвіша в полях СА1 та СА4, на тлі посилення Bcl-2-залежних антиапоптотичних механізмів у полях СА1, СА2, СА4 та зниження активності останніх – у полі СА3.

2. На 12-ту добу постішемичного періоду проапоптотична активність стосовно контролю в полях СА1, СА2, СА3 залишається підвищеною, а в полі СА4 – повертається до рівня у тварин контрольної групи, як і антиапоптотична в полях СА1 та СА4. У полі СА2 остання стосовно контролю знижується, а в полі СА3 її депресія наростає.

3. ЦД активує p53-залежні проапоптотичні механізми у полях СА1, СА3, СА4 та антиапоптотичні Bcl-2-залежні – в полях СА2 і СА3; пригнічує останні в полі СА1 і не впливає на них – у полі СА4.

4. У щурів із ЦД у ранньому постішемичному періоді активність p53-залежних проапоптотичних процесів у полях СА1, СА3, СА4 достовірно перевищує таку в щурів з аналогічним втручанням без діабету, а в полі СА2 – є суттєво нижчою.

5. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в щурів із діабетом активність p53-проапоптотичних процесів стосовно показників за наявності діабету без порушення церебрального кровообігу в полі СА1 залишається підвищеною, в полі СА2 повертається до рівня в щурів із діабетом, а в полях СА3 та СА4 – знижується; Bcl-2-залежна антиапоптотична активність повертається до рівня в щурів із діабетом у полі СА1, знижується – в полі СА4, та зазнає ще більшої, ніж у ранньому періоді, депресії в полях СА2 та СА3.

Т.Н. Бойчук, О.М. Ніка, С.С. Ткачук

СООТНОШЕНИЕ P53-ПРО- И BCL-2-АНТИАПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ГИППОКАМPE КРЫС С ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

Исследована динамика баланса показателей p53-про- и Bcl-2-антиапоптотического процессов в гиппокампе крыс с экспериментальным сахарным диабетом (СД), ослож-

ненным неполной глобальной ишемией-реперфузией головного мозга. Показано, что у животных без СД после 20-минутной ишемии/одноразовой реперфузии во всех полях гиппокампа активируются p53-проапоптотические процессы на фоне усиления Bcl-2-антиапоптотических в полях CA1, CA2, CA4 и их депрессии – в поле CA3. В раннем постischemическом периоде у крыс с СД активность p53-проапоптотических процессов в полях CA1, CA3, CA4 достоверно превышает таковую у крыс без диабета (по площади p53-ИРМ на 110, 60 и 27 %), а в поле CA2 является более низкой. На 12-е сутки постischemического периода активация апоптоза в поле CA1 происходит на фоне инертных антиапоптотических процессов как у животных без СД, так и с его наличием, однако показатели, характеризующие активность апоптоза, у крыс с СД выше (удельное содержание белка p53 и площадь p53-ИРМ на 38 и 43 %). В этот период в поле CA2 животных без СД выявлено некоторую депрессию антиапоптотических процессов с незначительным преобладанием проапоптотических, а на фоне СД – депрессию обоих механизмов, больше – антиапоптотического; в поле CA3 крыс без СД – сохранение активности проапоптотических процессов и углубление в динамике депрессии антиапоптотических, а в условиях СД – угнетение обоих механизмов при более существенной депрессии антиапоптотического. На 12-е сутки эксперимента в поле CA4 наблюдались наиболее сбалансированные взаимоотношения изученных процессов за счет их параллельных и однонаправленных изменений как у крыс без СД, так и с его наличием. Результаты свидетельствуют о модифицирующем влиянии СД на чувствительность полей гиппокампа к ишемически-реперфузионным повреждениям.

Ключевые слова: гиппокамп; сахарный диабет; ишемия-реперфузия головного мозга; апоптоз.

T.M. Boychuk, O.M. Nika, S.S. Tkachuk

THE RATIO OF P53-PROAPOPTOTIC AND BCL-2 ANTIAPOPTOTIC ACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION AND EXPERIMENTAL DIABETES

The dynamics of the balance of indices of pro- and p53-Bcl-2 anti-apoptotic processes in the hippocampus of rats with experimental diabetes mellitus (DM) complicated by incomplete global cerebral ischemia-reperfusion was investigated. It is shown that p53 proapoptotic processes in animals without diabetes after 20 minutes of ischemia/1 hour reperfusion in all fields of the hippocampus are activated in the background of increasing Bcl-2 antiapoptotic processes in the fields CA1, CA2, CA4 and depression of it – in the CA3 field. In the early postischemic period in rats with DM activity of the p53-proapoptotic processes in fields CA1, CA3, CA4 significantly exceeds that in non-diabetic rats (area of p53-IRM increases on 110, 60 and 27 %), and was significantly

lower than that detected in CA2 field. On the 12th day of post-ischemic period, activation of apoptosis in field CA1 occurs in the background of inert antiapoptotic processes, in animals without diabetes, as well as in diabetic rats, but the indicators characterizing of apoptotic activity in rats with diabetes were higher (specific contents of p53 protein and area of p53 -IRM increases on 38 and 43 %). During this period, in the CA2 region of the non-diabetic animals, some depression of the antiapoptotic processes with a slight predominance of proapoptotic processes was detected. In the field of CA3 region of rats without diabetes, the retention of activity of proapoptotic processes and the deepening in the dynamics of depression of antiapoptotic processes were showed. In rats with DM, the oppression of both mechanisms with a significant depression of antiapoptotic processes was observed. On the 12th day of experiment in the field CA4, the most balanced relationship were detected between the studied of the processes due to their parallel and unidirectional changes both in the rats without diabetes as well as with DM. The results point on the modifying effect of DM on susceptibility of hippocampal fields to ischemic-reperfusion injury.

Key words: hippocampus; diabetes mellitus; brain ischemia-reperfusion; apoptosis.

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

REFERENCES

1. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Dif.* 2009;16:899-909.
2. Luigi Titomanlio, David Fernández-Lypez, Lucilla Manganozzi, Raffaella Moretti, Zinaida S. Vexler, and Pierre Gressens. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. *Pediatr Neurol.* 2015;52(6): 566-84.
3. Olmez I, Ozyurt H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int.* 2012;60(2):208-12.
4. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, Feuerhake W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targ.* 2013;12(5):698-714.
5. Rodriguez-Rodriguez P, Fernandez E, Almeida A, Bolanos JP. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death Dif.* 2012;19:1582-89.
6. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(Pt 2):232-37.
7. Wang Y, Dong XX, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Wu JC, Gu ZL, Qin ZH. p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic

- and autophagic mechanisms. *Europ J Neurosci*. 2009;30:2258-70.
8. Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome *c* and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26:7974-83.
 9. Cheng CY, Tang NY, Kao ST, Hsieh CL. Ferulic Acid Administered at Various Time Points Protects against Cerebral Infarction by Activating p38 MAPK/p90RSK/ CREB/Bcl-2 Anti-Apoptotic Signaling in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155748.
 10. Li Z, Pang L, Fang F, Zhang G, Zhang J, Xie M, Wang L. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res*. 2012;1450:116-24.
 11. Akram Sadeghi, Javad Hami, Shahnaz Razavi, Ebrahim Esfandiary, and Zahra Hejazi. The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. *Int J Prev Med*. 2016;7(1):57.
 12. Sun LJ, Hou XH, Xue SH, Yan F, Dai YJ, Zhao CH, Wang F, Yang RH. Fish oil modulates glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in diabetes-induced hippocampal neurons apoptosis. *Brain Res*. 2014;1574 (1):37-49.
 13. Zhao CH, Liu HQ, Cao R, Ji AL, Zhang L, Wang F, Yang RH. Effects of dietary fish oil on learning function and apoptosis of hippocampal pyramidal neurons in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res*. 2012;1457:33-43.
 14. Al-Rubeaan K, Al-Hussain F, Youssef AM, Subhani SN, Al-Sharqawi AH, Ibrahim HM. Ischemic Stroke and Its Risk Factors in a Registry-Based Large Cross-Sectional Diabetic Cohort in a Country Facing a Diabetes Epidemic. *J Diabetes Res*. 2016;2016:4132589. doi: 10.1155/2016/4132589.
 15. Guo L, Yu M, Zhong J, Wu H, Pan J, Gong W, Wang M, Fei F, Hu R. Stroke Risk among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Zhejiang: A Population-Based Prospective Study in China. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:6380620. doi: 10.1155/2016/6380620.
 16. Tkachuk OV. Effect of streptozotocin-induced diabetes and transient global brain ischemia on apoptosis in the thymus of rats. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):58-64 [Ukrainian].
 17. Skibo GG. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija*. 2004;1(1):22-30 [Ukrainian].
 18. 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.
 19. Kolesnik YM, Abramov AV. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement. *Microsc Analys*. 2002;5:12-16.

*Матеріал надійшов до
редакції 07.09.2016*

Роль метаболітів оксиду азоту при дії субтоксичних доз сукцинамідів на стан гемостазу

І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, О.С. Лалименко

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків;
e-mail: lab-tox@ukr.net

Вивчали роль змін обміну ендogenous оксиду азоту (NO) при дії амідів бурштинової кислоти – продуктів біотрансформації антидіабетичного засобу на стан гемостазу. В експерименті на щурах застосовували синтезовані сукцинаміди в еквімолярних кількостях щодо субтоксичної дози фармацевтичної субстанції. Визначали показники, які характеризують стан тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу у плазмі крові, вміст стабільних метаболітів NO та активність синтази оксиду азоту (NOS) у гомогенаті печінки, плазмі крові та сечі щурів. Встановлено, що в умовах субхронічного введення сукцинамідів зменшується концентрація нітрит- та нітрат-аніонів у плазмі крові (на 30-50 і 20-35% відповідно), печінці (на 16-19 і 14-18%) та сечі (на 50-70 і 38-55%). Важливим чинником цих змін є зниження активності NOS (на 33%). Досліджені сполуки за цих умов підвищують у 1,5 раза коагуляційний потенціал плазми крові та можуть підсилювати на 20% агрегацію тромбоцитів. Аналіз коефіцієнтів парної кореляції показав наявність зв'язків змін показників метаболізму NO та гемостазу. Отримані результати свідчать про те, що прояв прокоагуляційної та тромbogenної дії сукцинамідів за умов їх застосування у субтоксичних дозах певною мірою зумовлений зменшенням вазоактивного пулу NO, що, у свою чергу, відбувається за рахунок зниження активності NOS.

Ключові слова: оксид азоту; гемостаз; аміди бурштинової кислоти.

ВСТУП

Відомо, що цукровий діабет (ЦД) супроводжується порушеннями судинно-тромбоцитарної та коагуляційної ланок гемостазу на тлі ендотеліальної дисфункції, що суттєво прискорює розвиток серцево-судинних ускладнень [1]. Проблема фармакологічної корекції змін у системі гемостазу за цієї патології залишається до кінця не вирішеною, досліджень у такому напрямку недостатньо. Наразі вивчається антитромbogenний потенціал гіпоглікемічних препаратів, для деяких (бігуаніди, тіазолідиндіони) встановлено прямий вплив на гемостаз. Літературні дані підтверджують наявність у низки заміщених амідів та гідразидів дикарбонових кислот (бурштинової, малеїнової, фталевої) антикоагуляційної або рідше гемостатичної активності, але коло таких сполук незначне [2].

З'ясовано, що сукцинатвмісні сполуки здатні запобігати прогресуванню дисфункції ендотелію, підвищуючи синтез і біодоступність ендogenous оксиду азоту (NO), та чутливість ендотеліоцитів до нього [3]. В аспекті вивчення механізмів дії на гемостаз, асоційованих із змінами метаболізму NO, певний інтерес представляють сполуки з антидіабетичною активністю, які є похідними бурштинової кислоти.

Оригінальною сполукою з антидіабетичними властивостями є β -фенілетиламід 2-оксисукцинанілової кислоти (β -ФЕА-ОСАК), механізми дії якого пов'язані з поліпшенням біоенергетичних процесів, пригніченням оксидативного стресу і зниженням неферментативного глікозилювання [4]. На моделі метаболічного синдрому виявлено антикоагуляційну активність цієї сполуки в дозі 50 мг/кг (перорально) [5]. Визначені метаболіти

© І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, О.С. Лалименко

І фази біотрансформації β -ФЕА-ОСАК: 2-гідроксифенілсукцинамід (2-ГФСА) і в-фенілетилсукцинамід (β -ФЕСА), які також є похідними бурштинової кислоти і можуть впливати на специфічні та токсичні ефекти вихідної сполуки.

Дослідженнями останніх років показано, що у регуляції судинного тону, реологічного стану крові, плазматичного та тромбоцитарного гемостазу бере активну участь система NO. Ендотеліальний NO є сильним нейрогенним вазодилататором, який у фізіологічних умовах гальмує агрегацію тромбоцитів та лімфоцитарно-тромбоцитарну адгезію, підвищує фібринолітичну активність та підтримує коагуляційний потенціал крові [6, 7]. Будь-які відхилення у продукції NO та дисбаланс активних форм азоту можуть відобразитися на стані гемостазу, що проявляється порушеннями коагуляції, широким спектром тромботичних або геморагічних ускладнень при патологічному процесі [8, 9]. Прояв захисної або пошкоджувальної дії NO пов'язують з утворенням великої кількості продуктів його метаболізму, які мають різну біологічну активність [10]. Нині чітких уявлень стосовно впливу цієї молекули та її метаболітів на механізми гемостазу немає.

У розвитку ЦД та його серцево-судинних ускладнень важливу роль відіграють зміни обміну NO, але літературні дані щодо їх характеру та взаємозв'язку з порушеннями системи гемостазу є неоднозначними [9, 11, 12]. Актуальним залишається пошук антидіабетичних засобів, які б позитивно впливали на гемостаз, та визначення механізмів такого виду їх дії. В цьому напрямку досліджень перспективними є похідні бурштинової кислоти. Остаточно не з'ясовано особливості їх впливу на метаболізм NO та стан тромбоцитарно-коагуляційного гемостазу залежно від доз та тривалості експозиції.

Метою роботи було дослідити показники метаболізму NO та стану гемостазу, взаємозв'язок між їх змінами за умов введення щурам 2-ГФСА та β -ФЕСА у субтоксичних дозах.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 96 білих безпородних щурах-самцях масою 190-210 г. Дослідним щурам вводили 2-ГФСА та β -ФЕСА (перорально; 30-разово) у вигляді водної емульсії з Твін-80 у субтоксичних дозах 68 і 72 мг/кг відповідно. Їх дози розраховували як еквімолярні субтоксичні для β -ФЕА-ОСАК, яка становить 100 мг/кг. Контрольні тварини отримували водну емульсію Твін-80. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом на першу добу після завершення експериментів. Кожна дослідна та контрольна група нараховувала по 8 тварин. Показники гемостазу визначали у плазмі крові, метаболізму NO – у плазмі крові, сечі та гомогенаті печінки. Дослідження відповідали «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

Стан тромбоцитарної ланки гемостазу оцінювали визначенням часу агрегації тромбоцитів при змішуванні рівних об'ємів плазми крові та універсального індуктора агрегації згідно з інструкцією до набору фірми «Технологія-стандарт» (Росія). Процес коагуляції вивчали загальноприйнятими у гемостазіології методами визначення: активованого парціального тромбопластинового часу (АПТЧ), часу рекальцифікації, часткового тромбопластинового часу (ЧТЧ), протромбінового часу з розрахунком протромбінового відношення, тромбінового часу. Час рекальцифікації визначали мануально уніфікованим методом [13], інші показники – на коагулометрі Соаг Chrom 3003 (Польща) наборами фірми «Технологія-стандарт» (Росія).

Стан метаболізму NO оцінювали за вмістом нітрит- (NO_2^-) та нітрат-аніонів (NO_3^-) у плазмі крові, сечі та 5%-му гомогенаті печінки спектрофотометричним методом за допомогою реакції Грісса [14]. Концентрацію NO_2^- і NO_3^- виражали у мікромолях на 1 л у плазмі та сечі, наномолях на 1 мг протеїну – у гомогенаті печінки. Активність NOS (КФ 1.14.13.19) визначали у 10%-му гомогенаті

печінки за швидкістю окиснення НАДФН у реакційній суміші: 2,5 мл 0,1 моль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,4), який містив CaCl_2 – 10 ммоль/л; 0,3 мл водного розчину аргініну – 40 ммоль/л; 0,1 мл водного розчину НАДФН – 1 ммоль/л. До реакційної суміші додавали 0,1 мл гомогенату печінки [15]. Реакцію запускали внесенням у реакційне середовище 1 ммоль/л НАДФН, загальний об'єм проби був 3 мл. У контрольні проби замість розчину НАДФН додавали 0,1 мл бідистильованої води. Реєстрували зниження абсорбції дослідних проб, які вимірювали щодо контрольних на спектрофотометрі Shimadzu UV-1800 (Японія) при $\lambda=340$ нм (максимум поглинання НАДФН) протягом 5 хв при 37°C . Активність NOS виражали у наномолях НАДФН за 1 хв на 1 мг протеїну. Вміст білка у гомогенаті печінки визначали методом Бредфорда [16].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Анова. Нормальність розподілу в рядах визначали за критерієм Шапіро-Уїлка (W). Для парного порівняння груп досліду з контролем

використовували критерій t Стюдента. Результати представлені як середнє арифметичне та його статистична похибка ($\bar{X} \pm S\bar{x}$). Кореляційний аналіз показників проведено методом Пірсона з обчисленням коефіцієнта парної кореляції (r). Вірогідними вважали результати при $P \leq 0,05$ та близькими до статистично значущих при $0,05 < P \leq 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінювання стану тромбоцитарної ланки гемостазу показало, що вплив β -ФЕСА у субтоксичній дозі характеризується тенденцією до скорочення часу агрегації тромбоцитів ($0,05 < P \leq 0,1$), тоді як 2-ГФСА не викликає змін показника у плазмі крові щурів (табл. 1). Згідно з раніше отриманими даними [17], β -ФЕСА здатний підвищувати агрегаційну активність тромбоцитів і за умов його застосування у дозі 18 мг/кг, яка еквімолярна ефективній для β -ФЕА-ОСАК (25 мг/кг), але ці зміни не виходять за межі фізіологічної норми для щурів на відміну від субтоксичної дози.

Враховуючи наведені результати, слід зазначити, що β -ФЕСА і 2-ГФСА не можуть

Таблиця 1. Показники стану тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу у щурів за умов субхронічного введення в-фенілетилсукцинамідів (β -ФЕСА) і 2-гідрофенілсукцинамідів (2-ГФСА) ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, n=8)

Показник	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
Час агрегації тромбоцитів, с	$14,6 \pm 0,8$	$12,4 \pm 0,8^{**}$ ($85,0 \pm 2,6$) ***	$20,0 \pm 0,7$	$20,8 \pm 1,7$ ($103,0 \pm 5,6$)
Активованій парціальний тромбопластиновий час, с	$55,0 \pm 4,6$	$50,8 \pm 2,3$ ($94,3 \pm 3,9$)	$43,4 \pm 1,6$	$40,0 \pm 2,6$ ($94,2 \pm 3,9$)
Частковий тромбопластиновий час, с	$126,0 \pm 6,4$	$102,9 \pm 4,0^*$ ($82,3 \pm 2,8$) ***	$121,1 \pm 6,2$	$116,0 \pm 6,1$ ($96,1 \pm 2,7$)
Час рекальцифікації, с	$151,9 \pm 4,8$	$132,9 \pm 2,3^*$ ($89,0 \pm 0,5$)	$93,1 \pm 5,0$	$119,4 \pm 6,8^*$ ($128,2 \pm 1,7$) ***
Протромбіновий час, с	$23,4 \pm 1,4$	$21,5 \pm 0,2$ ($91,9 \pm 1,0$)	$25,1 \pm 0,6$	$21,9 \pm 0,3^*$ ($87,1 \pm 1,2$) ***
Протромбінове відношення Тромбіновий час, с	$1,43 \pm 0,09$	$1,32 \pm 0,01$	$1,54 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,02^*$
	$16,5 \pm 2,3$	$11,0 \pm 0,8^*$ ($76,4 \pm 3,1$) ***	$18,0 \pm 2,8$	$15,1 \pm 1,9$ ($86,6 \pm 2,9$)

Примітки: тут і в табл. 2 * $P \leq 0,05$ і ** $0,05 < P \leq 0,1$ порівняно з контролем; *** $P \leq 0,05$ і **** $0,05 < P \leq 0,1$ значущість відхилення значень при введенні β -ФЕСА і 2-ГФСА; у дужках – у відсотках до контролю.

впливати на антиагрегаційну активність їх вихідної сполуки відносно до тромбоцитів плазми крові, наявність якої у β -ФЕСА-ОСАК було встановлено у попередніх експериментах [18].

Аналіз коагулограм щурів, які ізольовано отримували β -ФЕСА і 2-ГФСА у субтоксичних дозах, показав, що характер та ступінь змін показників, що визначають різні фази процесу коагуляції, дещо відрізняються між дослідженими сполуками (див. табл. 1).

За умов субхронічного введення β -ФЕСА відмічено вірогідне скорочення часу рекальцифікації плазми, яке вказує на прискорення процесу згортання крові у цілому. Зміни коагуляції стосуються фази I та більшою мірою III цього процесу, про що свідчить вірогідне зменшення ЧТЧ та тромбінового часу плазми крові (на 18 і 24% відповідно). Відомо, що ЧТЧ, як і АПТЧ залежить від активності плазмових факторів, які беруть участь у внутрішньому механізмі гемокоагуляції (факторів XII, XI, IX, VIII), але на відміну від АПТЧ цей показник чутливий до кількості тромбоцитів та активності тромбоцитарного фактора 3 (TF_3) – каталізатора протромбіноутворення [19]. Скорочення ЧТЧ при відсутності змін АПТЧ могло відбуватися у плазмі крові з підвищеною кількістю тромбоцитів. Скорочення тромбінового часу значною мірою визначається збільшенням вмісту фібриногену у плазмі крові. Аналогічні зміни цього показника зареєстровано у попередніх дослідженнях, в яких сполуку вводили щурам у дозі 18 мг/кг, але ці зрушення знаходились у межах фізіологічної норми. Наведені результати свідчать про те, що метаболіт β -ФЕСА-ОСАК здатний підвищувати коагуляційний потенціал плазми крові за рахунок стимуляції судинного механізму формування протромбінази, а також збільшення швидкості фібриноутворення, щосуттєво пов'язано з активністю фібриногену.

На відміну від β -ФЕСА, вплив 2-ГФСА на стан коагуляційного гемостазу проявляється, навпаки, подовженням у 1,3 раза часу

рекальцифікації плазми ($P \leq 0,05$), що вказує на сповільнення згортання крові, переважно I фази процесу. Внаслідок дії цього метаболіту скорочується протромбіновий час і зменшується протромбінове відношення ($P \leq 0,05$), що збігається з напрямком змін цих показників на рівні дози 17 мг/кг [17] та віддзеркалює інтенсивність процесу утворення активної протромбінази зовнішнім (позасудинним) шляхом. Проте 2-ГФСА не впливає на інтенсивність кінцевої фази коагуляції, враховуючи відсутність змін тромбінового часу плазми крові (див. табл. 1).

Таким чином, досліджені сукцинаміди у субтоксичних дозах викликають різноспрямовані зміни часу рекальцифікації, які відображають в основному інтенсивність первинних реакцій коагуляційного каскаду. Однак дія β -ФЕСА на плазмовий гемостаз більшою мірою проявляється прискоренням згортання крові на етапі формування фібринових ниток, а 2-ГФСА – стимуляцією зовнішнього шляху коагуляції. Такі види активності метаболітів β -ФЕСА-ОСАК, напевно, позначаються на дії їх вихідної сполуки щодо коагуляційного гемостазу в умовах її введення у субтоксичній дозі.

Гіперкоагуляційні зрушення, які відбувалися під впливом досліджених сукцинамідів (з ознаками активації агрегаційної функції тромбоцитів за умов введення β -ФЕСА), очевидно, можуть бути пов'язані зі змінами у системі NO–NOS. Для підтвердження цього припущення паралельно з дослідженням стану гемостазу визначали показники NO-обміну у щурів, які зазнали впливу β -ФЕСА та 2-ГФСА. Встановлено, що β -ФЕСА у субтоксичній дозі здатний гальмувати метаболізм NO, що характеризується зниженням у 1,5 раза активності NOS, на 19 і 18% вмісту NO_2^- і NO_3^- у печінці щурів (табл. 2). Вміст метаболітів NO у печінці знижується повільніше, ніж активність NOS, завдяки, очевидно, можливості їх часткового відновлення у нітрит-/нітрат-редуктазних реакціях замкненого циклу обміну NO або за рахунок інших компенсаторних механізмів, що збігається з

існуючими даними [20].

За дії 2-ГФСА і β -ФЕСА зареєстровано зниження вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та сечі, що більшою мірою проявляється під впливом першої сполуки (див. табл. 2). Ці зміни у разі β -ФЕСА певним чином зумовлені інгібуванням конститутивної NOS печінки, але обидва сукцинаміди, ймовірно, є інгібіторами NOS ендотелію судин та тромбоцитів, які можуть гальмувати утворення NO, а також високотоксичного пероксинітриту, який вважають проапоптотичним фактором. На вміст метаболітів NO у плазмі крові може позначатися здатність високореакційного NO вступати у взаємодію з тіол- та гемовмісними сполуками з утворенням більш стабільних транспортних форм та подальшим його депонуванням у тканинах [21].

Встановлено, що за впливу досліджених сукцинамідів суттєвіше знижується вміст NO_2^- , ніж NO_3^- у плазмі крові, а крім того обидва показники більше знижуються у сечі порівняно зі значеннями у плазмі крові (див. табл. 2). Відомо, що саме вміст NO_2^- у плазмі крові значною мірою залежить від ступеня активності ендотеліальної NOS (eNOS) та є

пропорційним загальному ендотеліальному синтезу NO, на відміну від інших його метаболітів. NO_2^- є реакційноспроможнішим, ніж NO_3^- , і тому залучений у широке коло метаболічних перетворень, що також позначається на більшому зниженні його вмісту [22]. На вміст NO_2^- і NO_3^- у позаклітинній рідині може впливати не тільки інтенсивність продукції NO, а і темпи ниркового кліренсу [23]. У наших дослідженнях гальмування темпів сечової екскреції NO_2^- і NO_3^- , ймовірно, пов'язано з посиленням їх каналцевої реабсорбції переважно у проксимальному сегменті нефрону, що запобігає суттєвій втраті організмом метаболітів NO. Такий вид активності, який пов'язаний із стимуляцією внутрішньониркових механізмів регуляції системи NO–NOS, є більш вираженим за дії 2-ГФСА порівняно з β -ФЕСА.

Таким чином, досліджені сукцинаміди у субтоксичних дозах викликають зниження вмісту метаболітів NO в організмі. На це можуть впливати, зокрема, активні форми кисню, які генеруються при підвищенні активності дихального ланцюга мітохондрій. Такі взаємопов'язані зміни встановлені за

Таблиця 2. Показники стану системи NO–NOS у щурів за умов субхронічного введення в-фенілетилсукцинамідів (β -ФЕСА) і 2-гідроксифенілсукцинамідів (2-ГФСА) ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, n=8)

Показник	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
Печінка				
NOS, нмоль/хв·мг протеїну	5,15 \pm 0,75	3,48 \pm 0,43** (66,8 \pm 7,5)****	3,73 \pm 0,34	3,09 \pm 0,37 (82,1 \pm 4,4)
NO_2^- , нмоль/мг протеїну	40,7 \pm 2,8	33,4 \pm 3,2** (81,2 \pm 2,9)	35,0 \pm 2,6	29,5 \pm 2,3 (84,5 \pm 2,3)
NO_3^- , нмоль/мг протеїну	60,1 \pm 4,1	50,0 \pm 4,6** (82,3 \pm 2,7)	51,8 \pm 3,7	40,0 \pm 6,5 (86,5 \pm 2,0)
Плазма крові				
NO_2^- , мкмоль/л	4,82 \pm 0,26	3,40 \pm 0,29* (70,4 \pm 2,6)	8,28 \pm 0,41	4,07 \pm 0,52* (50,8 \pm 4,9)***
NO_3^- , мкмоль/л	14,0 \pm 0,5	11,4 \pm 0,5* (80,9 \pm 1,2)	19,5 \pm 1,2	12,6 \pm 1,0* (65,5 \pm 3,7)***
Сеча				
NO_2^- , мкмоль/л	8,79 \pm 0,37	4,14 \pm 0,66* (50,3 \pm 5,0)	10,2 \pm 0,4	2,97 \pm 0,34* (28,7 \pm 2,3)***
NO_3^- , мкмоль/л	52,2 \pm 1,6	32,5 \pm 3,0* (62,3 \pm 4,0)	59,7 \pm 1,9	27,3 \pm 1,5* (45,5 \pm 1,2)***

дії β -ФЕА-ОСАК, який здатний стимулювати активність цитохром-с-оксидази мітохондрій, послаблювати активність NOS, сприяючи зменшенню вмісту метаболітів NO у плазмі крові, сечі та тканині печінки [24]. Недостатній синтез NO, у свою чергу, призводить до вільнорадикального ушкодження мембран клітин, що може бути одним із механізмів розвитку атеросклерозу.

Як відомо, основна роль NO пов'язана з вазодилатацією, гальмуванням агрегації тромбоцитів, їх адгезії і поліпшенням реологічних властивостей крові. Зниження концентрації NO, навпаки, може призводити до вазоконстрикції, посилення агрегації тромбоцитів та вільнорадикального окиснення [12]. У разі дії β -ФЕА підвищення ступеня агрегації тромбоцитів, очевидно, певним чином залежить від пригнічення синтезу NO. Встановлено, що NO є активатором розчинної гуанілатциклази, яка каталізує синтез циклічного гуанозинмонофосфату. За умов низької концентрації NO знижується його вміст у тромбоцитах, що може призводити до посилення метаболізму арахідонової кислоти, утворення тромбоксанів A_2 і B_2 , накопичення кальцію у клітинах і активації тромбоцитів. Крім того, підвищується активність протеїнкінази C, яка фосфорилує низку білків масою 20-40 кДа, тим самим стимулюючи активність тромбоцитів та посилюючи їх агрегацію [11].

Зменшення вмісту NO_2^- і NO_3^- може супроводжуватися буферним накопиченням NO в S-нітрозотіолах та динітрозольних комплексах заліза з сірковмісними лігандами. Утворення таких комплексів попереджає токсичні ефекти пероксинітриту, який утворюється при взаємодії NO з супероксидним радикалом за умов підвищеного вмісту останнього [21].

Відомо, що NO регулює процес коагуляції, тому зниження його вмісту напевно сприяє підвищенню коагуляційного потенціалу плазми крові, ознаки якого виявлені при застосуванні досліджених сукцинамідів у субтоксичних дозах. Дослідженнями останніх років встановлена роль дефіциту оксиду

азоту та порушень коагуляційного ланцюга гемостазу у формуванні деяких форм патології, зокрема у механізмах розвитку церебральних порушень та ішемічного інсульту. Відзначали зниження продукції нітрит-аніонів одночасно зі скороченням часу згортання крові, часу рекальцифікації та ЧТЧ, що, в свою чергу, сприяло розвитку тромбозу [10].

Для системного відображення взаємозв'язків показників метаболізму NO та гемостазу, які змінювались в умовах субхронічного введення похідних бурштинової кислоти, проведено парний кореляційний аналіз. Для впливу β -ФЕА характерна пряма кореляційна залежність між скороченнями часу рекальцифікації та ЧТЧ ($r=0,73$). Активність NOS має зворотний зв'язок із ступенем агрегації тромбоцитів ($r=-0,7$). Зниження вмісту NO_2^- , NO_3^- та активності NOS у печінці частково пов'язані з підвищенням коагуляційного потенціалу плазми крові у вигляді скорочення ЧТЧ ($r=0,65, 0,65, 0,66$). За дії β -ФЕА коефіцієнт парної кореляції є прямим між вмістом NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та показниками гемостазу: часом агрегації тромбоцитів, часом рекальцифікації та тромбіновим часом ($r=0,66$ і $0,66$; $0,65$ і $0,67$), між вмістом NO_2^- і NO_3^- у сечі та ЧТЧ плазми крові ($r=0,71$ і $0,7$; $0,7$ і $0,7$). Вміст NO_2^- і NO_3^- печінки корелює з активністю процесів реабсорбції нирковими каналцями, що відображає значення цих показників у сечі ($r=-0,76$ і $-0,76$; $-0,75$ і $-0,75$).

За впливу 2-ГФСА встановлена пряма кореляційна залежність між зниженням вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та деякими показниками коагуляції: скороченням протромбінового часу ($r=0,72$ і $0,71$) та частково подовженням часу рекальцифікації ($r=0,67$ і $0,67$), які також корелюють між собою. У печінці дещо знижується активність NOS (майже на 20%), що однак добре корелює зі зменшенням вмісту NO_2^- і NO_3^- плазми крові ($r=0,77$ і $0,76$), а також відображається на скороченні протромбінового часу плазми крові ($r=0,71$). Встановлено пряму кореляційну залежність вмісту NO_2^- і NO_3^- у сечі

від значень цих показників у плазмі крові ($r=0,73 \pm 0,73; 0,74 \pm 0,73$), а також частковий зв'язок посилення каналцевої реабсорбції у нирках з подовженням часу рекальцифікації плазми крові ($r=0,66$).

З огляду на одержані результати можна констатувати, що похідні бурштинової кислоти: β -ФЕСА і 2-ГФСА у субтоксичних дозах викликають зниження активності системи NO-NOS, що супроводжується змінами у системі гемостазу.

За умов субхронічного введення β -ФЕСА знижується активність NOS печінки, що певною мірою позначається на зменшенні вмісту NO_2^- і NO_3^- у печінці, а також у плазмі крові. Разом з цим зниження вмісту метаболітів NO у печінці відбувається повільніше, ніж активності NOS, зважаючи на можливість їх часткового відновлення нітрит-/нітратредуктазою або за рахунок активації інших компенсаторних механізмів. За впливу 2-ГФСА зниження вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові є більш вираженим порівняно з односпрямованими ефектами β -ФЕСА та певним чином пов'язано з активністю NOS, що наразі знижується менш істотно. Отже, в умовах введення зазначених сукцинамідів зменшення вмісту метаболітів NO у печінці та плазмі крові залежить від активності NOS печінки. Проте на метаболізм NO, ймовірно, може впливати зниження активності NOS ендотелію судин та тромбоцитів, порушення антиоксидантного захисту та підвищення продукції вільних радикалів, що визначає актуальність подальших досліджень у цьому напрямку. Виявлене гальмування темпів сечової екскреції метаболітів NO, яке запобігає їх втраті організмом, є компенсаторною реакцією на зниження їх вмісту в організмі.

Встановлено, що за умов застосування похідних бурштинової кислоти у субтоксичних дозах підвищується коагуляційний потенціал плазми крові, за дії β -ФЕСА також посилюється агрегація тромбоцитів. Проте стимулювальна дія цих сполук на коагу-

ляційний гемостаз має деякі відмінності. β -ФЕСА активує внутрішньосудинний механізм утворення протромбінази та прискорює фібриноутворення, 2-ГФСА стимулює зовнішній шлях коагуляції. Такий напрямок змін гемостазу суттєво пов'язаний із зменшенням вмісту NO_2^- і NO_3^- у досліджених біосубстратах та активності NOS печінки, що підтверджують результати кореляційного аналізу цих показників.

Таким чином, під впливом β -ФЕСА та 2-ГФСА вміст NO_2^- і NO_3^- зменшується, у тому числі внаслідок зниження активності NOS, що відіграє певну роль при дії цих сукцинамідів на гемостаз у вигляді підвищення активності його коагуляційної та тромбоцитарної ланки.

И.А. Палагина, М.Я. Кудря, О.С. Лалыменко

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ СУКЦИНАМИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА

Изучали роль изменений обмена эндогенного оксида азота (NO) при воздействии амидов янтарной кислоты – продуктов биотрансформации антидиабетического средства на состояние гемостаза. В эксперименте на крысах применяли синтезированные сукцинамиды в эквимольных количествах по отношению к субтоксической дозе фармацевтической субстанции. Определяли показатели, которые характеризуют состояние тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в плазме крови, содержание стабильных метаболитов NO и активность синтазы оксида азота (NOS) в гомогенате печени, плазме крови и моче крыс. Установлено, что в условиях субхронического введения сукцинамидов уменьшается концентрация нитрит- и нитрат-анионов в плазме крови (на 30-50 и 20-35% соответственно), печени (на 16-19 и 14-18%) и моче (на 50-70 и 38-55%). Важным фактором этих изменений является снижение активности NOS (на 33%). Исследованные соединения в этих условиях повышают в 1,5 раза коагуляционный потенциал плазмы крови и могут усиливать на 20% агрегацию тромбоцитов. Анализ коэффициентов парной корреляции показал наличие связей изменений показателей метаболизма NO и гемостаза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что проявление прокоагуляционного и тромбогенного действия сукцинамидов при их введении в субтоксических дозах в определенной степени обусловлено уменьшением вазоактивного пула

NO, что, в свою очередь, происходит за счет снижения активности NOS.

Ключевые слова: оксид азота; гемостаз; амиды янтарной кислоты.

I.A. Palagina, M.Y. Kudria, O.S. Lalymenko

ROLE OF NITRIC OXIDE METABOLITES WITHIN THE IMPACT OF THE SUB-TOXIC SUCCINAMIDES DOSES ON STATE OF HEMOSTASIS

We investigated the role of changes in the endogenous nitric oxide (NO) metabolism during the influence of succinic acid amides as biotransformation products of an anti-diabetic drug on the state of hemostasis. In experiment with rats, synthetic succinamides were applied in quantities equimolar to the sub-toxic dose of the pharmaceutical substance. We investigated the indicators characterizing the state of platelet and coagulation hemostasis in the blood plasma, the content of the stable NO metabolites and the activity of nitrogen oxide synthase (NOS) in the liver homogenate, blood plasma and urine of rats. We found that sub-chronic succinamides introduction reduced the nitrite and nitrate anions concentration in the blood plasma (by 30-50 and 20-35% resp.), liver (by 16-19 and 14-18%) and urine (by 50-70 and 38-55%). These changes were essentially dependent on the reduction in the NOS activity (by 33%). The studied compounds showed a 1.5 fold increase in the coagulation potential of the blood plasma and cause a 20% boost in the aggregation of thrombocytes. Analysis of the pair correlation coefficients showed positive association of the changes in indicators of the NO metabolism and hemostasis. The obtained results suggest that the registered manifestation of the pro-coagulation and thrombogenic action of succinamides applied in the sub-toxic doses is partially determined by a drop of the vasoactive NO pool that in turn, occurs due to a decline of the NOS activity.

Key words: nitric oxide; hemostasis; amides of succinic acid.

V.Y. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems, AMS of Ukraine, Kharkiv.

REFERENCES

1. Targher G, Chonchol M, Zoppini G, Franchini M. Hemostasis disorders in type 1 diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37(1):58-65.
2. Syropyatov BYa, Kolotova NV, Dolzhenko AV. Effect of derivatives of succinic and maleic acids on blood coagulation. *Probl Biol, Med & Pharmaceut Chem.* 2012;(5):31-6. [Russian].
3. Ercan M, Firtina S, Konukoglu D. Comparison of plasma viscosity as a marker of endothelial dysfunction with nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in subjects with dyslipidemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(4):315-23.
4. Gorbenko NI. Pathogenic basis of succinic acid derivative - phensuccinal efficacy in therapy of diabetes mellitus and its complications (experimental study) [dissertation]. Kharkiv: V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems at AMS of Ukraine; 2004. [Ukrainian].
5. Palagina IA, Kudria MY, Ustenko NV. Assessment criteria of safety and risk of drugs with anti-diabetic and estrogenoid activeness [abstract]. *Toxicology Letters.* 2008;180 Suppl 1:S241.
6. Mayer B, ed. Nitric oxide. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
7. Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors.* 2009;35:21-7.
8. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014 Nov;237(1):208-19.
9. Bloomgarden ZT. Cardiovascular diseases in diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33:49-54.
10. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and chemical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2011;11:61-74.
11. Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* 2013;37(6):423-28.
12. Kravets EB. Diabetology: scale of problem, achievements and perspective directions. *Bull of Siberian Medicine.* 2005;(1):9-18. [Russian].
13. Menshikov VV, editor. Laboratory methods of study in the clinics. Laboratory manual. Moscow: Medicine; 1987; p. 378. [Russian].
14. Solodkov AP, Veremey IS, Osotchuk SS, Sherbinin IU, Dedun GV, Dubrovskaya AV. Photometric method of defining nitrites and nitrates in biological liquids (Manual): appr. by Ministry of Health Care of Belarus Rep. 19.03.01. Vitebsk: [w/o publ.]; 2001; p. 9. [Russian].
15. Sumbaev VV, Yasinskaya IM. DDT effect on rat liver, lungs and brain nitric oxide synthase activity. *Modern Probl Toxicol* 2000;(3):3-7. [Russian].
16. Gasparov VS, Gegtyar VG. Definition of protein by its linkage to Kumassi Diamond light-blue G-250 dye. *Biochem.* 1994;59(6):763-75. [Russian].
17. Palagina IA, Kudrya MYa. State of thrombocyte-coagulation hemostasis in rats under influence of metabolites of succinic acid derivatives. *Probl Endocrine Pathology* 2013;(3):82-7. [Russian].
18. Palagina IA, Lalymenko OS, Kudria MY. Influence of succinate-carrying compounds on the NO-synthase activeness and thrombocyte-coagulation hemostasis [abstract]. *Ukr Biochem J.* 2014;86(5 Suppl 2):S120. [Ukrainian].
19. Laposata M, editor. Coagulation disorders: Diagnostic standards of care. New York: Demos Medical Publ.; 2010. 136 p.
20. Jansson EA, Huang L, Malkey RA Mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric

- oxide homeostasis. Nat Chem Biol. 2008; 4(7):411-7.
21. Shumaev KB, Kosmachevskaya OV, Timoshin AA. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress. Methods Enzymol. 2008; 436: 445-61.
22. Toledo JC Jr, Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. Chem Res Toxicol. 2012; 25(5):975-89.
23. Horita S, Nakamura M, Shirai A, Yamazaki O, Satoh N, Suzuki M, et al. Regulatory roles of nitric oxide and angiotensin II on renal tubular transport. J World Nephrol. 2014;3(4):295-301.
24. Kudria MY, Palagina IA, Mishenko TV, Ustenko NV, Pavlenko TA, Zhurakovskaya MV. Influence of phensuccinal and its metabolites on carbohydrate and energy metabolism at rats in the conditions of subchronic experiments. Probl Endocrine Pathology. 2012;(4):109-15. [Russian].

*Матеріал надійшов до
редакції 01.04.2016.*

Polymorphism Pro₁₂→Ala of the peroxisome proliferator-activated receptors gamma gene effect on lipid peroxidation and antioxidant defense in patients with type 2 diabetes

V.Y. Mokrii, S.V. Ziablytsev

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine; e-mail: mokriy.vol@gmail.com

In this research, we discover effect of polymorphism rs1801282 of the PPARG gene on the formation oxidative stress in patients with type 2 diabetes, depending on the duration of the disease: till 5 years, 5-10 years and more than 10 years. Activity of lipid peroxidation was assess in terms of diene conjugates (DC) and malonic dealdehyd (MDA) and antioxidant system status - the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and the level of α -tocopherol (α -TF). Molecular genetic studies conducted by the method of polymerase chain reaction (PCR) in real time. During disease 5-10 years, found increase levels of DC and MDA in patients with polymorphism Pro₁₂→Ala for 34.9 and 34.7%, in compared with Pro₁₂→Pro ($P=0.01$). Availability Pro₁₂→Pro stipulated reduction of catalase activity during disease 5-10 years at 75% ($P=0.001$), and for those, who are ill for more than 10 years at 2,04 times ($P=0.01$), which is not different from the reference level ($F=1.19$; $P=0.600$), but in the case Pro₁₂→Ala, this figure was in 2 times higher. The main conclusion is that the type Pro₁₂→Ala of polymorphism rs1801282 of the PPARG gene causes the development of oxidative stress in patients with type 2 diabetes with 5-10 years durations, and Pro₁₂→Pro - deficiency the enzyme catalase level of antioxidant system in patients with durations of disease more than 5 years.

Key words: polymorphism Pro₁₂→Ala of the PPARG gene; rs1801282; type 2 diabetes; oxidative stress.

INTRODUCTION

The incidence of diabetes mellitus (DM) worldwide was 9% in the adult population, including 90% of patients have type 2 diabetes. A similar situation exists as to Ukraine, where nowadays are more than 1.3 million patients with type 2 diabetes and control epidemiological studies argue, that the true prevalence of the disease at least are in three times higher [1].

Medical and social severity of type 2 diabetes is caused not only by prevalence of this disease, but also by the development of a large number of complications, primarily related to the impairment of endothelial microvasculature vessels, which is based on hyperglycemia and intensification of lipid peroxidation (LPO) [2]. In the pathogenesis of type 2 diabetes is activated by excessive formation of reactive oxygen

species, leading to an intensification of LPO and oxidative stress, which takes a leading role in the development of complications [8-10]. Proved, that type 2 diabetes - a free radical pathology [3]. Intensification of LPO and oxidative stress development starts before the clinical manifestation of type 2 diabetes and during early years of the disease [4], but in patients with more than 10 years - is reduced. The degree of oxidative stress is closely associated with the weakening of enzymatic antioxidant system (AOS), disease duration and degree of decompensating of carbohydrate metabolism.

Gene PPARG is a major factor in the regulation of proliferation of adipocytes, as it increases the expression of the protein transporter of fatty acids, expression and activity of acetyl-CoA synthase, fosfatidilinozitol-3-kinase, gene expres-

© V.Y. Mokrii, S.V. Ziablytsev

sion adiponectin, glucose transporter (GLUT-4), inhibits expression leptin gene, is involved in the regulation of protein oxidative phosphorylation, inhibits the expression in adipose tissue tumor necrosis factor- α , which is accompanied by a decrease in insulin resistance and an increase in insulin secretion β -cells. Associative impact polymorphic marker rs1801282 gene PPARG on the development of type 2 diabetes was confirmed in studies at European and Russian populations [5]. According to our previous studies, we found an association 12Pro allele of polymorphism rs1801282 gene PPARG with type 2 diabetes [6].

Localization polymorphism rs1801282 of gene PPARG - Chr.3: 12393125 on NCBI Build 37. Sikvens areas analyzed AACTCTGGGA-GATTCTCCTATTGAC [C/G] CAGAAAGC-GATTCCTTCACTGATAC, polymorphic codon CCA / GCA. This polymorphism is a Single nucleotide polymorphism C to G, as a result, there is a replacement of the amino acid proline to alanine at position 12 in the protein gamma receptor, which activates peroxisome proliferation (PPARG). Ancestral allele is C and allele G - minor. According to MAF Source: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/node/506>) last frequency is T=0.0703/352.

Publication of results of studies on Chinese populations indicate, that the variant Pro₁₂→Pro of polymorphism rs1801282 of gene PPARG promotes oxidative stress, and patients with genotype Pro₁₂→Ala were less prone to complications of type 2 diabetes [7]. Although, studies on cardiomyocytes show that cells with overexpressing PPARG, more resistant to oxidative stress [8]. Today, the influence of polymorphisms rs1801282 of gene PPARG on oxidative processes and antioxidant is not in doubt. A recent study conducted by Chia-Ter Chao (2016) demonstrated Pro₁₂→Ala association with increasing SOD activity in renal disease ($P<0.028$) [9]. We also found the intensification of LPO in carriers of alleles 12Pro in polymorphism Pro₁₂→Ala of gene PPARG, whereas a significant decrease in activity of the

enzyme catalase links AOC in patients with type 2 diabetes, was found as in the case of polymorphism Pro₁₂→Pro of gene PPARG, and as in the presence of the allele 12Pro in this genotype [10]. Thus, the main purpose of this study was to determine the stages of formation in terms of oxidative stress, by levels of LPO and AOC in patients with type 2 diabetes, depending on the duration of the disease.

METHODS

In this study involved 138 patients, of which 88 were patients with type 2 diabetes (experimental group) and 50 not suffered from this pathology (control group). Patients with type 2 diabetes were divide into three groups for disease duration: 5 years, 5-10 years and more than 10 years. The material for the study was the blood of patients. Blood sampling was perform of patients in the morning on an empty stomach. To assess the activity of LPO indices defined diene conjugates (DC) and malonic dealdehyd (MDA). DC content of unsaturated fatty acids in plasma were determine by Z. Placer method, in VB Gavrilov et al. modifications. MDA concentration was determine by its reaction with tiobarbitur acid with further quantitative determination of colored product on a spectrophotometer «Specord» (Germany), the MDA level expressed in mmol/g protein. Status AOC was evaluate by the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and the level of α -tocopherol (α -TF). To determine the level of α -TF, was used method of J. Biery and SOD - with Makarevich's method. In determining, the activity of catalase was used method for spectrophotometric measurement, catalase activity per unit of blood taken, mkkat/l.

Bold genomic DNA was performe-using reagents PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA, manufacturer INVITROGEN (USA), and the analysis of polymorphic DNA loci using a standardized test system TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (USA). Data analysis was

performe using the statistical package MedCalc v.15.11.0 (MedCalc Software bvba, 1993-2015 years) and MedStat.

RESULTS AND DISCUSSION

During disease 5-10 years, found increased levels of DC in patients with genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ at 34.9%, in compared with homozygotes with allele 12Pro ($P=0.01$). When used univariate analysis of variance, revealed the likely decrease level of DC ($P=0.029$) between the groups of patients suffering from type 2 diabetes to 5 years, 5-10 years and more than 10 years wich have a gene polymorphism $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$, while time, both carriers of genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ such a decrease was not found ($P=0.204$) (Table 1).

The level of MDA in patients suffered with type 2 diabetes for 5 years and 10 years, depending on the $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ polymorphism of gene PPARG was not statistically different. And when disease duration was 5-10 years, have seen a probable increase in the level of MDA by 34.7% in patients with genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$, compared with native polymorphism $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$ ($P=0.01$). The study revealed the likely reduction of MDA by 21.5% in patients with genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$, which affected up to 5 years, 5-10 years and more than 10 years ($P=0.048$).

Analyzing the indicators of lipid peroxidation products (DC and MDA) in patients with type 2 diabetes for 5 years, 5-10 years and more than 10 years, depending on the genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ of the gene PPARG see (Figure 1), in patients

with polymorphisms $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$ intensification of LPO more pronounced during the first 5 years of disease and decreases gradually in the course of the disease (DK $P=0.029$; MDA $P=0.048$). Patients with genotype $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$, front, intensification of LPO in the first 5 years and more than 10 years of disease, expressed to a lesser extent, as the MDA level significantly was not differed from the control group ($P=0.635$ and $P=0.067$ for the 5 and 10 years disease, respectively), while in 5-10 years has increased. The data is shown in Table 1 and Figure 1.

Fig.1. LPO activity (the level of DC and MDA) in patients with type 2 diabetes suffering to 5 years, 5-10 years and more than 10 years, depending on the $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ polymorphism of the PPARG gene

Based on the fact, that oxidative stress is - an imbalance between processes that are characterized by excessive formation of reactive oxygen and free radicals on the one hand, and AOS activity on the other, there is a need to investigate the performance of AOC.

Effect of polymorphism $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ of the PPARG gene on the AOC was studied by analyzing the activity of SOD, catalase and α -TF levels in patients with type 2 diabetes for 5 years, 5-10 years and more than 10 years, depending on the genotype of the gene, obtained data presented in table 2 and figures 2 and 3.

In patients with type 2 diabetes for 5 years, significant differences between the activity of SOD was not found ($P=0.12$). As shown in Table 2 and Figure 2, we found a probable decrease of

Table 1. Effect of polymorphism $\text{Pro}_{12}\text{Ala}$ of the PPARG gene indicators for DC and MDA depending on the duration of the disease in type 2 diabetes ($M \pm m$)

Polymorphism $\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$ of the PPARG	Duration of the disease		
	To 5 years	5-10 years	More than 10 years
DC, U/ml			
$\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$	3.79±0.195	3.32±0.17	3.12±0.15**
$\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$	2.93±0.36	4.48±1.015*	2.74±0.94
MDA, mmol/g protein			
$\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Pro}$	10.84±0.68	9.53±0.55	8.51±0.69**
$\text{Pro}_{12} \rightarrow \text{Ala}$	8.39±0.79	14.59±4.17*	6.87±0.43

For table 1, 2 and figure 1: * - $P<0.005$ (comparison inside duration group between different polymorphisms); ** - $P<0.005$ (comparison between groups of patients depending on the duration of the disease).

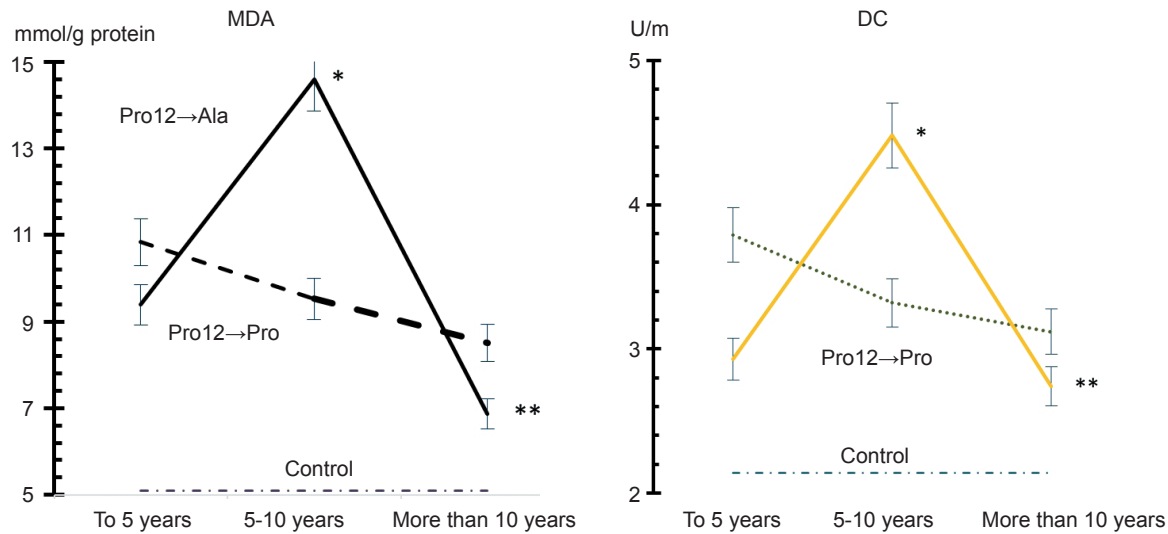


Fig.1. LPO activity (the level of DC and MDA) in patients with type 2 diabetes suffering to 5 years, 5-10 years and more than 10 years, depending on the Pro₁₂→Ala polymorphism of the PPARG gene

SOD activity between patients who had genotype Pro₁₂→Pro, with disease duration of 5 years, 5-10 years and more than 10 years ($P=0.001$), whereas patients with genotype Pro₁₂→Ala such difference was not found ($P=0.462$). It should also pay attention to the fact, that SOD activity in patients with genotype Pro₁₂→Ala, suffering from type 2 diabetes 5-10 years, was higher than in the first 5 years of the disease, though in patients, suffering over 10 years, this figure was in 2 times lower ($P=0.04$).

Thus, the importance of polymorphism rs1801282 of the PPARG gene is that in case of Pro₁₂→Pro SOD activity decreases uniformly

from the first years of disease in type 2 diabetes ($P=0.001$), whereas the presence of genotype Pro₁₂→Ala observed significant (Student's criterion, bilateral critical region, significance at $P=0.004$) decrease in this level only after 10 years of disease.

Significant differences between the levels of catalase activity in patients suffering from diabetes for 5 years was not found ($P=0.55$). In Pro₁₂→Pro genotype carriers were found significant decrease in catalase activity between 5-10 years of disease by 75% ($P=0.001$), and those who are ill for more than 10 years at 2,04 times ($P=0.01$), than was not different from

Table 2. Effect of polymorphism Pro12→Ala of the PPARG gene on activity SOD, catalase and α -TF level, depending on the duration of the disease in type 2 diabetes ($M \pm m$)

Polymorphism Pro ₁₂ →Ala of the PPARG	Duration of the disease		
	To 5 years	5-10 years	More than 10 years
SOD, U/ml			
Pro ₁₂ →Pro	0.59±0.041	0.43±0.015	0.27±0.025**
Pro ₁₂ →Ala	0.41±0.103	0.49±0.029	0.24±0.015
Catalase, mkkat/l			
Pro ₁₂ →Pro	27.56±1.42	23.44±0.46	15.57±0.59**
Pro ₁₂ →Ala	20.96±2.73	41.01±0.45*	31.78±7.17* **
α -TF mkmol/l			
Pro ₁₂ →Pro	8.84±0.45	10.02±0.55	5.76±0.55**
Pro ₁₂ →Ala	9.03±0.82	12.42±2.58	4.32±0.8**

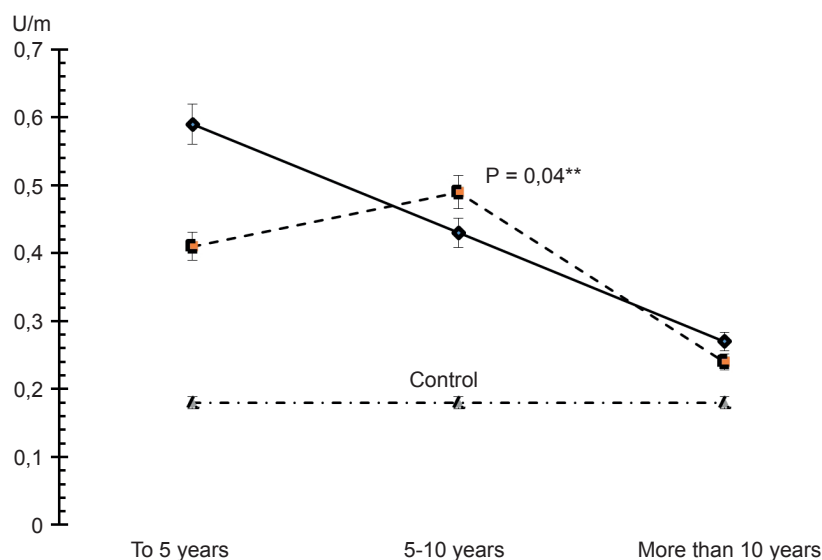


Fig.2. The level of SOD in patients with type 2 diabetes, which affected up to 5 years, 5-10 years and more than 10 years, depending on the polymorphism Pro₁₂→Ala of the PPARG gene. * - P=0.001 when compared with patients suffering from 5-10 and more than 10 years; ** - comparison inside duration 5-10 years group between different polymorphisms

the control ($F=1.19$; $P=0.600$). We proved significant decrease of catalase activity between groups of patients with type 2 diabetes suffering to 5 years, 5-10 years and more than 10 years for both cases Pro₁₂→Pro polymorphism ($P=0.001$) and for Pro₁₂→Ala ($P=0.002$) (Figure 3).

A similar distribution was obtained from the analysis of α -TF level between patients

with different disease duration (Figure 3). It is necessary to point out, that the level of α -TF significantly reduced with the passage of the disease, that evidenced by used univariate analysis of variance between groups of patients with type 2 diabetes for 5 years, 5-10 years and more than 10 years, level of significance for genotype Pro₁₂→Pro was $P=0.001$, and for

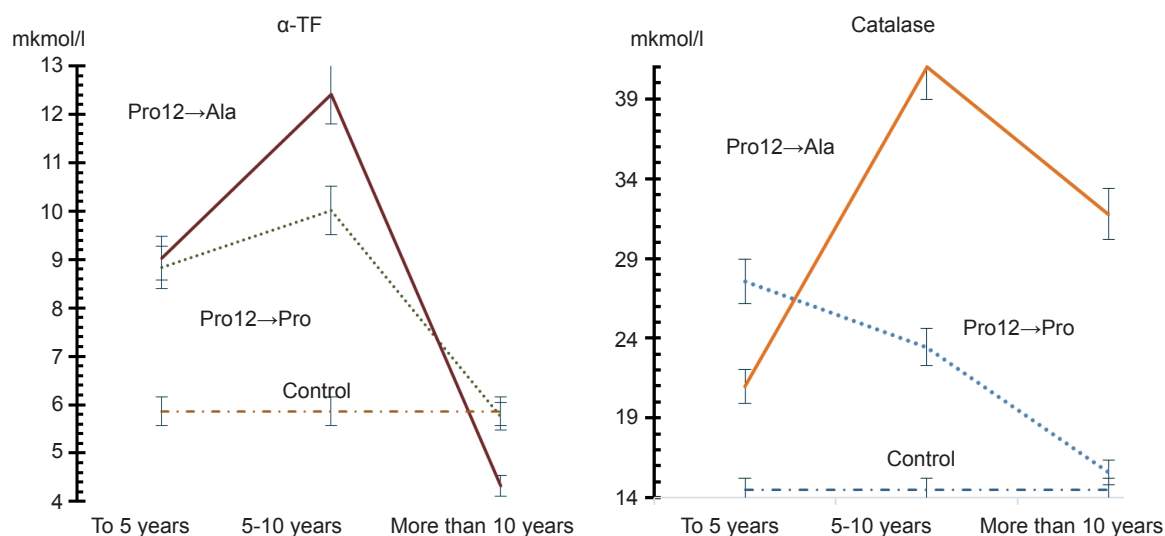


Fig.3. Catalase activity and the level of α -TF in patients with type 2 diabetes, which affected up to 5 years, 5-10 years and 10 years, depending on the polymorphism Pro₁₂→Ala of the PPARG gene. * - $F=1.19$; $P=0.600$ when compared with patients in the control group; ** - $P=0.018$ when compared with patients in the control group

Pro₁₂→Ala - $P=0.046$. During the 10 years of the disease in carriers of genotype Pro₁₂→Pro level of α -TF was no different from the control group ($P=0.87$) and in the case Pro₁₂→Ala - was statistically lower ($F=1.19$; $P=0.018$).

The highest intensification of LPO observed during disease in type 2 diabetes till 5 years, Pro₁₂→Pro genotype carriers with disease duration of 5-10 and over 10 years levels of LPO linear and significantly decreased, although compared with the control, remained at significantly high levels. In case of Pro₁₂→Ala found a significant increase of LPO intensification during disease 5-10 years, whereas after 10 years of disease indices of lipid peroxidation products significantly reduced. AOS activity was significantly higher in carriers of genotype Pro₁₂→Ala, suffering from type 2 diabetes 5-10 years, compared with Pro₁₂→Pro. In patients with type 2 diabetes over 10 years, the presence of polymorphisms Pro₁₂→Pro found catalase enzyme deficiency of AOC, against the background of a significantly high rates of lipid peroxidation, catalase activity significantly does not differ from the control level ($F=1.19$; $P=0.600$), instead in carriers of genotype Pro₁₂→Ala this level was 2 times higher.

Probably the ligand-dependent activation of gene PPARG2 more pronounced in the presence of polymorphisms Pro₁₂→Pro, as evidenced by the linear and the significantly reduction of oxidative stress (as indicators of lipid peroxidation, and both activities AOC) in the course of the disease, whereas carriers of genotype Pro₁₂→Ala, had significantly higher levels of oxidative stress during 5-10 years of disease, but after 10 years of disease - significant reduction, which may be due to the depletion of metabolic processes. The impact of polymorphisms rs1801282 of the PPARG gene for the enzyme catalase link of AOC is somewhat different, because in carriers of the genotype Pro₁₂→Ala, catalase activity is significantly higher.

CONCLUSIONS

1. Type Pro₁₂→Ala of polymorphism rs1801282 of the PPARG gene causes the development of oxidative stress in patients during disease in type 2 diabetes 5-10 years.

2. Polymorphism Pro₁₂→Pro of the PPARG gene causes natural deficiency of enzyme catalase level of antioxidant system in patients with type 2 diabetes, which affects more than 5 years.

В.Я. Мокрій, С.В. Зябіцев

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ PRO₁₂→ALA ГЕНА PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS НА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2-ГО ТИПУ

Досліджували ефект поліморфізму rs1801282 гена PPARG на формування окисного стресу у хворих на цукровий діабет 2-го типу залежно від тривалості захворювання: до 5 років, 5-10 років та понад 10 років. Активність перекисного окиснення ліпідів оцінювали за концентрацією у крові дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), а стан антиоксидантної системи – за активністю супероксиддисмутази, каталази та вмістом α -токоферолу. Молекулярно-генетичне дослідження було проведене методом полімеразно-ланцюгової реакції в реальному часі. Під час тривалості хвороби 5-10 років виявлено збільшення вмісту ДК та МДА у хворих з поліморфізмом Pro₁₂→Ala на 34,9 і 34,7% відповідно порівняно з носіями Pro₁₂→Pro ($P=0,01$). Наявність поліморфізму Pro₁₂→Pro зумовлювало зниження активності каталази в перебіг захворювання 5-10 років на 75% ($P=0,001$), а у тих, хто хворіє більше ніж 10 років в 2,04 рази ($P=0,01$), що статистично не відрізняється від контрольного рівня ($F=1,19$; $P=0,600$), тоді як у разі Pro₁₂→Ala, ці показники були у двічі вищими. Отже, нами виявлено, що варіант Pro₁₂→Ala поліморфізму rs1801282 гена PPARG призводить до максимального розвитку окисного стресу у хворих на цукровий діабет 2-го типу з тривалістю захворювання 5-10 років, а наявність Pro₁₂→Pro зумовлює недостатність активності ферментативної каталазної ланки антиоксидантної системи у пацієнтів, що хворіють понад 5 років.

Ключові слова: поліморфізм Pro₁₂→Ala гена PPARG; rs1801282; цукровий діабет 2-го типу; окисний стрес.

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, Україна;

В.Я. Мокрий, С.В. Зяблицев

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА PRO₁₂→ALA ГЕНА PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Исследовали эффект полиморфизма rs1801282 гена PPARG на формирование окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от длительности заболевания: до 5 лет, 5-10 лет и более 10 лет. Активность перекисного окисления липидов оценивали по концентрации в крови диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), а состояние антиоксидантной системы - по активности супероксиддисмутазы, каталазы и содержания α-токоферола. Молекулярно-генетическое исследование было проведено методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В течение срока болезни 5-10 лет выявлено увеличение содержания ДК и МДА у больных с полиморфизмом Pro₁₂→Ala на 34,9 и 34,7% соответственно в сравнении с носителями Pro₁₂→Pro (P=0,01). Наличие полиморфизма Pro₁₂→Pro приводило к снижению активности каталазы в период заболевания 5-10 лет на 75% (P=0,001), а в тех кто болеет более 10 лет в 2,04 раза (P=0,01), что статистически не отличается от контрольного уровня (F=1,19; P=0,600), тогда как в случае Pro₁₂→Ala, эти показатели были в два раза выше. Таким образом, нами выявлено, что вариант Pro₁₂→Ala-полиморфизма rs1801282 гена PPARG приводит к максимальному развитию окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2-го типа с длительностью заболевания 5-10 лет, а наличие Pro₁₂→Pro обуславливает недостаточность активности ферментативного каталазного звена антиоксидантной системы у пациентов, страдающих более 5 лет.

Ключевые слова: полиморфизм Pro₁₂→Ala гена PPARG; rs1801282; сахарный диабет 2-го типа; окислительный стресс

REFERENCES

1. Pankiv VI. Ways of improving tactics to assist people with diabetes in an outpatient setting (pharmacological approach).

2. Zhurakivska OY, Titik VV, Zhurakivska VM, Pertsovich VM. The role of processes of lipid peroxidation in diabetic microangiopathies. *Ach Clin Exp Med*. 2014;№12: 232. [Ukrainian].
3. Sorokina YA, Lovtsova LV. Odds of oxidative stress as a way of personification of pharmacotherapy in the debut of type 2 diabetes. *Univ Med Farm J*. 2015; №1[14]: URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1868>. [Russian].
4. Bandeira SM, Guedes GS, da Fonseca LJ et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012:URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509371/pdf/>
5. Bondar IA. Association of polymorphic markers TCF7L2 rs7903146 gene and rs1801282 PPARG gene [Pro12Ala] with type 2 diabetes in the Novosibirsk region. *Diab Mel*. 2013;№4:17-22. [Russian].
6. Zyblytsev SV, Mokriy VY. Association 12Pro allele of polymorphism rs1801282 of the PPAR gene with type 2 diabetes. *Clin Endocr Endocr Surg*. 2016;№3(55):34-8. [Ukrainian].
7. Liu L, Zheng T, Wang F, Wang N, Song Y, Li M, L Li, Jiang J, Zhao W. Pro12Ala polymorphism in the PPARG gene contributes to the development of diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diab Care*. 2010;33[1]:144-9.
8. Ivanova EA, Parolari A, Myasoedova V, Melnichenko AA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR] gamma in cardiovascular disorders and cardiovascular surgery. *J Cardiol*. 2015; 66(4):271-8. [Russian].
9. Chia-Ter Chao, Yen-Ching Chen, Chih-Kang Chiang, Jenq-Wen Huang, Cheng-Chung Fang, Chen-Chih Chang, and Chung-Jen Yen. Interplay between Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Polymorphisms on the Risk of End-Stage Renal Disease among Han Chinese Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:ID 8516748.
10. Ziablytsev SV, Mokrii VY, Crystal MV. The value of polymorphism Rro12Ala gene PPARG in violation of lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Ed, Health and Sport*. 2016;6(9):626-36.

Received 23.09.2016

НО-ергічний контроль функції кровообігу у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом за умов тривалого цілодобового освітлення

Л.М. Шаповал, Б.С. Коп'як, О.В. Дмитренко, В.О. Майський, О.П. Маньківська, В.Ф. Сагач

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

Дослідження проведено на щурах з однобічним ушкодженням дофамінергічних (ДА) нейронів чорної субстанції (substantia nigra, SN) середнього мозку (експериментальний геміпаркінсонізм). Показано, що дегенерація ДА-нейронів SN супроводжується розвитком гіперактивності тих ДА-рецепторів, що залишилися неушкодженими і реагують на апоморфіновий (Аро) тест обертальними рухами. Асиметрія рухової поведінки тварин чітко корелює з рівнем ушкодження нейронів SN, що підтверджує морфологічний аналіз дегенеративних змін ДА-нейронів SN. Після введення 6-ГОДА у SN 42,6% тварин демонстрували інтенсивні Аро-індуковані обертальні рухи (понад 180об/30хв), що згідно з результатами морфологічного аналізу відповідало руйнуванню 90 % ДА-нейронів у цій ділянці мозку. Ін'єкції L-аргініну у медулярні ядра (обопільне ядро, латеральне ретикулярне ядро і парамедіанне ядро) цих щурів супроводжувалися розвитком менш виражених змін системного артеріального тиску порівняно з контролем. При цьому значно підвищувалась активність індукційної NO-синтази, в той час як активність її конститутивної ізоформи мала тенденцію до зниження порівняно з такою у контрольних щурів. Виявлено, що в умовах тривалого (3 тиж) цілодобового освітлення тварин (кольорова температура 2700К, світловий потік 180лм, інтенсивність освітлення 40лк) зменшується кількість неушкоджених або недостатньо ушкоджених нейронів: 35,0% (щодо 53,8% в контролі) не виявили поведінкової асиметрії в Аро-тесті. Значно зменшилась активність конститутивної NO-синтази у довгастому мозку, міокарді і мітохондріях серця, що призвело до пригнічення *de novo* синтезу NO. Зокрема цей показник знизився у гомогенаті довгастого мозку більше ніж вдвічі ($2,46 \pm 0,80$ нмоль / хв ($P < 0.05$) порівняно з $5,44 \pm 0,35$ нмоль / хв у контрольних щурів). Отримані результати свідчать про те, що при експериментальному геміпаркінсонізмі знижується медулярний НО-ергічний контроль функції кровообігу у щурів, а тривале цілодобове освітлення тварин поглиблює негативний вплив дегенерації ДА-нейронів SN.

Ключові слова: оксид азоту; довгастий мозок; чорна субстанція; освітлення.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона є однією із найбільш розповсюджених нейродегенеративних захворювань центральної нервової системи. Вона зумовлена прогресуючою дегенерацією дофамінергічних (ДА) нейронів екстрапірамідної системи (базальні ядра, чорна субстанція, блакитна пляма тощо), найбільшою мірою дегенеративні зміни спостерігаються у передніх

відділах чорної субстанції (substantia nigra, SN) середнього мозку. На цей час доведено, що типові для хвороби Паркінсона симптоми у людини виникають при загибелі 60–80% нейронів цього анатомічного утворення, причому дегенеративні зміни супроводжуються вегето-вісцеральною дисфункцією, в тому числі розладами діяльності серцево-судинної системи [1-4]. Зокрема, у тварин з хронічним дефіцитом нігростріатного дофаміну пору-

© Л.М. Шаповал, Б.С. Коп'як, О.В. Дмитренко, В.О. Майський, О.П. Маньківська, В.Ф. Сагач

шується систолічна і діастолічна функція серця, збільшується жорсткість міокарда, підвищується чутливість мітохондріальної пори (МП) до відкривання [2]. Вважають, що нітрозативний стрес відіграє важливу роль у патогенезі хвороби Паркінсона на тій підставі, що у SN виявлено надмірно високий вміст нейрональної і індукцйбельної NO-синтази (cNOS та iNOS відповідно) [3,4], що може викликати цитотоксичні зміни у мозку. Рівні активності цих ензимів і відповідно продукції оксиду азоту (NO) у довгастому мозку, який традиційно вважається важливим центром регуляції функції кровообігу, ще не з'ясовані. Накопичена величезна кількість даних [5–9], які свідчать про залучення NO у медулярний контроль діяльності серцево-судинної системи як гальмівного трансмітера. У довгастому мозку ідентифіковано велику кількість NO-синтезувальних нейронів [10, 11]. Відомо, що NO взаємодіє з багатьма ендogenousними агентами, зокрема з гормоном епіфіза мелатоніном [12]. Чисельні дослідження вказують на те, що цей гормон залучається у регуляцію серцево-судинної системи [13–20]. Про значення мелатоніну в регуляції діяльності серцево-судинної системи свідчить наявність циркадного ритму артеріального тиску та частоти серцевих скорочень у людини [13, 14], його участь у поліпшенні гемодинаміки, скоротливої активності міокарда і судинної реактивності [15–18], зменшенні розміру інфаркту і апоптотичної загибелі кардіоміоцитів [19]. Отримані також інтригуючі дані про те, що мелатонін є інгібітором відкриття МП, і попередження цього процесу за допомогою мелатоніну сприяє кардіопротекції у старих шурів [2, 20], тому слушним є припущення, що дефіцит гормону негативно впливає на діяльність серцево-судинної системи. Найбільш потужним синхронізатором синтезу мелатоніну вважається світло. Відомо, що при денному освітленні синтетичні і секреторні процеси в епіфізі пригнічуються, а в темряві посилюються [13, 14]. Можна очікувати, що тривале порушення циклу

день-ніч за допомогою штучного освітлення приміщення погіршить регуляцію функції кровообігу кардіоваскулярними нейронами довгастого мозку шурів.

Мета нашої роботи - оцінити особливості NO-ергічного контролю діяльності серцево-судинної системи нейронами довгастого мозку шурів із дефіцитом дофаміну у SN при тривалому освітленні тварин.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на шурах-самцях лінії Вістар масою 200–350 гр згідно з Європейською директивою ради громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС; Страсбург).

Модель експериментального геміпаркінсонізму. Експерименти здійснювали під нембуталовим наркозом (50 мг/кг, внутрішньоочеревинно, «Sigma», США). Всі використані в роботі препарати були цієї фірми. Геміпаркінсонізм розвивався внаслідок введення 6-гідроксидофаміну (6-ГОДА, 8 мкг) у лівий медіальний пучок переднього мозку [21] згідно з стереотаксичними координатами [22], що викликало одностороннє ушкодження ДА-нейронів у SN. Препарат вводили через скляну мікропіпетку (діаметр кінчика не перевищував 100 мкм), прикріплену до мікроін'єктора. Перед введенням нейротоксин розчиняли в 4 мкл 0,9% -го охолодженого льодом фізіологічного розчину. Щоб запобігти окисненню препарату, додавали 0,1%-й розчин аскорбінової кислоти. Для пригнічення метаболічної трансформації 6-ГОДА моноаміноксидазою, шурам вводили паргілін (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно за 30 хв до ін'єкції нейротоксину. Крім того, дезипрамін (25 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно для запобігання поглинання 6-ГОДА норадренергічними нейронами. Ін'єкції 6-ГОДА призводили до гіперактивності ДА-рецепторів [23, 24]. Через тиждень після операції усіх тварин піддавали скринінгу з використанням агоніста ДА-рецепторів апоморфіну (Аро, 0,5 мг/кг, внутрішньоочеревинно) для перевірки рівня

ушкодження нейротоксином ДА-нейронів SN. Ін'єкції Аро щурам з однобічним ураженням нігровіаційної ДА-системи викликають обертальні рухи в контралатеральний бік ушкодженої половини мозку [24]. Залежно від середньої частоти обертів за 30 хв спостереження, дослідні тварини в кожній групі були розділені на три підгрупи, а саме: щури, які здійснювали понад 180 обертів (підгрупа I), менше ніж 180 обертів (підгрупа II) і щури без поведінкової асиметрії, 0 обертів (підгрупа III). Оскільки інтенсивність рухів залежить від ступеня поширення ураження SN, ця модель є зручним підходом для отримання примусових рухів тварин різної інтенсивності. Такі закономірності асиметрії рухової поведінки тварин у підгрупах чітко корелюють з рівнем ушкодження нейронів SN, що було підтверджено за допомогою морфологічного контролю.

Морфологічний аналіз дегенеративних змін ДА-нейронів SN. За допомогою світлової мікроскопії досліджували три ділянки SN, а саме: *substantia nigra compacta* (SNC), *substantia nigra lateralis* (SNL) і *substantia nigra medialis* контрольних щурів і щурів із 6-ГОДА-індукованою дегенерацією ДА-нейронів на рівні 5,60 мм каудально від Bregma згідно з атласом [22]. Фронтальні зрізи мозку товщиною 40мкм фарбували крезил віолетом. ДА-нейрони виявляли у зрізах мозку при збільшенні у 100 і 250 разів за блакитним забарвленням їх цитоплазми та відростків. Інтенсивно забарвлювалися також ядра гліальних клітин.

Освітлення тварин. Приміщення, в якому перебували щури, освітлювали цілодобово протягом 3 тиж. Для цього використовували спіральну лампу (Delux 2700K T4 Full Spiral; 230В, 32Вт, 1800лм, 2700К), світловий потік якої становив 1800лм, кольорова температура - 2700К, і інтенсивність освітлення 40 лк. Усі щури (n=30) були розміщені у віварії і регулярно забезпечувалися свіжою підстилкою, їжею і водою. Контрольну групу щурів тримали на стандартній дієті і в умовах природного циклу день–ніч.

Дослідження медулярного нервового контролю. Експерименти проводили на щурах під уретановим наркозом (1,7г/кг, внутрішньоочеревинно, n=20). Після фіксації голови тварини у стереотаксичному приладі СЕЖ-3, модифікованому для роботи на дрібних тваринах, здійснювали часткову трепанацію черепа і відкривали дорсальну поверхню довгастого мозку. Вся хірургічна процедура тривала 20–25хв. Фармакологічні агенти вводили в ядра довгастого мозку, які безпосередньо залучені у нервовий контроль функції кровообігу (парамедіанне ядро–PMn; обопільне ядро–AMB; латеральне ретикулярне ядро–LRN) в об'ємі 100 нл, за допомогою мікрошприця з каліброваним мікрометричним гвинтом, згідно з стереотаксичними координатами атласу щура [22]. В медулярні ядра довгастого мозку ін'єкували L-аргінін (10^{-10} - 10^{-6} моль/л, «Sigma», США) для активації nNOS. Специфічний антагоніст nNOS 7-нітроіндазол (30мг/кг, «Sigma», США) вводили внутрішньоочеревинно за 30 хв до початку досліду. Системний артеріальний тиск (CAT) вимірювали у сонній артерії за допомогою катетера, заповненого гепаринизованим фізіологічним розчином. Гепарин (500 од / kg^{-1}) був використаний для запобігання розвитку тромбів. Всі біохімічні показники контролювали у гомогенатах довгастого мозку, серця і мітохондріях серця.

Для визначення активності NOS (Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної) використовували класичний метод [25] у модифікації [26], за допомогою спектрофотометричного вимірювання продукту реакції – L-цитруліну. Сумарну активність NOS (cNOS+iNOS визначали у пробах, що містили 0,5–1 мг білка, які інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (мкмоль/мл): KH_2PO_4 - 50, MgCl_2 - 1, CaCl_2 - 2, НАДФН (“Sigma”, США) - 1, L-аргінін - 2, при закисненні розчину до pH 7,0, протягом 60 хв при 37°C. Суміш центрифугували протягом 10 хв і в надосадковій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну висо-

коспецифічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Для визначення активності Ca^{2+} -незалежної iNOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 додавали 2 мкмоль ЕДТА. Активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи значення активності iNOS від сумарної активності NOS.

Активність аргінази визначали методом, який базувався на оцінці утворення сечовини в інкубаційній суміші [27], що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс- HCl -буфері (рН 8,0). Інкубацію проводили при 37°C протягом 60хв, а реакцію зупиняли, додаючи 0,3мл 2N HClO_4 . Осадок у буфері видаляли центрифугуванням та в надосадковій фракції визначали вміст сечовини, що утворилася.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили із використанням стандартних програмних пакетів Excel та Origin 7.0 (MS Office XP). Всі результати виражені у вигляді середнього значення \pm SEM. Вірогідність відмінностей між контрольною та дослідною групами оцінювали за критерієм t Стюдента. При порівнянні середньої кількості забарвлених клітин SN використовували статистично дисперсійний аналіз ANOVA. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дегенеративні зміни у ДА-нейронах SN оцінювали за допомогою поведінкового Аро-тесту і морфологічного аналізу дегенерації. Слід зазначити, що Аро-індукована асиметрія рухової поведінки тварин виникає тільки тоді, коли понад 80% ДА-продукуючих нейронів SN гинуть, оскільки при ушкодженні невеликої кількості клітин компенсаторні механізми, спрямовані на збереження концентрації дофаміну в цій структурі, перешкоджають розвитку індукованої дегенерацією гіперчутливості. В останньому випадку, відбувається надмірно швидке зростання і переорієнтація процесів, збільшення секреторної активності тих ДА-синтезуювальних клітин, які зали-

шаються неушкодженими після часткового руйнування ДА-системи [23]. У дослідженнях, проведених на 197 щурах лінії Вістар, яким вводили у мозок нейротоксин 6-ГОДА, 84 щура (42,6%) демонстрували інтенсивні Аро-індуковані обертальні рухи за 30 хв (понад 180 об); у 7 тварин (3,6%) рухова активність була незначною (менше ніж 180 об) і у 106 тварин (53,8%) обертальні рухи не спостерігали (рис. 1). За результатами морфологічного аналізу, ДА-синтезувальні нейрони SN середнього мозку зруйновані в цих групах на 90, 86 і 44% відповідно. Саме тому Аро-індуковані обертальні рухи спостерігаються тільки в перших двох підгрупах і не відмічаються в третій.

На мікрофотографіях фронтальних зрізів компактної, латеральної і медіальної зон SN контрольних щурів чітко видно велику кількість забарвлених крезил віолетом ДА-нейронів (рис.2, а–в), найбільша кількість яких відмічається у компактній SN (SNC) (див. рис.2, є). Введення нейротоксину 6-ГОДА супроводжується значним зниженням кількості забарвлених нейронів на боці дегенерації (зліва; див. рис.2, г–е). Слід відмітити, що у всіх трьох досліджених зонах SN дегенера-

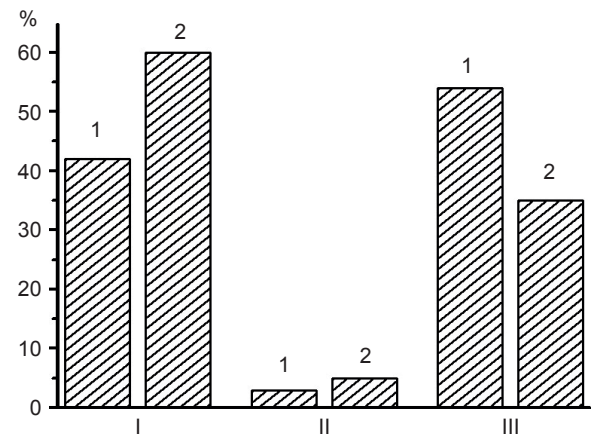


Рис. 1 Вплив тривалого цілодобового освітлення на рухову активність щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом (апоморфіновий тест): I – кількість щурів, які реагують інтенсивними ротаційними рухами, II – кількість щурів, які реагують менш інтенсивними ротаційними рухами, III – кількість щурів, які не реагують ротаційними рухами; 1-6-ГОДА, 2- 6-ГОДА та освітлення

тивні зміни відмічалися у 90 % ДА-нейронів (див. рис.2,ж).

Отже, 6-ГОДА-індуковане ушкодження ДА-нейронів SN, яке лежить в основі експериментального геміпаркінсонізму, підтверджують поведінкова асиметрія рухової активності в Аро-тесті і морфологічний аналіз руйнування значної частини (90%) ДА-синтезувальних нейронів.

Особливості медулярного NO-ергічного кардіоваскулярного контролю у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом. При хворобі Паркінсона у SN людини надмірно посилюється продукція NO за рахунок надмірної активації ізоформ nNOS і iNOS [4]. Подібно до результатів, отриманих для SN, у довгастому мозку таких щурів ми спостерігали значне (на 254,3 %, від $1,4 \pm 0,13$ до $4,96 \pm 0,22$ пмоль/хв.; $P < 0,05$) підвищення активності iNOS, що

є очікуваним і свідчить про розвиток нітративного стресу. Водночас, на відміну від SN, у довгастому мозку щурів із дефіцитом ендogenous ДА спостерігається тенденція до зниження активності cNOS порівняно з такою у контрольних тварин. Зокрема, активність cNOS у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом знижується на 24,8% ($P > 0,05$), від $5,44 \pm 0,35$ пмоль / хв у контролі до $4,09 \pm 0,13$ ($P > 0,05$), що сприяє зниженню конститутивного синтезу NO (рис.3). Оскільки у нейронах ЦНС експресується переважно nNOS, а eNOS експресується тільки в астроцитах і ендотеліальних клітинах мозкових судин [28], слід вважати, що при дефіциті нігостріатного дофаміну синтез NO в нейронах довгастого мозку зменшується за рахунок пригнічення активності саме nNOS.

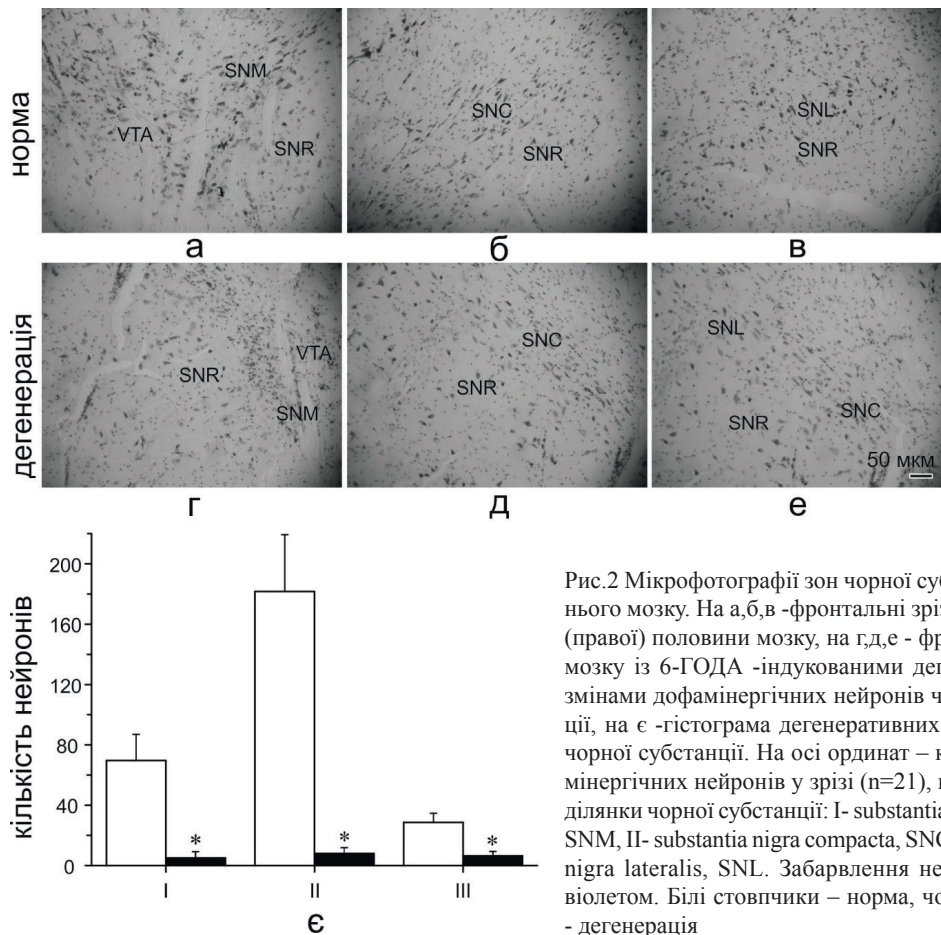


Рис.2 Мікрофотографії зон чорної субстанції середнього мозку. На а,б,в -фронтальні зрізи контрольної (правої) половини мозку, на г,д,е - фронтальні зрізи мозку із 6-ГОДА -індукованими дегенеративними змінами дофамінергічних нейронів чорної субстанції, на е -гістограма дегенеративних змін нейронів чорної субстанції. На осі ординат – кількість дофамінергічних нейронів у зрізі (n=21), на осі абсцис – ділянки чорної субстанції: I- substantia nigra medialis, SNM, II- substantia nigra compacta, SNC, III- substantia nigra lateralis, SNL. Забарвлення нейронів крезил біолоетом. Білі стовпчики – норма, чорні стовпчики – дегенерація

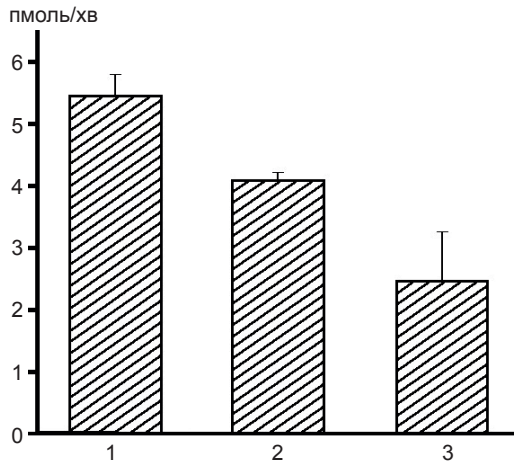


Рис. 3. Активність конститутивної NO-синтази у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом: 1- контроль, 2- після дегенерації дофамінергічних нейронів, 3- після дегенерації дофамінергічних нейронів на фоні цілодобового освітлення тварин впродовж 3 тиж

Треба зазначити, що результати біохімічних досліджень добре узгоджуються з фізіологічними. Так, активація nNOS у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом за допомогою ін'єкцій L-аргініну у медулярні ядра, які залучені у нервовий контроль функції кровообігу, супроводжувалася значним послабленням гіпотензивних ефектів, порівняно з контролем. Так, у щурів з експериментальною хворобою Паркінсона ін'єкції L-аргініну (10^{-10} моль/л) в AMB, LRN

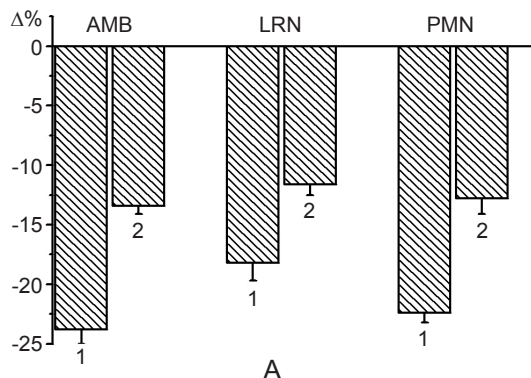


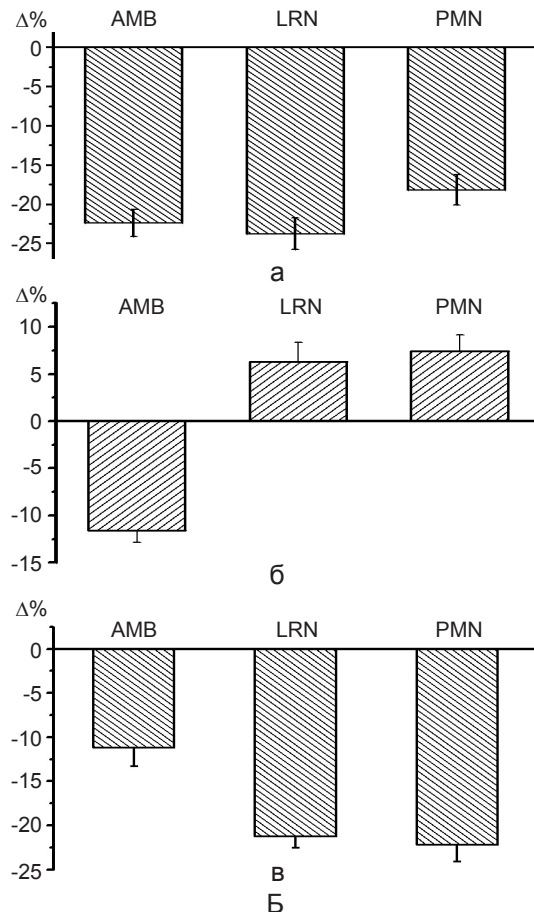
Рис.4 Ефекти ін'єкцій L-аргініну (10^{-10} моль/л) в ядра довгастого мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом у нормальному світловому режимі (А) і після тривалого цілодобового освітлення цих тварин (Б).

На А: 1- контроль, 2 - після дегенерації дофамінергічних нейронів чорної субстанції.

На Б: а - контроль (L-аргінін, 10^{-10} моль/л), б – щури з геміпаркінсонізмом після 3-тижневого освітлення (L-аргінін, 10^{-8} моль/л), в – щури з геміпаркінсонізмом після 3-тижневого освітлення (L-аргінін, 10^{-6} моль/л). AMB- обопільне ядро, n.ambiguus, LRN-латеральне ретикулярне ядро, PMn – парамедіанне ядро

і PMn призводили до зниження рівня САТ на 13,4, 11,6 і 12,8% відповідно порівняно зі зниженням цього показника на 23,8, 18,2 і 22,4 % ($P<0,05$) відповідно у контрольних тварин (рис. 4).

Таким чином, послаблення ефектів ін'єкцій L-аргініну у щурів із дегенеративними змінами ДА-нейронів SN узгоджується з результатами біохімічного дослідження про зменшення активності nNOS і, відповідно, зниження конститутивного синтезу NO через L-аргінін – cNOS-шлях на рівні довгастого мозку. В біохімічному і фізіологічному дослідженнях ми аналізували



групу тварин з максимальним ушкодженням ДА-синтезувальних нейронів чорної субстанції.

Ефекти тривалого освітлення тварин на ДА-продукуючі нейрони SN на моделі експериментального геміпаркінсонізму. Тривале (впродовж 3 тиж) цілодобове освітлення щурів із дегенеративними змінами ДА-нейронів SN супроводжувалося збільшенням кількості ушкоджених нейронів. Зокрема, 60,0% тварин відповідали на системне введення Аро інтенсивними обертальними рухами (щодо 42,6% у контролі), 5,0% (щодо 3,6% у контролі) виконували незначні обертальні рухи. При цьому зменшилася кількість неушкоджених або недостатньо ушкоджених нейронів: 35,0% (щодо 53,8% в контролі) не виявили поведінкової асиметрії в Аро-тесті. (див. рис. 1).

Вплив тривалого освітлення на медулярний кардіоваскулярний контроль у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом. Після тривалого цілодобового освітлення щурів спостерігається значне послаблення активності cNOS у довгастому мозку (див. рис.3, таблиця), яке призводить до пригнічення *de novo* синтезу NO. Так, активність cNOS у гомогенаті довгастого мозку знижується більше ніж вдвічі до $2,46 \pm 0,80$ пмоль / хв ($P < 0,05$) порівняно з $5,44 \pm 0,35$ пмоль / хв у контрольних щурів. Отримані результати свідчать про те, що тривале освітлення

тварин супроводжується значним зниженням синтезу NO у довгастому мозку щурів. При цьому також знижується синтез NO в тканинах і мітохондріях серця (див. таблицю), тобто порушення в системі NO відбуваються не тільки в центральних, але також у периферичних елементах системи кровообігу. При тривалому цілодобовому освітленні щурів спостерігається також поглиблення нітрозативного стресу, про що свідчить значне підвищення активності iNOS у довгастому мозку і серці (див. таблицю).

Треба також зазначити, що у фізіологічних експериментах на тваринах з геміпаркінсонізмом після тривалого освітлення ми не відмічали зрушень рівня САТ при введенні L-аргініну в концентрації 10^{-10} моль/л, а в концентрації 10^{-8} моль/л спостерігалися статистично невірогідні ($P > 0,05$) гіпотензивні реакції (PMn), або взагалі розвиток гіпертензивних реакцій (AMB і LRN) у структурах довгастого мозку, в яких експресується pNOS. Зокрема, введення L-аргініну (10^{-8} моль/л) в PMn викликало статистично невірогідні зміни рівня САТ: його зниження на 11,6 % ($P > 0,05$) або незначне підвищення в середньому на 6,3 і 7,4 % ($P > 0,05$) у AMB ($n=10$) і LRN ($n=10$). Тільки при збільшенні концентрації до 10^{-6} моль/л ін'єкції L-аргініну супроводжувалися зниженням рівня САТ у всіх трьох ядрах: у LRN, AMB і PMn на 22,2, 21,2 і 11,2 % ($P < 0,05$), тобто воно наближа-

Активність (пмоль/хв) ферментів синтезу оксиду азоту в умовах тривалого цілодобового освітлення

Схема досліджу	NO-синтаза		Аргіназа
	конститутивна	індуцибельна	
Довгастий мозок			
Контроль	5,44±0,35	1,40±0,13	1,03±0,12
Освітлення	2,46±0,80	12,13±1,01	3,76±0,42
Серце			
Контроль	6,38±1,14	1,25±0,35	1,13±0,14
Освітлення	1,09±0,43*	11,52±4,1*	2,75±0,46*
Мітохондрії серця			
Контроль	3,64±0,27	1,5±0,06	2,11±0,17
Освітлення	2,07±0,5	6,16±1,24	6,27±0,77***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно з контролем

лося до значень у контрольних щурів при введенні амінокислоти в концентрації 10^{-10} моль/л (рис.5).

Отже, тривале цілодобове освітлення щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом сприяє подальшому зменшенню продукції NO в центральних (довгастий мозок) і периферичних (серце) механізмах регуляції функції кровообігу.

Слід відмітити, що в умовах тривалого цілодобового освітлення, на фоні значно зниженої активності cNOS в 4 рази підвищується активність аргінази, іншого ензиму, що використовує L-аргінін як субстрат для метаболічних перетворень на конкурентній з cNOS основі. В цьому випадку зниження активності cNOS може бути наслідком дефіциту L-аргініну для метаболічних перетворень. В умовах тривалого цілодобового освітлення у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом поглиблюється нітрозативний стрес (див. таблицю).

Отже, у тварин з експериментальним геміпаркінсонізмом, який розвивається внаслідок руйнування значної частини ДА нейронів SN середнього мозку, послаблюється NO-ергічний контроль функції кровообігу кардіоваскулярними нейронами довгастого мозку, а саме: знижується активність nNOS і, відповідно, de novo синтез NO, що призводить до зменшення ефектів її активації при ін'єкціях L-аргініну в медулярні ядра. Тривале цілодобове освітлення щурів впродовж 3 тиж, яке звичайно супроводжується зменшенням синтезу гормону епіфіза мелатоніну [29], поглиблює негативний вплив руйнування ДА-нейронів SN на систему кровообігу. Зокрема, тривале цілодобове освітлення послаблює ефекти активації nNOS у низці ядер довгастого мозку, зокрема в n.ambiguus, латеральному і парамедіанному ядрах. Отримані нами результати також свідчать про підвищену активність iNOS у довгастому мозку і серці щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом, яка додатково посилюється в умовах тривалого цілодобового освітлення.

L.M. Shapoval, B.S. Kop'yak, O.V. Dmytrenko, V.O. Mayskiy, O.P. Mankivska, V.F. Sagach

NO-ERGIC CONTROL OF BLOOD CIRCULATION IN THE MEDULLA OBLONGATA OF RATS WITH EXPERIMENTAL HEMIPARKINSONISM UNDER EXPOSURE TO CONTINUOUS LIGHT

The study was conducted on rats with unilateral damage to dopaminergic (DA) neurons in substantia nigra of the midbrain (experimental hemiparkinsonism). Degeneration of dopaminergic (DA) neurons was accompanied by hyperactivity of those neurons that remained intact and responded to apomorphine (Apo) test by rotational movements. Depending on the number of rotations, three groups of animals were defined. In the medulla oblongata of rats with unilateral damage to dopaminergic (DA) neurons, a significant increase in the activity of inducible NO-synthase (iNOS) was observed, while the activity of constitutive NO-synthase (cNOS) tended to decrease compared with that in control rats. An activation of neuronal NO-synthase (nNOS) in those rats by injections of L-arginine in the medullary nuclei was accompanied by weakening of the hemodynamic effects compared to those in control rats. An exposure of animals to continuous light for three weeks was accompanied by increasing the number of damaged DA-ergic neurons in substantia nigra. At that, a significant decrease in cNOS activity in the medulla oblongata was observed, leading to the inhibition of de novo synthesis of nitric oxide (NO). The reduction of NO synthesis in the medulla oblongata neurons of rats with experimental hemiparkinsonism following their exposure to continuous light was also evidenced by the reduction of the amount of nitrite (NO_2^-) anion.

Key words: nitric oxide; medulla oblongata; substantia nigra; exposure to light.

OO.Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Л.М.Шаповал, Б.С.Коп'як, О.В.Дмитренко, В.А.Майський, Е.П.Маньковская, В.Ф.Сагач

НО-ЭРГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФУНКЦИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕМИПАРКИНСОНИЗМОМ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Исследование проведено на крысах с односторонним повреждением дофаминергических (ДА) нейронов черной субстанции (substantia nigra) среднего мозга (экспериментальный гемипаркинсонизм). Дегенерация ДА-нейронов черной субстанции сопровождалась развитием гиперактивности тех нейронов, которые остались неповрежден-

ними і реагировали на апоморфиновий (Аро) тест вращательными движениями. В зависимости от количества ротаций, выделены три группы животных. ДА-нейроны черной субстанции разрушены в этих группах на 96, 86 и 44%. В продолговатом мозгу крыс с экспериментальным гемипаркинсонизмом наблюдалось значительное повышение активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS), а активность конститутивной NO-синтазы имела тенденцию к снижению по сравнению с такой у контрольных крыс. Эффекты инъекций L-аргинина в медуллярные ядра, вовлеченные в нервный контроль функции кровообращения, у этих крыс были менее выраженными по сравнению с контролем. Длительное круглосуточное освещение животных с экспериментальным гемипаркинсонизмом сопровождалось увеличением количества поврежденных ДА-эргичных нейронов черной субстанции и нарушением медуллярного NO-эргического контроля. В частности, значительно уменьшалась активность cNOS в продолговатом мозгу, что приводило к угнетению *de novo* синтеза оксида азота. О снижении синтеза NO нейронами продолговатого мозга в условиях недостаточного синтеза мелатонина свидетельствует также снижение пулов нитрит-аниона и низкомолекулярных нитрозотриолов, а также ослабление физиологических эффектов инъекций L-аргинина в медуллярные ядра.

Ключевые слова: оксид азота; продолговатый мозг; черная субстанция; освещение.

REFERENCES

1. Magerkurt C, Schnitzer R, Braune S. Symptoms of autonomic failure in Parkinson's disease: prevalence and impact on daily life. *Clin Auton Res*. 2005;15(2):76-82.
2. Talanov SA, Kotsuruba AV, Chorna SV, Rudyk OV, Sagach VF. Increased sensitivity of mitochondrial permeability transition causes myocardial dysfunction in rats with chronic deficiency of nigrostriatal dopamine. In: *Adv Biomed Res, Univ Cambridge*. 2010;318-22
3. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1792(7):643-50.
4. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2416-26.
5. Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci Lett*. 1991;132:47-50.
6. Krukoff TI. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res*. 1999;30:52-65.
7. Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular functions. *Cardiovascul Res*. 1999; 43:839-649.
8. Shapoval LN. Nitric oxide and nervous control of cardiovascular function. In: *Receptors, Channels and Messengers*. Kostyuk PG, Lukyanetz EA eds., DUS Kiev. 2005; p.318-37.
9. Phattananarudee A, Towiwat P, Maher TJ, et al. Effects of medullary administration of a nitric oxide precursor on cardiovascular responses and neurotransmission during static exercise following ischemic stroke. *Canad J Physiol Pharmacol*. 2013;91(7):510-20.
10. Zanzinger J, Seller H. Species differences in the distribution of nitric oxide synthase in brain stem regions that regulate sympathetic activity. *Brain Res*. 1997;764:265-68.
11. Lin LH, Taktakishvili O, TALMAN WT. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res*. 2007; 1171:42-51.
12. Aydogan SM, Yerer AB, Goktas Melatonin and nitric oxide J. *Endocrinol Invest*. 2006;29(3):281-87.
13. Reiter RJ. Melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol Rev*. 1991; 12:151-80.
14. Dorminguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez JJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res*. 2010; 49:14-22.
15. Pechanova O., Paulis L., Simko F. Peripheral and central effects OF melatonin on blood pressure regulation. *Int J Mol Sci*. 2014;15:17920-937.
16. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res*. 2007;56:671-84.
17. Vazan R, Beder I, Styk J. Melatonin and the heart. *Cesk Fysiol*. 2004;53:29-33
18. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, et al. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1998;345:67-69.
19. Dobsak P, Siegelova I, Eicher JC et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology*. 2003;9:179-87.
20. Sagach VF, Rudyk OV, Vavilova GL, Kotsiuruba AV, Tkachenko JuP. Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats. *Fiziol Zh*. 2006;52(3):3-14 [Ukrainian].
21. Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5:107-10.
22. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Acad Pres New York, 1982;
23. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand*. 1971;82:69-93.
24. Agid Y, Javoy F, Glowinski G. Hyperactivity of remaining dopaminergic neurons after partial destruction of the nigro-striatal dopaminergic system in the rat. *Nat New Boil*. 1973;245:150-51.
25. 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;291:145-49.
26. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, et al. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. Amer J Physiol. 1999;277:797-804.
27. Durante W, Johnson F.K., Johnson A.J. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. Clin Exp Pharmacol. Physiol. 2007;34(9):906-11.
28. Boyde J.R, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. Anal Biochem. 1980;107:424-31.
29. Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Market SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. Science, 1980, 210 (4475), 1267-69

*Матеріал надійшов до
редакції 11.07.2016*

Варіанти гена рецептора прогестерону як генетичний фактор ризику розвитку загрозового абoрту

О.С. Кривопустов¹, В.Є. Досенко²

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;

²Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: kryvopustov@gmail.com

Визначення поліморфізмів гена рецептора прогестерону rs590688 C/G та rs500760 A/G проведено з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі у вагітних жінок із загрозою абoрту (дослідна група) та у практично здорових вагітних жінок (контрольна група). За результатами генотипування розподіл алельних варіантів значно відрізнявся при дослідженні rs590688: C/C – 23,9%, C/G – 44,8%, G/G – 31,3% у пацієнтів, що мали загрозу абoрту та C/C – 27,2%, C/G – 58,7%, G/G – 14,1% у контрольній групі ($P < 0,05$ за χ^2). Розподіл алельних варіантів поліморфізму rs500760 статистично не відрізнявся, в дослідній групі A/A – 53,7%, A/G – 40,3%, G/G – 6%, в контрольній групі A/A – 52,2%, A/G – 44,6%, G/G – 3,3% ($P > 0,05$). Частота мінорної гомозиготи G/G поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688 у пацієнток з загрозою абoрту в нашому дослідженні майже в 10 разів вища порівняно з жінками тайванської популяції, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності. Отримані результати свідчать про значні етнічні відмінності в частоті різних варіантів поліморфізмів гена рецептора прогестерону та наявність клінічного значення поліморфізму rs590688.

Ключові слова: ген прогестеронового рецептора; поліморфізм гена; загрозовий абoрт.

ВСТУП

Загрозовий абoрт є частим ускладненням, яке виникає у 16-25% усіх вагітностей [1]. Серед материнських негативних наслідків загрозового абoрту виділяють такі, як виникнення передлежання плаценти, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, допологова кровотеча невідомого генезу, передчасний розрив плідних оболонок, кровотеча у ранньому післяпологовому періоді та ручне відділення плаценти. Серед негативних наслідків загрозового абoрту для плода виділяють високий ризик передчасних пологів, затримку внутрішньоутробного росту плода, низьку масу при народженні, вищу неонатальну смертність, вищу неонатальну захворюваність та частішу наявність вроджених вад розвитку [2]. Так, серед провідних чинників розвитку абoрту розглядають, насамперед, інфекційні, анатомічні, гормональні та генетичні [3]. Зокрема, прогестерон

відіграє вкрай важливу роль у забезпеченні репродуктивної функції жінки, регуляції менструального циклу, імплантації зиготи, розвитку матки та забезпеченні маткового “спокою” протягом вагітності, попередженні передчасного дозрівання шийки матки [3, 4]. Його нестача під час вагітності може спричинити загрозу переривання вагітності, самовільний викидень, загрозу передчасних пологів, передчасні пологи [4].

Провідне місце в лікуванні зазначеної патології посідають препарати натурального прогестерону [5]. Їх використання нормалізує тонус матки, зменшує частоту передчасного вкорочення шийки матки, сприяє покращенню циркуляції крові в нервовій системі плода [4-7]. Дія прогестерону реалізується через активацію прогестеронових рецепторів. Від їх кількості та афінності залежить ефективність цих препаратів [8]. Зазначені рецептори кодується геном рецептора прогестерону (PGR), котрий знаходиться на хромосомі 11q22-23 і

складається з 8 екзонів [9]. У тканинах амніона і хоріона виявлено 17-ядерний PGR [10]. Рецепторна відповідь на прогестерон може залежати від одонуклеотидного поліморфізму (SNP) PGR [11, 12]. Станом на 2016 р. описано 5732 поліморфізмів PGR, проте за останні роки було проведено лише декілька досліджень, які вказують на роль SNPs PGR у формуванні схильності до виникнення звичного невиношування вагітності [11-16]. SNPs PGR може спричиняти порушення експресії PGR, тим самим змінюючи перебіг біохімічних процесів в організмі жінки і сприяючи розвитку патологічного процесу та/або впливати на перебіг останнього [12].

У 2011 р. Mei-Tsz Su показав, що гаплотип C/C, який формується при аналізі SNP rs590688 (C/G) та rs11224592 (T/C) асоціювався зі зменшенням ризику виникнення звичного невиношування вагітності ($P=0,004$). Загалом, це дослідження показало наявність зв'язку між SNPs PGR та звичним невиношуванням вагітності [15]. У цьому ж році інші дослідники показали, що у когорті латиноамериканців та європеоїдів rs500760 може впливати на ефективність прогестеронової терапії для попередження передчасних пологів у терміні гестації до 37 тиж [11]. Саме тому ці поліморфізми були обрані як найбільш перспективні в аспекті вивчення асоціації з розвитком загрозливого аборт.

Метою нашої роботи було встановити асоціацію SNPs PGR rs590688 (C/G) та rs500760 (A/G) з розвитком загрозливого аборт.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження був букальний епітелій 67 пацієнток з діагнозом загрозливий аборт (дослідна група). Цей діагноз встановлювали за клінічними ознаками, а саме: при наявності болю внизу живота та/або кровотечі зі статевих шляхів різного ступеня вираженості за умови відсутності структурних змін шийки матки та серцебиття у плода за даними УЗД. До контрольної групи увійшли

93 практично здорових жінок, що народили як мінімум одну здорову дитину та не мали акушерських ускладнень.

Визначення SNPs PGR проводили в два етапи. Першим було виділення ДНК біологічного матеріалу з букального епітелію. Цей матеріал збирали за допомогою зонда «Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd» (Китай). Для отримання ДНК з будь-якого біологічного матеріалу застосовували набір реагентів NeoPrep⁵⁰ DNA «НЕОГЕН» (Україна). Метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагували із сорбенту та переносили у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отриману ДНК безпосередньо використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

SNP PGR rs590688 (C/G) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_997600_10 та 7500 Fast Real-time PCR System «Applied Biosystems, Foster City» (США). SNP PGR rs500760 (A/G) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_997496_10 та 7500 Fast Real-time PCR System «Applied Biosystems, Foster City» (США). Програма ампліфікації складалася з 50 циклів (денатурація - 92°C, 15 с, гібридизація та елонгація - 60°C, 1 хв), після чого проводили аналіз дискримінації алелей.

Статистичну обробку результатів застосовували у спеціалізованому пакеті SPSS версії 20.0. Відповідність розподілу генотипів закону Харді-Вайнберга була перевірена за допомогою тесту χ^2 із 1-м ступенем свободи, без використання корекції Йетса за допомогою онлайн-калькулятора (<https://thethingshinyapps.io/SNPcalc/>). Розподіл генотипів у контрольній групі відповідав закону Харді – Вайнберга. Для встановлення можливої

асоціації між досліджуваними SNPs PGR та ризиком розвитку загрозового абoрту був застосований метод χ^2 -критерію за Пірсоном. Статистично значущими результатами вважали при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування пацієнтів з загрозою абoрту показало, що розподіл генотипів у цих групах за поліморфізмом PGR rs590688 суттєво відрізняється: C/C – 23,9%, C/G – 44,8%, G/G – 31,3% у пацієнтів, що мали загрозу абoрту та C/C – 27,2%, C/G – 58,7%, G/G – 14,1% у контрольній групі. Використавши тест χ^2 із 2-ма ступенями свободи нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в обох групах ($P=0,03$, $\chi^2=6,956$). Аналіз розподілу алелів також відрізняє дослідну групу – частота мінорного алеля становила 0,52 (в контрольній групі – 0,43), проте різниця не є статистично достовірною (рис. 1).

Генотипування за поліморфізмом rs500760 показало, що статистично значущих відмінностей у розподілі генотипів серед хворих та практично здорових жінок виявлено не було. В дослідній групі A/A – 53,7%, A/G – 40,3%, G/G – 6%, в контрольній групі A/A – 52,2%, A/G – 44,6%, G/G – 3,3% ($P>0,05$, $\chi^2=0,917$). Аналіз розподілу алелів майже не відрізняє дослідну групу – частота мінорного алеля становила 0,261 ум.од., в контрольній групі

– 0,255 ум.од.; $P>0,05$ (рис. 2).

Це свідчить про те, що серед двох досліджуваних SNP PGR rs590688 має клінічне значення та асоціюється із розвитком загрозового абoрту.

На наступному етапі ми вирішили порівняти отримані результати з проведеними генотипуваннями в інших країнах (табл. 1, 2). Генотип G/G поліморфізму PGR rs590688, який асоціюється зі збільшенням частоти виникнення загрози абoрту в нашому дослідженні, зустрічається в 5,1 раза частіше серед жінок контрольної групи порівнянно з практично здоровими жінками тайванської популяції та у 9,5 раза частіше серед жінок дослідної групи порівнянно з тайванською популяцією, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності [15]. Різниця в розподілі частоти генотипу G/G SNP PGR rs500760 порівнянно з іншими популяціями майже відсутня.

ВИСНОВКИ

Розподіл генотипів при аналізі SNP PGR rs590688 у пацієток з загрозою абoрту та у практично здорових жінок суттєво відрізняється ($P<0,05$ за χ^2), що свідчить про асоціацію SNP з розвитком загрозового абoрту.

Розподіл генотипів SNP PGR rs500760 у пацієток з загрозою абoрту та у практично здорових жінок не відрізняється.

Розподіл алельних варіантів досліджуваних генів має значні популяційні відмінності:

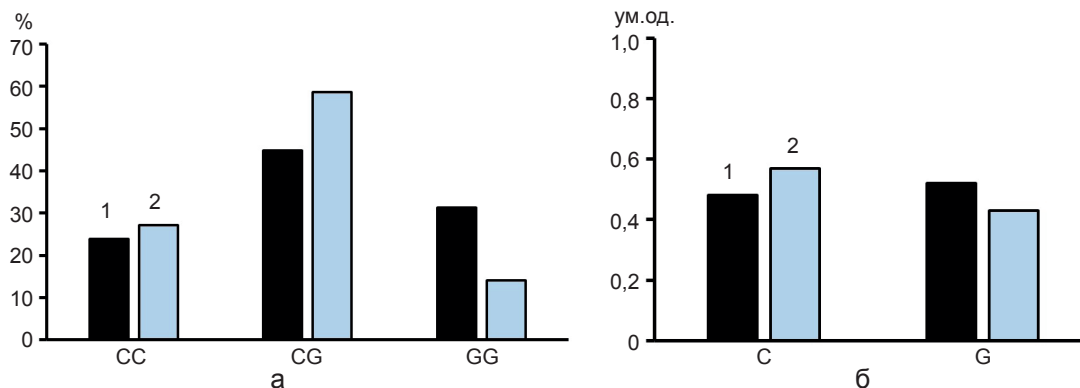


Рис. 1. Розподіл генотипів при поліморфізмі гена рецептора прогестерону rs590688 та його алелів (1 – дослідна група, 2 – контрольна група)

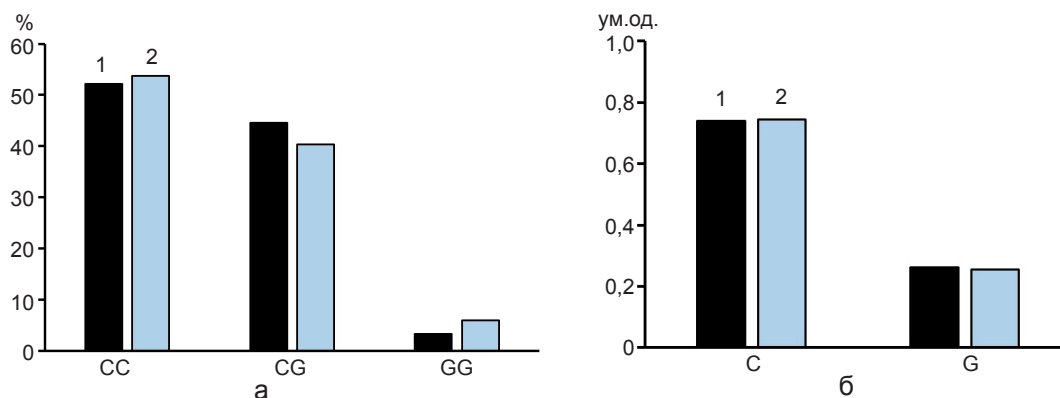


Рис. 2. Розподіл генотипів при поліморфізмі гена рецептора прогестерону rs500760 та його алелів (1 – дослідна група, 2 – контрольна група)

Таблиця 1. Розподіл різних генотипів поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688 у різних популяціях

Генотип	The International HapMap Project Європейська популяція (усі, n=120)	The International HapMap Project Азіати (усі, n=90)	Дослідження Su M. Тайванська Популяція (здорові жінки, n=179)	Дослідження Su M. Тайванська Популяція (хворі жінки, n=121)	Власне дослідження Українська популяція (здорові жінки, n=92)	Власне дослідження Українська популяція (хворі жінки, n=67)
C/C	n=30 (25%)	n=50 (55,6%)	n=123 (68,7%)	n=75 (62%)	n=25 (27,2%)	n=16 (23,9%)
C/G	n=58 (48,3%)	n=34 (37,8%)	n=45 (25,2%)	n=42 (34,7%)	n=54 (58,7%)	n=30 (44,8%)
G/G	n=32 (26,7%)	n=6 (6,7%)	n=11 (6,1%)	n=4 (3,3%)	n=13 (14,1%)	n=21 (31,3%)

Таблиця 2. Розподіл різних генотипів поліморфізму гена рецептора прогестерону rs500760 у різних популяціях

Генотип	The International HapMap Project Європейська популяція (усі, n=226)	The International HapMap Project Азіати (усі, n=86)	Власне дослідження Українська популяція (здорові жінки, n=92)	Власне дослідження Українська популяція (хворі жінки, n=67)
A/A	n=129 (57%)	n=46 (53%)	n=48 (52,2%)	n=36 (53,7%)
A/G	n=81 (36%)	n=34 (40%)	n=41 (44,6%)	n=27 (40,3%)
G/G	n=16 (7%)	n=6 (7%)	n=3 (3,3%)	n=4 (6%)

частота мінорної гомозиготи G/G SNP PGR rs590688 у пацієток з загрозою абортів у нашому дослідженні майже в 10 разів вище порівнянно з жінками тайванської популяції, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності.

Визначення мінорної гомозиготи G/G поліморфізму SNP PGR rs590688 може знайти застосування у проведенні скринінгових досліджень для формування груп підвищеного ризику розвитку загрозового абортів у жінок нашої країни.

А.С. Кривопустов¹, В.Е. Досенко²

ВАРИАНТЫ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ПРОГЕСТЕРОНА КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ УГРОЖАЮЩЕГО АБОРТА

Определение полиморфизмов гена рецептора прогестерона rs590688 C/G и rs500760 A/G проведено с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени у беременных женщин с угрозой самопроизвольного аборта (основная группа) и у практически здоровых беременных (контрольная группа). По результатам генотипирования распределение аллельных вариантов значительно отличалось при исследовании rs590688: C/C - 23,9%,

C/G - 44,8%, G/G - 31,3% у пацієнтів имевших угрозу абортa и C/C - 27,2%, C/G - 58,7%, G/G - 14,1% у пацієнтів контрольної групи ($P < 0,05$ за χ^2). Розподілення алельних варіантів поліморфізму rs500760 статистично не відличалося, в основній групі A/A - 53,7%, A/G - 40,3%, G/G - 6%, в контрольній групі A/A - 52,2%, A/G - 44,6%, G/G - 3,3% ($P > 0,05$ за χ^2). Частота мінорної гомозиготи G/G поліморфізму гена рецептора прогестерона rs590688 у пацієнток з угрозою абортa в нашому дослідженні практично в 10 раз вище по порівнянню з жінками тайваньської популяції, які мали ідіопатичне переривання вагітності. Отримані результати свідчать про значущі етнічні відличия в частоті варіантів гена рецептора прогестерона і про наявність клінічного значення у поліморфізму rs590688.

Ключові слова: ген прогестеронового рецептора; поліморфізм; загрожуючий аборт.

O.S. Kryvopustov¹, V.E. Dosenko²

PROGESTERONE RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AS GENETIC RISK FACTOR OF THREATENED ABORTION

Determination of the progesterone receptor gene polymorphisms rs590688 C/G and rs500760 A/G was provided using PCR method. To investigate the genetical precursors of threatened abortion the next groups were included: 67 patients with threatened abortion and 93 healthy persons. These allelic variants have the significantly different at rs590688 study: C/C - 23,9%, C/G - 44,8%, G/G - 31,3%, and C/C - 27,2%, C/G - 58,7%, G/G - 14,1% in the control group ($P < 0,05$ by χ^2 -test). The allelic variants of the rs500760 polymorphism did not differ statistically in the study group A/A 53,7%, A/G - 40,3%, G/G - 6% in the control group A/A - 52,2%, A/G - 44,6%, G/G - 3,3% ($P > 0,05$ by χ^2 -test). Distribution of minor homozygote G/G polymorphism rs590688 progesterone receptor gene in patients with threatened abortion in our study almost in 10 times higher in comparing with women of Taiwanese Han population, who had idiopathic recurrent pregnancy loss. The obtained data indicate significant ethnic differences in PGR and show polymorphism rs590688 clinical significance.

Keywords: progesterone receptor gene; polymorphism; threatening abortion.

¹ O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine;

² O.O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

REFERENCES

- Farrell T, Owen P. The significance of extrachorionic membrane separation in threatened miscarriage. Br J

- Obstet Gynaecol 1996;103:926-8.
- Saraswat L, Bhattacharya S, Maheshwari A, Bhattacharya S. Maternal and perinatal outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester: a systematic review. BJOG. 2010;117(3):245-57.
- Manukhin I. Gynecological endocrinology. Moscow. GEOTAR Media. 2013. [Russian].
- Graham J, Clarke C. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocr Rev. 1997;18(4):502-19.
- O'Brien J. Progestogen safety: implications for meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2012;40(4):486-7.
- Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone. Mid East Fertil Soc J. 2007;12(3):197-201.
- Barda G, Ben-Haroush A, Barkat J, Malinger G, Luria O, Golan A, Bar J. Effect of vaginal progesterone, administered to prevent preterm birth, on impedance to blood flow in fetal and uterine circulation. Ultrasound Obstet Gynecol. 2010;36(6):743-8.
- Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. J Mol Endocrinol. 2007;38(1-2):331-50.
- Guoyang Luo, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Schatz F, Kuczynski E, Funai EF, Dulay AT, Huang ST, Buhimschi CS, Buhimschi IA, Fortunato SJ, Menon R, Lockwood CJ, Norwitz ER. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. Reprod Sci. 2008;15(2):147-55.
- Mills AA, Yonish B, Feng L, Schomberg DW, Heine RP, Murtha AP. Characterization of progesterone receptor isoform expression in fetal membranes. Am J Obstet Gynecol. 2006;195(4):998-1003.
- Manuck TA, Lai Y, Meis PJ, Dombrowski MP, Sibai B, Spong CY, Rouse DJ, Durmwald CP, Caritis SN, Wapner RJ, Mercer BM, Ramin SM. Progesterone receptor polymorphisms and clinical response to 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. Am J Obstet Gynecol. 2011;205(2):135.
- Kryvopustov O, Dosenko V. Single nucleotide polymorphisms in human progesterone receptor gene and its value in miscarriage or preterm delivery. Fiziol Zh. 2015;61(2):111-19.
- Su MT, Lin SH, Chen YC. Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2011 Dec;96(6):1435-44.
- Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;113(1):67-72.
- Su MT, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. J Assist Reprod Genet. 2011;28(3):239-43.
- Li Wang, Zeng Chan Wang, Cui Xie, Xiao Feng Liu, Mao Sheng Yang. Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. Reprod Sci. 2010;17(6):578-84.

Матеріал надійшов
до редакції 02.06.2016

Порушення скоротливої активності кардіоміоцитів за дії доксорубіцину

О.О. Лінник¹, Т.І. Древицька¹, К.В. Тарасова², Г.В. Портніченко¹, В.Є. Досенко¹, І.М. Маньковська¹

¹Інститут фізіології О.О. Богомольця НАН України, Київ; ²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: newmulo@gmail.com

Досліджено порушення скоротливої активності неонатальних кардіоміоцитів щурів під впливом антрациклінових антибіотиків, зокрема, доксорубіцину, та можливість антиоксидантної корекції цих порушень за допомогою куркуміну. Крім того, досліджено роль змін рівня мітохондріального мембранного потенціалу в скоротливій активності кардіоміоцитів. Встановлено, що доксорубіцин викликає значні зміни всіх показників скорочення порівняно з контролем: збільшення частоти спонтанних скорочень, порушення їх ритмічності, зниження амплітуди та відсотка вкорочення, підвищення максимальної швидкості скорочення і розслаблення. Сумісна інкубація з доксорубіцином і куркуміном викликала значне зниження частоти спонтанних скорочень (в 3 рази), відновлення їх ритмічності, підвищення амплітуди (в 2 рази) та відсотка вкорочення клітини від попереднього значення, збільшення максимальної швидкості скорочення в 1,8 рази і підвищення швидкості розслаблення на 16 %, без значних змін тривалості цих процесів порівняно з моноінкубацією з доксорубіцином. При дослідженні мітохондріального мембранного потенціалу неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним методом було виявлено значне зниження інтенсивності забарвлення мітохондрій під впливом доксорубіцину – в 1,7 рази порівняно з контролем. А сумісна інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій (в 2,2 рази порівняно із застосуванням лише доксорубіцину).

Ключові слова: оксидативний стрес; кардіоміоцити; мітохондріальний потенціал; доксорубіцин; куркумін.

ВСТУП

Мітохондрії – це хондріосоми, які постійно наявні в клітинах тварин і рослин, забезпечуючи клітинне дихання, у результаті чого енергія вивільнюється або акумулюється в легко використовуваній формі. За несприятливих умов, наприклад, при оксидативному стресі, електронно-мікроскопічне дослідження мітохондрій кардіоміоцитів щурів виявляє ушкодження, які полягають в набуханні, вакуолізації і деградації [1]. Щодо ядра, то структурні порушення проявляються гіперхроматозом і руйнуванням. При ушкодженні мембран лізосом відбувається вихід активних протеолітичних лізосомальних ферментів у цитозоль; їх руйнівна дія посилюється на фоні

дефіциту макроергів. Також спостерігаються порушення функціонування цито- і ендоплазматичних мембран, які можуть проявлятися у вигляді збільшення їх проникності, зниження потенціалу спокою клітинної мембрани, зміни функціонування транспортних систем, зниження міри спряження процесу окисного фосфорилювання [1].

Відомо, що доксорубіцин здатний викликати оксидативний стрес у клітинах і безпосередньо ушкоджувати цитоплазматичну мембрану [2]. Його особливістю є те, що, крім характерних для переважної більшості цитостатиків побічних явищ, даний препарат має значно виразнішу токсичну дію саме на серце [3]. Він спричиняє деструктивно-дистрофічні

© О.О. Лінник, Т.І. Древицька, К.В. Тарасова, Г.В. Портніченко, В.Є. Досенко, І.М. Маньковська

зміни в міокарді тварин: набрякання окремих м'язових волокон, дегенерацію міофібрил, гомогенізацію, вакуолізацію і резорбцію саркоплазми, порушення структури ядер [4], що, в свою чергу, негативно впливає на скорочувальну здатність кардіоміоцитів та призводить до дисфункції міокарда і розвитку серцевої недостатності. Останніми роками інтенсивно вивчається розвиток оксидативного стресу як найімовірнішого механізму кардіотоксичної дії антрациклінів. Вільні радикали, що утворюються при застосуванні цих цитостатиків, негативно впливають на серцевий м'яз і особливо на функцію та структуру мембран кардіоміоцитів [5]. Оксидативне пошкодження мітохондрій при розвитку антрациклінових кардіоміопатій було підтверджено нами раніше [6]. Оскільки біоенергетичні процеси в міокарді, оптимальні для функціонування серцевого м'яза, забезпечуються виключно аденозинтрифосфатом (АТФ), який синтезується в мітохондріях у результаті окисного фосфорилування за наявності молекулярного кисню [7], то за умов оксидативного стресу, зокрема, в результаті впливу доксорубіцину, пригнічується синтез АТФ у мітохондріях, і в клітинах відбувається швидке зниження вмісту креатинфосфату, а згодом і АТФ [8]. Крім того, Капелько та співавт. [9] встановили невідповідність між вмістом Ca^{2+} під час систоли і значенням систолічного тиску в серцях щурів, які одержували доксорубіцин. Це свідчить про пригнічення антибіотиком інотропної активності міофібрил внаслідок зниження енергетичних запасів міокарда. Також з огляду на спорідненість доксорубіцину з кардіоліпіном та властивістю мітохондрій депонувати велику кількість Ca^{2+} , можна припустити, що на дію цього препарату органели клітини відповідають підвищеним накопиченням Ca^{2+} . При цьому, виявлено, що метаболічна активність та сарколемальна Ca^{2+} -АТФаза (SERCA) пригнічується [10]. Всі ці порушення можуть призводити до захворювань серцево-судинної системи і тому пошук механізмів можливої

кардіопротекції є надзвичайно актуальним.

В уже цитованій праці [6] було показано, що куркумін має високу антиоксидантну активність і запобігає порушенням про-антиоксидантного балансу в кардіоміоцитах при дії доксорубіцину. В організмі людини ця речовина впливає на велику кількість транскрипційних факторів, асоційованих із запаленням [11], цитокінів, ензимів тощо, регулюючи різноманітні фізіологічні та патологічні процеси. Куркумін здатний блокувати активацію та транслокацію із цитоплазми в ядро фактора NF- κ B за рахунок перешкоджання деградації його інгібітора [12,13], має протективний ефект при пошкодженні міокарда та допомагає збереженню функцій серця [12].

Метою нашої роботи було дослідження механізмів зміни рівня мітохондріального мембранного потенціалу та виникнення порушень скоротливої активності неонатальних кардіоміоцитів під впливом доксорубіцину, можливість їх корекції куркуміном.

МЕТОДИКА

Досліджували скорочувальну функцію неонатальних кардіоміоцитів, виділених з 30 щурів лінії Вістар. Виділення і культивування клітин здійснювали відповідно до модифікованої методики [14], досліди проводили після 24 год інкубації. Частоту спонтанних скорочень кардіоміоцитів визначали й оцінювали за методикою Webster та співавт. [15]: кількість скорочень визначали візуально за 180 с у поодинокі розташованих клітинах на 3-тю добу культивування. Скорочувальну функцію горизонтально розташованих кардіоміоцитів реєстрували та аналізували за допомогою системи ION-WIZARD (IonOptix), що сканує відхилення лінії їх краю при скороченні [16].

Для дослідження мітохондріального мембранного потенціалу використовували метод флуоресцентного фарбування [17] з барвником Mitotracker Deep Red FM ("Sigma Aldrich", USA), котрий проникає через плазм-

матичну мембрану мітохондрій, окиснюючись та акумулюючись лише в мітохондріях з високим потенціалом. Барвник розводили в етанолі (в концентрації 100 нмоль/л) та додавали біс-бензimid (Hoechst 33342) для зафарбовування ядер клітин. Після додавання в культуру неонатальних кардіоміоцитів доксорубіцину, куркуміну чи обох препаратів, клітини інкубували з барвником протягом 15 хв, фіксували препарат 2 %-м формальдегідом, після чого підраховували яскраво зафарбовані мітохондрії за допомогою мікроскопа NikonEclipse E200 (на довжині хвилі збудження 665-644 нм) та програми Adobe Photoshop.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням електронних таблиць «Microsoft® Excel 2013», програми Origin, а також за допомогою PropZTest. Для розрахування похибки застосовували апостеріорний тест (post hoc), а саме – корекцію Bonferroni. Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) визначали за критерієм t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що доксорубіцин викликає значні зміни всіх показників скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів порівняно з контролем. А саме: збільшення частоти спонтанних скорочень в 2 рази, порушення їх ритмічності (коливання від $0,98 \pm 0,25$ до $3,32 \pm 0,8$ с), зниження амплітуди ($0,98 \pm 0,1$ мкм) та вкорочення (зменшення до $4,07 \pm 0,47$ %), підвищення максимальної швидкості скорочення і розслаблення (на 20,5 та 19,5 % відповідно) без значних змін тривалості цих процесів (рис. 1).

Інкубація з куркуміном викликала зниження частоти спонтанних скорочень на 11 %, порушення їх ритмічності (коливання від $1,18 \pm 0,09$ до $2,9 \pm 0,14$ с), зниження амплітуди на 15 %, а вкорочення на $4,3 \pm 0,18$ %, зменшення максимальної швидкості скорочення і розслаблення (на 4 та 28 %, відповідно) без значних змін тривалості цих процесів порівняно з контролем (рис. 1).

Сумісна інкубація з доксорубіцином і куркуміном викликала значне зниження частоти спонтанних скорочень (в 3 рази), відновлення їх ритмічності, підвищення амплітуди в 2 рази та вкорочення ($8,15 \pm 0,37$ %), збільшення максимальної швидкості скорочення в 1,8 рази і підвищення швидкості розслаблення на 16 %, без значних змін тривалості цих процесів порівняно з моноінкубацією з доксорубіцином (рис. 1).

Зниження амплітуди скорочень кардіоміоцитів та втрата ритмічності під впливом доксорубіцину в цих умовах може пояснюватися порушенням нормального перерозподілу Ca^{2+} між депо і міоплазмою. Так, згідно з літературними даними, доксорубіцин знижує кількість SERCA та концентрацію Ca^{2+} в саркоплазматичному ретикулумі (СПР) [18], підвищує утворення активних форм кисню, що можуть сприяти активації Ca^{2+} /кальмодулінзалежної кінрази II (CaMKII) і підвищувати витік Ca^{2+} з СПР, знижуючи кальцієву керованість кардіоміоцитів [19]. Пригнічення скоротливої функції останніх може пояснюватись також і тим, що у неонатальних кардіоміоцитів вже через 1 год після дії доксорубіцину втричі підвищується активність кальпаїну, який стимулює деградацію титину [20], протеоліз еластичної ділянки якого призводить до порушення діастолічної та систолічної функції клітин. Інкубація клітин з куркуміном окремо також погіршувала функціональний стан неонатальних кардіоміоцитів порівняно з контролем, що може пояснюватись проапоптотичними властивостями куркуміну [21]. Спільне застосування препаратів значно покращувало скорочувальну активність клітин, що пов'язано зі зменшенням проявів оксидативного стресу в кардіоміоцитах. А саме зменшувало частоту спонтанних скорочень (наближало до контрольних значень), відновлювало їх ритмічність, амплітуду піка та відсотка вкорочення. Ці явища можна пояснити тим, що куркумін має протективний ефект лише при пошкодженнях міокарда та допомагає

збереженню функцій серця [13], зменшуючи явища оксидативного стресу й токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його антиоксидантних властивостей [22].

При дослідженні мітохондріального мембранного потенціалу неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним методом (рис.2) було виявлено значне зниження інтенсивності забарвлення мітохондрій під впливом доксорубіцину – в 1,7 раза порівняно з контролем ($P<0,05$), що цілком підтверджує попередні дані про його пошкоджувальний вплив на мітохондріальний апарат. Також в нашій попередній праці відмічалось зменшення кількості живих клітин [23]. Крім того, є літературні дані, що найбільш чутливою до ушкоджувальної дії цитостатиків є внутрішня мембрана мітохондрій. Припускають, що причиною такої вибіркової дії антрациклінів є їх спорідненість з кардіоліпіном, багатим на поліненасичені жирні кислоти, через що він

найбільше піддається впливу інтенсифікації вільнорадикальних реакцій. Утворення комплексу кардіоліпін-доксорубіцин супроводжується такими конформаційними змінами фосфоліпиду, які порушують його взаємодію з сусідніми молекулами. Безпосереднім наслідком цього може бути ушкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до різкого збільшення її проникності до відновленого нікотинаміддинуклеотиду (НАДН) та іонів кальцію, а також збільшення швидкості поглинання кисню. Цей процес супроводжується інактивацією ключових ферментів дихального ланцюга і порушенням окисно-відновних процесів у кардіоміоцитах [24]. Антрацикліни можуть пригнічувати креатинактивоване дихання мітохондрій серця руйнуванням зв'язку комплексу кардіоліпін-креатинкіназа або перешкоджаючи зв'язуванню креатинкінази з внутрішньою мембраною цих органел. Втрата цього фер-

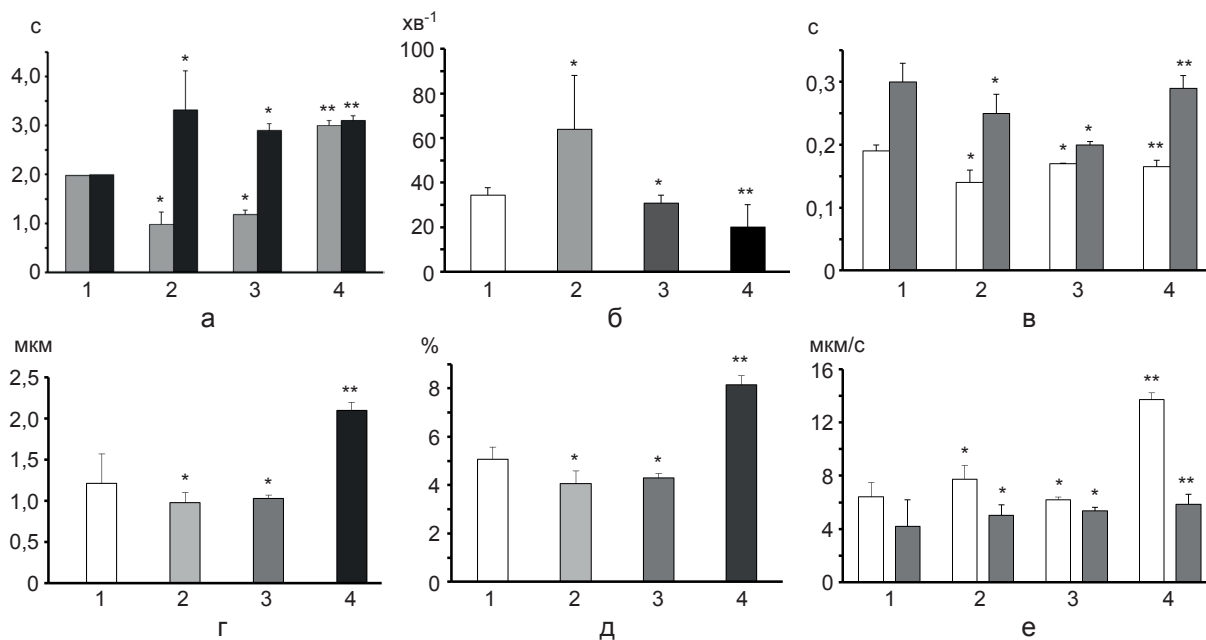


Рис. 1. Зміна показників скоротливої активності неонатальних кардіоміоцитів шурів при використанні доксорубіцину та куркуміну: а-ритмічності скорочень; б-частоти спонтанних скорочень; в-тривалості скорочення і розслаблення; г-амплітуди піка; д-довжини клітин; е-максимальної швидкості скорочення й розслаблення; 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль); 3- з куркуміном (20 мкмоль), 4- при їх спільному застосуванні в тих самих дозах. * $P<0,05$ порівняно з контролем, ** $P<0,05$ порівняно з дією доксорубіцину

менту призводить до порушення зв'язку між синтезом АТФ у мітохондріях і утворенням фосфокреатину [20].

Після інкубації клітин з куркуміном мітохондріальний мембранний потенціал зріс на 8 % порівняно з контролем. При цьому кількість живих клітин не збільшилася [23], що може пояснюватись активацією модулятора апоптозу p53, який, в свою чергу, активує проапоптотичний мультидомен BCL-2 й членів сім'ї Bax, Bim, Bak і пригнічує Bcl-2 і Bcl-xL. Втрата рівноваги між про- і антиапоптотичними BCL-2-білками викликає потік кальцію в мітохондрії і зниження проникності зовнішньої мітохондріальної мембрани, що дає змогу цитохрому C проникати в цитоплазму, призводячи до активації каскаду каспаз, формування апоптосом та викликаючи апоптоз [25].

Сумісна інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій (в 2,2 рази порівняно із застосуванням лише доксорубіцину), а також збільшувала кількість живих клітин [23]. Отримані результати свідчать про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів та підвищувати або підтриму-

вати вихідне значення мітохондріального потенціалу за умов оксидативного пошкодження.

Можна зробити висновок, що куркумін є потенційним кардіопротектором, в першу чергу, за рахунок своїх антиоксидантних властивостей та здатності підтримувати мітохондріальний потенціал, збільшуючи синтез АТФ у мітохондріях і утворення фосфокреатину. По-друге, куркумін оптимізує скорочувальну здатність кардіоміоцитів, покращуючи функціональний стан міокарда, і знижує ризик виникнення кардіоміопатій.

ВИСНОВКИ

1. Доксорубіцин викликає збільшення частоти спонтанних скорочень кардіоміоцитів в 2 рази, порушення їх ритмічності, зниження амплітуди та відсотка вкорочення, підвищення максимальної швидкості скорочення і розслаблення, без значних змін тривалості цих процесів.

2. Інкубація з куркуміном викликала зниження частоти спонтанних скорочень на 11 %, порушення їх ритмічності, зниження амплітуди та відсотка вкорочення, зменшення максимальної швидкості скорочення і розслаблення.

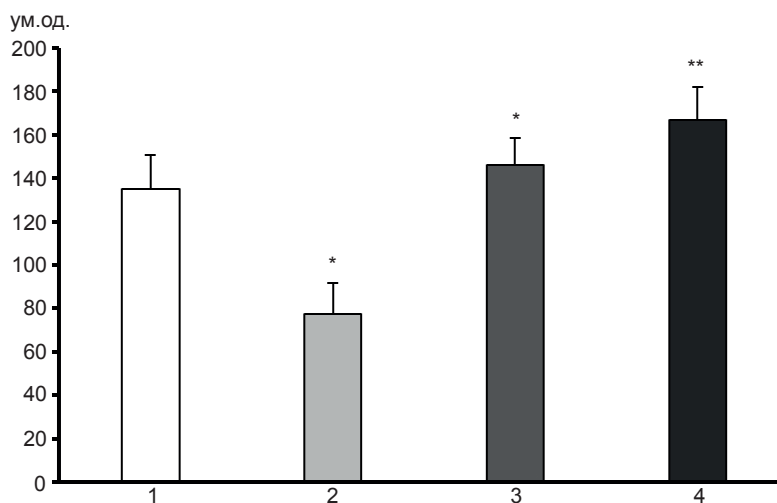


Рис. 2. Зміна інтенсивності зафарбовування мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним барвником Mitotracker: 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль); 3- з куркуміном (20 мкмоль), 4- при їх спільному застосуванні в тих самих дозах. * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно з дією доксорубіцину

3. Спільна інкубація з доксорубіцином і куркуміном викликала значне зниження частоти спонтанних скорочень (в 3 раза), відновлення їх ритмічності, підвищення амплітуди в 2 раза та відсотка вкорочення, збільшення максимальної швидкості скорочення в 1,8 раза і підвищення швидкості розслаблення на 16 %, без значних змін тривалості цих процесів порівняно з використанням доксорубіцину в монорежимі.

4. Дослідження мітохондріального мембранного потенціалу неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним методом виявило значне зниження інтенсивності забарвлення мітохондрій під впливом доксорубіцину – в 1,7 раза порівняно з контролем.

5. Після інкубації клітин з куркуміном мітохондріальний мембранний потенціал зріс на 8 % порівняно з контролем.

6. Спільна інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій (в 2,2 раза, порівняно із застосуванням лише доксорубіцину).

**О.А. Линник, Т.И. Древицкая, К.В. Тарасова,
Г.В. Портниченко, В.Е. Досенко, И.Н. Маньковская**

НАРУШЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДОКСОРУБИЦИНА

Исследованы нарушения сократительной активности неонатальных кардиомиоцитов крыс под влиянием антрациклиновых антибиотиков, в частности, доксорубицина, и возможность антиоксидантной коррекции этих нарушений с помощью куркумина. Кроме того, исследована роль изменений уровня митохондриального потенциала в сократительной активности кардиомиоцитов. Установлено, что доксорубин вызывает значительные изменения всех параметров сокращения по сравнению с контролем: увеличение частоты спонтанных сокращений, нарушение их ритмичности, снижение амплитуды и процента укорочения, повышение максимальной скорости сокращения и расслабления без значительных изменений продолжительности этих процессов. Совместная инкубация кардиомиоцитов с доксорубицином и куркумином вызвала значительное снижение частоты спонтанных сокращений (в 3 раза), восстановление их ритмичности, повышение амплитуды (в 2 раза) и процента укорочения, увеличение максимальной скорости сокращения в 1,8 раза

и повышение скорости расслабления на 16 %, без значительных изменений продолжительности этих процессов по сравнению с моноинкубацией с доксорубицином. При исследовании митохондриального потенциала неонатальных кардиомиоцитов флуоресцентным методом было обнаружено значительное снижение интенсивности окраски митохондрий под влиянием доксорубицина - в 1,7 раз по сравнению с контролем. Совместная инкубация клеток с куркумином и доксорубицином приводила к значительному повышению интенсивности флуоресценции митохондрий (в 2,2 раза по сравнению с применением только доксорубицина).

Ключевые слова: окислительный стресс; кардиомиоциты; митохондриальный потенциал; доксорубин; куркумин.

**O. Linnik, T. Drevytska, K. Tarasova,
G. Portnichenko, V. Dosenko, I. Mankovska**

DOXORUBICIN-INDUCED DISTURBANCES OF CARDIOMYOCYTE CONTRACTILE ACTIVITY

The aim of our study was to find out the mechanisms of cardiomyocyte contractile activity disturbances under the influence of anthracycline antibiotics and curcumin correction capabilities, to clarify the role of the mitochondrial membrane potential changes in cardiomyocyte contractile activity. It was investigated disturbances of contractile activity of the rat neonatal cardiomyocytes under the influence of anthracycline antibiotics (doxorubicin), and the possibility of correcting these violations using antioxidant curcumin. In addition, there was researched the role of mitochondrial membrane potential changes in reducing contractile activity of the cardiomyocytes. We established that doxorubicin causes significant changes in all reduction parameters compared to control: increased frequency of spontaneous contractions, violation of rhythm, lower amplitude and the shortening %, increase in the maximum speed of contraction and relaxation without changes in duration of these processes. Compatible incubation with doxorubicin and curcumin caused a considerable decrease of the incidence of spontaneous emission (3 times), restored their rhythm, increasing the amplitude of 2 times and the shortening % ($8,15 \pm 0,37$), rising the maximum speed reduction to 1,8 times and the relaxation speed of 16 %, with no significant change in duration of these processes compared to monoincubation with doxorubicin. In the fluorescence study of neonatal cardiomyocytes mitochondrial potential was detected a significant reduction in mitochondria color brightness under the influence of doxorubicin - in 1,7 times compared to control. A compatible incubation of cells with curcumin and doxorubicin resulted in an elevation of mitochondria fluorescence (2,2 times compared to using of doxorubicin only).

Key words: oxidative stress; cardiomyocytes; mitochondrial potential; doxorubicin; curcumin.

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

REFERENCES

1. Rozova EV, Mankovskaya IN. Structure-functional relationships in rat myocardium under hypoxia and stress. *Biological Motility: New facts and Hypotheses*. 2014; 224–28.
2. Sakai T, Inagaki R, Taniguchi T. et al. Persistant release of noradrenaline caused by anticancer drug 4-epidoxorubicin in rat's tail artery in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1998; 356:25–30
3. Wakasuyi S. Drug-induced myocardial disease adriamycin cardiotoxicity. *Nippon Rinsho*. 2000; 58(1): 204–11.
4. Zhang J, Clark J.R, Herman E.H, Ferrans VJ. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats, different ial effects in heart, kidney and intestine and inhibition by ICR 1' 187. *J Mol Cell Cardioi*. 1996; 28:1931–43.
5. Minnoti G, Mancuso C, Frustac A et al. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *J Clin invest*. 1996; 98:650–61.
6. Linnik O, Drevytska T, Gonchar O, Chornyy S, Kovalyov O, Mankovska I. Pro-antioxidant doxorubicin caused imbalance and its correction by curcumin in the neonatal rat cardiomyocytes culture. *Fiziol Zh*. 2015; 61(5):90–8 [Ukraine].
7. Park J, Park E, Ahn BH, Kim HJ, Park JH, Koo SY, Kwak HS, Park HS, Kim DW, Song M, Yim HJ, Seo DO, Kim SH. NecroX-7 prevents oxidative stress-induced cardiomyopathy by inhibition of NADPH oxidase activity in rats. *LG Life Sciences*. 2012.
8. Mohan R, Glesson M, Greenhaff P. Biochemistry of muscles and physical training. *Olimpic Literature*. 2001; 295. [Russian]
9. Kapelko VI, Shvalev VN, Khatkevich AN et al. Contractility function and heart adrenoreactivity on the early stage of adriamycin cardiomyopathy. *Cardiology*. 1997; 37(3):56–62 [Russian].
10. Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, et al. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest*. 1993; 91:1697–705.
11. Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23:775–82.
12. Eidenschink AB, Schroter G, Muller Welhrich S. et al. Myocardial high-energy phosphate metabolism is altered after treatment with anthracycline in children. *Cardiol Young*. 2000; 10:610–17.
13. Srivastav G and Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; 14:22–7.
14. Surova O, Nagibin V, Tumanovskaya L, Dosenko V, Moibenko A. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation. *Exp Clin Cardiol*. 2009; 14(2):57–61.
15. Webster D, Patrick D. Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. *AJP Heart*. 2000; 278 (5):1653–61
16. Tarasova K, Lagodich T, Drevitska T, Frantsuzova S, Karvatsky I. Effect of pharmacological activation of ATP-sensitive potassium channels on spontaneous contractile activity of isolated rat neonatal cardiomyocytes. *Fiziol Zh*. 2014; 60(6):10–5 [Ukraine].
17. Chibeza C Agley, Cristiana P Velloso, Norman R Lazarus, Stephen DR Harridge J. An Image Analysis Method for the Precise Selection and Quantitation of Fluorescently Labeled Cellular Constituents: Application to the Measurement of Human Muscle Cells in Culture. *Histochem Cytochem*. 2012; 60(6): 428–38.
18. Jung AS, Kubo H, Wilson R, Houser SR, Margulies KB. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. *Am.J.Physiol*. 2006; 290 (5):1756–62.
19. Kandadi MR, Hua Y, Ma H, Li Q, Shu-ru Kuo, Frankel AE, Ren J. Anthrax lethal toxin suppresses murine cardiomyocyte contractile function and intracellular Ca²⁺ handling via a NADPH oxidase-dependent mechanism. *PLoS ONE*. 2010; 5(10):1–5.
20. Mishra S, Chander V, Banerjee P, Oh JG, Lifirsu E, Park WJ, Kim Do H, Bandyopadhyay A. Interaction of annexin A6 with alpha actinin in cardiomyocytes. *BMC Cell Biol*. 2011; 12(1):1–7.
21. Santosh K Sandur, Haruyo Ichikawa et al. Role of prooxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(4):568–80.
22. Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, et al. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44:73–7.
23. Linnik O, Drevytska T, Gonchar O, Chornyy S, Kovalyov O, Mankovska I. Pro-antioxidant doxorubicin caused imbalance and its correction by curcumin in the neonatal rat cardiomyocytes culture. *Fiziol Zh*. 2015; 61(5):90–8 [Ukraine].
24. Miura F, Muraoka S, Ogiso T. Adriamycin-Fe³⁺- induced mitochondrial protein damage with lipid peroxidation. *Biol Pharm Bull*. 1995; 18:514–17.
25. Shankar S, Srivastava R K. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 30-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferuloylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2007; 30:905–18.

Матеріал надійшов
до редакції 07.06.2016

Перебудова тканин скелетних м'язів, легень та серця щурів за умов гіпоксії навантаження в експерименті

К.В. Розова¹, Т.В. Болгова¹, К.Р. Тимошенко¹, Ю.Д. Вінничук², Л.М. Гуніна², В.В. Безугла²

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

²Національний університет фізичного виховання та спорту України, Київ; e-mail: erozova@ukr.net; gunina-sport@yandex.ru

Вивчали особливості змін морфо- і стереометричних характеристик ультраструктури тканин легень, серця та м'язової тканини, їх капіляризації, а також мітохондріального апарата клітин у статевозрілих щурів-самців лінії Вістар при тривалих фізичних навантаженнях. Показано, що вплив тривалого тренування з розвитком гіпоксії навантаження на структурні перебудови м'язової тканини, тканини легень та міокарда можна умовно розподілити на 2 групи: деструктивного та компенсаторно-приспосувального характеру. До змін деструктивного характеру, по-перше, належать варіації ультраструктури бар'єрів, зокрема, гіпергідратація в цілому та їх окремих шарів, що погіршує умови дифузії кисню; по-друге, спостерігаються порушення в мітохондріях (кількість пошкоджених органел зростала у легенях у 4,1 раза; в серці – у 4,5-5,5 раза, а в м'язі – у 3,5-12,2 раза залежно від субпопуляції мітохондрій), що супроводжується зниженням енергетичного потенціалу мітохондріального апарата. До змін компенсаторно-приспосувального характеру належать збільшення кількості функціонуючих капілярів (на 80% у литковому м'язі та на 60% у міокарді), що попереджає розвиток вторинної тканинної гіпоксії; посилення піноцитозу в ендотеліоцитах; активація морфогенезу мітохондрій, що супроводжувалося зростанням кількості органел у литковому м'язі в середньому на 65%, в легенях – у 4 рази, а в серці – на 60-80% залежно від мітохондріальної субпопуляції; поява юних мітохондрій та мітохондрій з помірним ступенем набухання, що сприяє зростанню енергетичної потужності мітохондріального апарата клітин.

Ключові слова: фізичне навантаження; гіпоксія навантаження; морфогенез мітохондрій; капіляри; легені; міокард; м'язова тканина.

ВСТУП

Адаптація людини до напруженої м'язової діяльності та пошук шляхів підвищення фізичної працездатності та аеробної продуктивності залишається актуальною проблемою спорту вищих досягнень. Центральними механізмами такої адаптації є підвищення та розширення можливостей функціональної системи дихання (ФСД), основним призначенням якої є забезпечення адекватної швидкості поетапної доставки кисню і виведення з організму надлишку двоокису вуглецю відповідно до метаболічного запиту організму [1]. Така адекватність забезпечується адек-

ватним співвідношенням доставки кисню та швидкості його споживання в тканинах; зниження цього співвідношення до значень, менших ніж 1,5, супроводжується розвитком вторинної тканинної гіпоксії, яка призводить до зменшення ефективності скорочувальної здатності скелетних м'язів та, як наслідок, зниження фізичної працездатності [2–4]. При збільшенні навантаження на респіраторну систему, зі значним зростанням споживання кисню, розвивається гіпоксичний стан, який виділяють в окремий тип гіпоксії – гіпоксію навантаження (ГН) [1]. Однією з основних характеристик ГН є обмежена дифузія кисню в тканинах, зокрема й у м'язовій тканині, під

© К.В. Розова, Т.В. Болгова, К.Р. Тимошенко, Ю.Д. Вінничук, Л.М. Гуніна, В.В. Безугла

час його транспорту з судин мікроциркуляторного русла до мітохондрій. Для зменшення впливу цього фактора та підвищення працездатності завдяки розширенню функціональних можливостей ФСД, необхідною (а часто й достатньою) умовою може виступати зростання капіляризації тканини, причому не тільки м'язової, а й тканин тих органів, що задіяні у адекватному киснезабезпеченні організму, та/або активація морфогенезу мітохондрій [5].

Зміни в ультраструктурі та функціонуванні мітохондріального апарата (МХА) клітин різних тканин організму людини і тварин сприяють формуванню адаптивно-приспосувальних або патологічних реакцій у відповідь на виникнення гіпоксичних станів різного генезу, включаючи й ГН. Головною патогенетичною ланкою при цьому є пошкодження мітохондрій, яке спричиняє порушення енергозабезпечення, адаптивні ж реакції супроводжуються перебудовами мітохондрій, які спрямовані на підвищення ефективності енергетичного метаболізму [3, 6, 7]. Для формування адаптивних механізмів, пов'язаних із забезпеченням оптимального енергозабезпечення, у спортивній фізіології та медицині застосовують різні тренувальні підходи, які сприяють збільшенню витривалості, у першу чергу, завдяки змінам, що відбуваються у мітохондріях та у щільності капілярної сітки, і відповідають більшій оксидативній здатності тканин [3, 8].

Отже, в літературі на сьогодні наявні дані про компенсаторно-приспосувальні та адаптивні реакції, котрі формуються в організмі людини та тварин під час напруженої м'язової діяльності і фізичному навантаженні у відповідь на розвиток ГН, більшість з яких пов'язані з морфофункціональними перебудовами в тканинах та клітинах організму, зокрема в їх МХА, а також у капілярному руслі. Проте недостатність та різноспрямованість результатів до теперішнього часу не дають змоги сформувати чітку концепцію відносно розвитку вторинної тканинної гіпоксії у

різних органах та системах при тренуваннях, що вимагає проведення досліджень, які можуть стати підґрунтям для пошуку нових ефективних шляхів підвищення аеробної працездатності та витривалості організму [9, 10].

Мета нашої роботи - вивчення особливостей структурних змін у МХА тканин легень, міокарда та скелетних м'язів, а також ступеня їх капіляризації при тривалих фізичних навантаженнях в умовах експерименту.

МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження змін, які відбуваються при тривалому фізичному навантаженні у тканинах легень, серця та у м'язовій тканині було проведено на 10 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 220-250 г (дослідна група). ГН створювали під час плавання тварин у підігрітій до 30-32°C воді; висота водяного стовпа становила 80 см, що не давало змоги тваринам стояти на задніх лапах. Тривале (3-тижневе) фізичне тренування моделювали щоденним плаванням щурів протягом 30 хв з додатковим навантаженням, яке підбирали індивідуально таким чином, щоб швидкість споживання кисню до початку тренувань становила 70-75 % від максимального споживання кисню (VO_{2max}), і визначалась як швидкість споживання кисню, після досягнення якої підвищення навантаження не було пов'язано з її подальшим зростанням ($\pm 5\%$) [11]. Контрольна група тварин складалася з 10 інтактних щурів. Обрання такої програми тренувань аеробної спрямованості дало змогу встановити як функціональні, так і структурні перебудови, що розвиваються внаслідок фізичних тренувань, а також виявити зміни адаптивної спрямованості при формуванні ГН субкомпенсованого ступеня [12, 13]. Ступінь ГН оцінювали за показниками напруження кисню (PO_2) та рН крові, а також за рівнем споживання кисню у відсотках від VO_{2max} [13], зміни PO_2 та рН крові визначали за допомогою автоматичного касетного аналізатора газів «OPTI CCA TS» (США).

Вимірювання швидкості споживання кисню проводили загальноприйнятим манометричним методом [14].

По закінченні експерименту тварин декапітували під слабким ефірним наркозом. Роботу на усіх етапах експерименту виконували відповідно до Положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986), та принципів Гельсінської Декларації (2000).

У морфологічних і морфометричних дослідженнях використовували зразки литкового м'яза, симетричних ділянок нижніх часток обох легень і верхівки серця тварин. Препарати для електронно-мікроскопічних досліджень виготовляли за загальноприйнятою методикою [15]. Фіксацію біологічного матеріалу проводили миттєво, вносячи зразки в забуферений 2,5 % розчин глутарового альдегіду; дофіксацію здійснювали за допомогою реактиву Колфілда (на основі 2 % OsO_4 , рН 7,4; «Sigma», США); зневоднення матеріалу виконували в спиртах зростаючої концентрації, абсолютному спирті та ацетоні з наступною заливкою в епон («Fluka», Швейцарія). Ультратонкі зрізи товщиною 40-60 нм контрастували 1% розчином уранілу ацетату та цитрату свинцю за методикою Рейнольдса («Sigma», США) [15]. Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопа «ПЕМ-125К» (Україна). Загальну кількість функціонуючих капілярів (ФК) визначали згідно з методикою, запропонованою Норрелер та співавт. [16] на екрані електронного мікроскопа при малому збільшенні (рис. 1).

Морфо- і стереометричні характеристики мітохондрій (загальна кількість мітохондрій; кількість структурно змінених мітохондрій; середній діаметр мітохондрій; сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини - $S_{\text{іtot}}$) визначали за допомогою комп'ютерної програми Image Tool Version 3.0 (США) на 130-150 полях для кожної серії досліджень.

Статистичний аналіз отриманих резуль-

татів проводили з використанням пакета прикладних програм Microsoft Office Excel 2003 з визначенням середнього арифметичного (М), стандартної похибки (m) та критерію t Стюдента для оцінки вірогідності змін, які вважали такими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було встановлено, що при субкомпенсованому ступені гіпоксії навантаження PO_2 артеріальної крові знижувалося до 70-75 мм рт. ст., венозної – до 20-22 мм рт. ст.; рН крові зсувався у кислий бік – до 6,86, що відповідає даним літератури [1, 13].

Аналіз змін ультраструктури литкового м'яза щурів показав, що тривале фізичне навантаження супроводжувалося збільшенням гідратації тканини, яке виражалося у набряку гематопаренхіматозного бар'єра, а саме – перикапілярного простору, утворенням вакуолей у м'язових волокнах, появі ділянок краєвого набряку клітин біля сарколеми. Водночас наявними були й ультраструктурні прояви адаптації м'язів до ФН. По-перше, практично не спостерігалося порожніх, а також спалих капілярів. Про адаптивні зміни у тканині литкового м'яза може свідчити і збільшення кількості функціонуючих капілярів на одиницю площі тканини у щурів дослідної групи

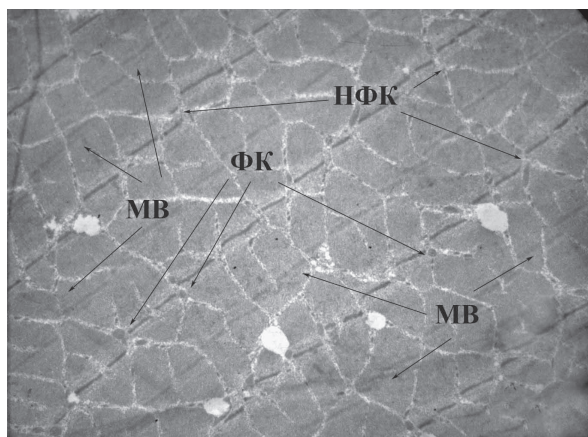


Рис. 1. Приклад електроннограми для підрахунку кількості функціонуючих капілярів (ФК): НФК – капіляри, що не функціонують, МВ – м'язові волокна. Зб. 1600

(табл. 1). Останнє дає змогу припустити наявність формування компенсаторних механізмів в системі мікроциркуляції, спрямованих на покращення метаболічних процесів, зокрема у плані постачання киснем м'язів в умовах експериментальних фізичних навантажень. В ендотеліальних клітинах капілярної вистилки виявлялась активація піноцитозу, яку прийнято розглядати як відображення інтенсифікації метаболічних процесів, що може свідчити про формування та/або включення компенсаторних реакцій у відповідь на ГН [17]. По-друге, спостерігалось достовірне збільшення загальної кількості мітохондрій субсарколемальної та інтраміофібрилярної субпопуляцій, виражене дещо більшою мірою щодо субсарколемальних органел (див. табл. 1), отже відбувалась активація морфогенезу мітохондрій у відповідь на навантаження. Відомо, що міжміофібрилярні мітохондрії переважно представлені органелами видовженої форми зі значно розвинутим комплексом крист, характеризуються спеціалізацією на синтезі креатинфосфату; субсарколемальна субпопуляція мітохондрій є комбінацією органел видовженої і кулястої форми з помірно розвинутими, але слабко орієнтованими кристами [18]. В нашому дослідженні збільшувалися

лінійні розміри мітохондрій, сягаючи у субсарколемальній субпопуляції 0,87 мкм, а у інтраміофібрилярній – перевищуючи 1 мкм; зростала і загальна площа мітохондрій в одиниці об'єму м'язової тканини (див. табл. 1). Подекуди в мітохондріях виявлялося просвітлення матриксу та помірне (до 25-30 % від середнього діаметра мітохондрій у м'язовій тканині контрольних щурів) набухання органел, що може свідчити про активацію гліколізу [3]. Такі зміни вважаються проявами формування компенсаторно-приспосувальних змін, спрямованих на забезпечення адекватного енергетичного метаболізму і попередження розвитку вторинної тканинної гіпоксії [16]. Однак вони не є беззаперечним свідченням покращення функціонування МХА, оскільки разом з цим, встановлено суттєве збільшення відсотка структурно пошкоджених органел порівняно з контролем: основні порушення полягали у наявності частково або повністю вакуолізованих мітохондрій (рис. 2, див. табл. 1). До того ж у м'язовій тканині спостерігалися ділянки гіпертрофії м'язових волокон, збільшення кількості вакуолей між ними, проте без втрати їх регулярної структури та проявів деструкції. Подібні результати були отримані при вивченні гістологічної струк-

Таблиця 1. Морфо- та стереометричні характеристики тканини литкового м'язу при тривалому фізичному навантаженні ($M \pm m$; $n=10$)

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Загальна кількість мітохондрій, од. · мкм ⁻²		
субсарколемальні	10,3±2,4	17,8±3,1*
інтраміофібрилярні	6,1±1,3	10,1±1,6*
Кількість структурно змінених мітохондрій, %		
субсарколемальні	3,8±0,7	13,2±1,4**
інтраміофібрилярні	0,9±0,2	11,0±2,1**
Середній діаметр мітохондрій, мкм		
субсарколемальні	0,35±0,05	0,62±0,06*
інтраміофібрилярні	0,58±0,08	0,76±0,07*
Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму м'язової тканини, мкм ²		
субсарколемальні	6,0±1,0	9,4±1,4*
інтраміофібрилярні	3,6±0,9	5,6±0,8*
Кількість функціонуючих капілярів, од. · мкм ⁻²	10,8±1,4	19,5±2,0*

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контрольної групи

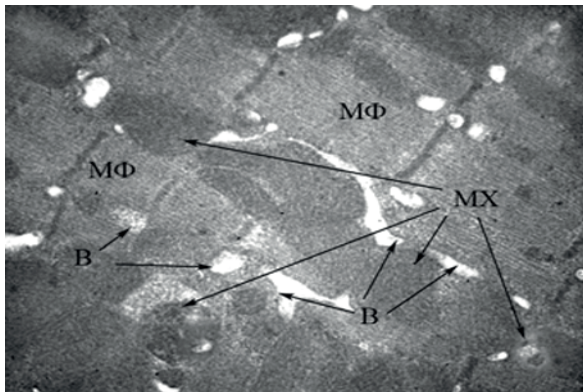


Рис. 2. Ультраструктура м'язової тканини при тривалому фізичному навантаженні: МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, В – вакуолі. Зб. 9600

тури м'язової тканини і ультраструктурної характеристики ендотеліоцитів капілярів щурів в умовах експериментальної ішемії кінцівки. На початку досліджень автори відмічали деструкцію м'язових волокон, їх фіброзне переродження, руйнування енергетично-пластичних структур ендотеліоцитів капілярів. Ознаки первинного ангиогенезу, як компенсаторної відповіді на ішемічне ураження, спостерігалось лише на 25-ту добу експерименту [19].

З боку тканини легень при 3-тижневому тренуванні спостерігалось значне погіршення ультраструктури аерогематичного бар'єра (АГБ), що виражалось у деструктивних процесах у клітинах, які входять до його складу. Визначалася фрагментація ендотелію легеневих капілярів, а також руйнування епітеліального шару, що призводило не тільки до внутрішньоальвеолярного набряку, але і до виходу в порожнину альвеол еритроцитів, тобто до розвитку геморагічного синдрому (рис. 3). Виникнення легеневої кровотечі після впливу тривалих фізичних навантажень було виявлено як в організмі людини, так і різних експериментальних тварин. Індуковані тренуваннями легеневі геморагії пов'язують з оклюзивним ремоделюванням легеневих судин. Під час тренувань зростає регіонарний тиск у легеневих капілярах, що, швидше за все, і призводить до їх розриву [20].

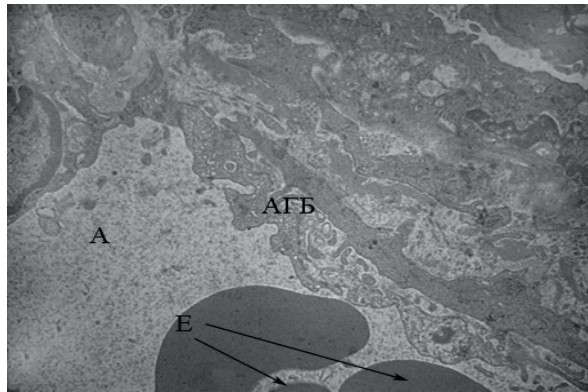


Рис. 3. Ультраструктура легень при тривалому фізичному навантаженні: А – альвеола, АГБ – аерогематичний бар'єр, Е – еритроцити. Зб. 6900

Через 3 тиж фізичних навантажень були виявлені ділянки значного проростання колагенових волокон у стромі легень. Це вказувало на розростання сполучної тканини в респіраторному відділі легень. Такі зміни призводять до погіршення умов дифузії кисню через АГБ [21]. Функція сурфактантної системи була порушеною, оскільки ламелярні тільця майже не містили резервного сурфактанта, однак, в порожнині альвеол зберігалася певна кількість активного сурфактанта, що перешкоджало їх злипанню. Оцінку капіляризації легеневої тканини не проводили у зв'язку з особливостями її будови і відсутності на теперішній час надійних морфометричних підходів для підрахунку. Морфо- та стереометрична оцінка МХА тканини легень, як і у випадку тканини скелетних м'язів, показала активізацію морфогенезу мітохондрій, що відігравало компенсаторну роль, спрямовану на послаблення проявів гіпоксії навантаження (табл. 2).

Однак при фізичному навантаженні ультраструктура мітохондрій зазнавала й суттєвих негативних змін – виявлялося руйнування зовнішньої та/або внутрішньої мітохондріальних мембран, мембран крист тощо. Спостерігалось різке (у 4,1 раза) збільшення і кількості таких структурно пошкоджених органел. Тобто можна вважати, що одним з провідних механізмів розвитку

Таблиця 2. Морфо- та стереометричні характеристики тканини легень при фізичному навантаженні ($M \pm m$; $n=10$)

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Загальна кількість мітохондрій, од./мкм ²	9,6±0,2	15,0±1,1*
Кількість структурно змінених мітохондрій, %	4,6±0,5	18,8±2,1**
Середній діаметр мітохондрій, мкм	0,39±0,01	0,73±0,08*
Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини легень, мкм ²	5,7±0,5	8,4±0,8*

вторинної тканинної гіпоксії (принаймні у системі зовнішнього дихання) при тривалому фізичному навантаженні є саме розвиток мітохондріальної дисфункції. Водночас відбувалося значне (майже дворазове) набухання мітохондрій (див. табл. 2), що можна розглядати як перший етап загибелі цих органел за некротичним типом [22].

З боку міокарда при тривалому фізичному навантаженні спостерігалось значне (на 55,9 % порівняно з контролем), збільшення кількості функціонуючих капілярів (табл. 3). Такі морфологічні зміни призводять до суттєвого збільшення інтенсивності кровообігу по мікроциркуляторному руслу та поліпшення енергозабезпечення скоротливої діяльності кардіоміоцитів. Посилення капілярного кровообігу свідчить також про зростання кількості циркулюючих еритроцитів у капілярах міокарда, росту кисневої ємності крові і, від-

повідно, зменшення тканинної гіпоксії [23].

Також виявлено суттєве зростання загальної кількості мітохондрій обох субпопуляцій, що вказує на реальну активацію морфогенезу задля підтримання адекватного енергоутворення в тканині серця при розвитку ГН (рис. 4, див. табл. 3). При цьому збільшувався і відсоток структурно змінених мітохондрій, однак на тлі загального суттєвого зростання кількості субсарколемальних та інтраміофібрилярних мітохондрій можна говорити про збільшення кількості органел з нативною ультраструктурою, здатних до синтезу макроергів. Середній діаметр мітохондрій був більшим у органел обох субпопуляцій відносно визначеного в міокарді контрольних тварин. Слід відмітити зростання $S_{i\text{ tot}}$ (див. табл. 3). Дані досліджень інших авторів, отриманих при субмаксимальному навантаженні, теж свідчать про збільшення кількості та об'є-

Таблиця 3. Морфо- та стереометричні характеристики тканини серця при фізичному навантаженні ($M \pm m$; $n=10$)

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Загальна кількість мітохондрій, од./мкм ²		
субсарколемальні	12,5±1,6	20,1±3,1*
інтраміофібрилярні	8,4±1,1	15,0±1,3*
Кількість структурно змінених мітохондрій, %		
субсарколемальні	4,1±0,6	18,3±3,5**
інтраміофібрилярні	2,7±0,4	14,6±2,1**
Середній діаметр мітохондрій, мкм		
субсарколемальні	0,50±0,04	0,69±0,03*
інтраміофібрилярні	0,76±0,07	0,98±0,05*
Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму м'язової тканини, мкм ²		
субсарколемальні	8,3±0,8	14,2±1,0*
інтраміофібрилярні	6,8±0,9	9,3±0,8*
Кількість функціонуючих капілярів у тканині, од./мкм ²	13,6±1,8	21,2±2,1*

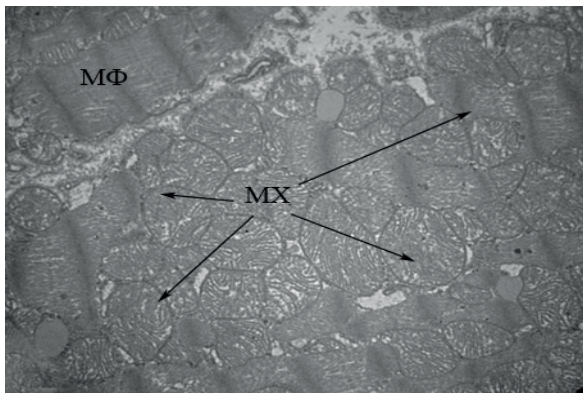


Рис. 4. Ультраструктура міокарда при тривалому фізичному навантаженні: MX – мітохондрії, MF – міофібрили. Зб. 9600

му мітохондрій у тренуваному міокарді та м'язовій тканині, що позитивно корелює з максимальним споживанням кисню та негативно – з рівнем накопичення лактату [24]. Подібні зміни $S_{i\text{tot}}$ при тривалому фізичному навантаженні спостерігалися в усіх досліджуваних тканинах, і тому така динаміка може розглядатися як формування загальної адаптивної реакції МХА клітин. Важливість цього показника визначається тим, що він відображає сумарну довжину мітохондріальних мембран, розташованих у об'ємі тканини [25]. Оскільки основна мітохондріальна функція – енергетична – зумовлюється роботою дихальних ферментів мітохондрій, які є мембранозв'язаними, то протяжність мембран цих субклітинних органел може бути побічним показником їх здатності до участі в енергетичному метаболізмі клітин. Отже, при адаптації до ГН створюються умови для активації мітохондріального мембранного комплексу I, змін функціонального спряження деяких мітохондріальних кіназ і стимуляції утворення АТФ, а також перешкоджання переходу процесів у стадію декомпенсації [26].

Отже, отримані результати свідчать, що при експериментальному тритижневому фізичному навантаженні, попри розвиток ГН, починають формуватися або вже формуються адаптивні реакції (збільшення кількості

функціонуючих капілярів; активація морфогенезу мітохондрій; поява юних та з помірним ступенем набухання мітохондрій; посилення піноцитозу в ендотеліоцитах тощо), спрямовані на попередження розвитку вторинної тканинної гіпоксії та збереження адекватного енергетичного метаболізму. Зміни, які виявлено в мітохондріальному апараті досліджуваних тканин, пов'язані, в першу чергу, з його роллю в адаптації до гіпоксії та зниженням при цьому мітохондріальної дисфункції як базового клітинно-молекулярного механізму у відповідь тканин на порушення співвідношення доставки/споживання кисню [7]. Комплекс адаптаційних перебудов у МХА клітин різних тканин організму, ймовірно, є необхідним для переходу на новий більш економічний режим енергетичного метаболізму з формуванням тканинної неспецифічної резистентності до гіпоксії, зокрема до гіпоксії навантаження.

Отримані результати розкривають деякі механізми формування адаптації до фізичних навантажень та, безумовно, потребують подальших досліджень структурних перебудов тканин організму в умовах ГН. Вивчення механізмів розвитку такого гіпоксичного стану можуть стати підґрунтям для розробки ефективних шляхів фармакологічної корекції порушень, що розвиваються, зокрема із застосуванням препаратів з мембранопротекторними властивостями, а також таких, які здатні забезпечити підтримку оптимального енергетичного забезпечення організму. Такий підхід має безпосередню практичну спрямованість і є особливо важливим для умов реального тренувального процесу спортсменів, особливо представників видів спорту з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення.

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати впливу тривалого фізичного тренування з розвитком гіпоксії навантаження на структурні перебудови м'язової тканини, тканини легень та міокар-

да у щурів можна умовно розподілити на 2 групи: деструктивного та компенсаторно-приспосувального характеру.

2. До змін деструктивного характеру належать особливості ультраструктури біологічних бар'єрів, зокрема, гіпергідратація окремих їх шарів або й бар'єрів в цілому, що погіршує умови дифузії кисню, а також деструктивні зміни в мітохондріях клітин, функціональне значення яких полягає у зниженні енергетичного потенціалу мітохондріального апарата.

3. До змін компенсаторно-приспосувального характеру належать збільшення кількості функціонуючих капілярів, що попереджає розвиток вторинної тканинної гіпоксії; посилення піноцитозу в ендотеліоцитах; активація морфогенезу мітохондрій; поява юних органел та мітохондрій з помірним ступенем набухання, що сприяє зростанню енергетичної потужності мітохондріального апарату клітин.

**K.V. Rosova¹, T.V. Bolgova¹, K.R. Tymoshenko,
Ju.D. Vinnichuk², L.M. Gunina², V.V. Bezugla²**

RESTRUCTURING OF SKELETAL MUSCLE, LUNG AND HEART TISSUES OF RATS UNDER HYPOXIA TRAINING

We studied some specific features of the changes in morpho- and stereometric characteristics of the ultrastructure of tissues of lungs, heart, and muscles, their capillarization, and the mitochondrial apparatus of cells in adult male Wistar rats under long-term physical loads. It is shown that the influence of a sustained training accompanied by the development of exercise-induced hypoxia on the structural readjustments of tissues of muscles, lungs, and myocardium can be conditionally divided into 2 groups: with destructive and compensatory-adaptive features. The changes with destructive character include, firstly, those of the ultrastructure of biological barriers such as, in particular, hyperhydration of barriers on the whole and their separate layers, which deteriorates the conditions of oxygen diffusion; second, the destructive changes in mitochondria (it increased the number of damaged lung organelles by 4.1 times, in the heart - at 4.5-5.5 times depending on subpopulations and in muscle - by 3.5-12.2 times also depending on the subpopulation of mitochondria), which are accompanied by a decrease in the energy potential of the mitochondrial apparatus, are observed. To the changes with compensatory-adaptive character, we refer an increase in the

number of functioning capillaries (by 80% in the gastrocnemius muscle and by 60% in the myocardium), which prevents the development of secondary tissue hypoxia; intensification of pinocytosis in endotheliocytes; activation of mitochondrial morphogenesis, which was accompanied by an increase of the number of organelles at gastrocnemius muscle by 65%, in the lungs - in 4 times and in heart by 60-80% depending on the mitochondrial subpopulations; and appearance of young mitochondria and mitochondria with moderate degree of swelling, which favors the growth of the energy power of the mitochondrial apparatus of cells.

Key words: physical load; hypoxia training; mitochondrial morphogenesis; functioning capillaries; lung; myocardium; muscle tissue.

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

²*Scientific Institute of the National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv*

**Е.В. Розова¹, Т.В. Болгова¹, Е.Р. Тимошенко,
Ю.Д. Винничук², Л.М. Гуніна², В.В. Безуглая²**

ПЕРЕСТРОЙКА ТКАНИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ, ЛЕГКИХ И СЕРДЦА КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ НАГРУЗКИ

Работа посвящена изучению особенностей изменений морфо- и стереометрических характеристик ультраструктуры тканей легких, сердца и мышечной ткани, их капилляризации, а также митохондриального аппарата клеток у половозрелых крыс-самцов линии Вистар при длительных физических нагрузках. Показано, что влияние длительной тренировки с развитием гипоксии нагрузки на структурные перестройки мышечной ткани, ткани легких и миокарда можно условно разделить на две группы: деструктивного и компенсаторно-приспособительного характера. К изменениям деструктивного характера, во-первых, относятся вариации ультраструктуры биологических барьеров, в частности, гипергидратация барьеров в целом и их отдельных слоев, что ухудшает условия диффузии кислорода; во-вторых, наблюдаются деструктивные изменения в митохондриях (количество поврежденных органелл возрастало в легких в 4,1 раза; в сердце - в 4,5-5,5 раза, а в мышце - в 3,5-12,2 раза в зависимости от субпопуляции митохондрий), что сопровождается снижением энергетического потенциала митохондриального аппарата. К изменениям компенсаторно-приспособительного характера принадлежат увеличение количества функционирующих капилляров (на 80% в икроножной мышце и на 60% в миокарде), что предупреждает развитие вторичной тканевой гипоксии; усиление пиноцитоза в эндотелиоцитах; активация морфогенеза митохондрий, что сопровождается увеличением количества органелл в икроножной мышце в среднем на 65%, в легких - в 4 раза, а в сердце на 60-80% в зависимости от митохондриальной субпопуляции; появление юных митохондрий и митохон-

дрий с умеренной степенью набухания, способствующее росту энергетической мощности митохондриального аппарата клеток.

Ключевые слова: физические тренировки; гипоксия загрузки; морфогенез митохондрий; капилляры; легкие; миокард; мышечная ткань.

REFERENCES

- Kolchinska AZ, Ciganova TN, Ostapenko LA. Normobaric interval hypoxic training in medicine and sport. Moscow: Medicine; 2003. [Russian].
- Mechanisms of development and compensation hemic hypoxia. Seredenko MM, editor. Kiev: Naukova Dumka; 1987. [Russian].
- Mankovska IM, Gavenauskas BL, Nosar BI, Nasarenko AI, Rosova KV, Bratus LV. Mechanisms of muscle tissue adaptation to exercise-induced hypoxia in interval hypoxic hypoxia conditions. Sport Med. 2005;1:3-11. [Ukrainian].
- Platonov BN. System of training athletes in Olympic sports. General theory and its practical application. Kiev: Olympic Literature; 2015. [Russian].
- Calbet J, Losa-Reyna J, Torres-Peralta R, Rasmussen P, Ponce-González J, Sheel A, et al. Limitations to oxygen transport and utilization during sprint exercise in humans: evidence for a functional reserve in muscle O₂ diffusing capacity. J Physiol. 2015;593(20):4649-64.
- Pastukhova VA, Gunina LM, Lukyanceva GV. The experimental investigation of ultrastructural changes calf muscle under physical training. Visnyk Zaporizhzhya National University. Part Physical education and sport. 2012;Issue 2(8):255-62. [Ukrainian].
- Lukyanova LD. Molecular mechanisms of tissue hypoxia and organism adaptation. Fiziol Zh. 2003;49(3):17-35. [Russian].
- Metaxas T, Mandroukas A, Vamvakoudis E, Kotoglou K, Ekblom B, Mandroukas K. Muscle fiber characteristics, satellite cells and soccer performance in young athletes. J Sports Sci Med. 2014;13(3):493-501.
- Millet G, Roels B, Schmitt L, Woorons X, Richalet J. Combining hypoxic methods for peak performance. Sports Med. 2010;40(1):1-25. doi: 10.2165/11317920-000000000-00000.
- Breen E, Tang K, Olfert M, Knapp A, Wagner P. Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation. High Alt Med Biol. 2008;9(2):158-66. doi: 10.1089/ham.2008.1010.
- Wilmore JH, Costill DL. Physiology of sport and exercise. Kiev: Olympic Literature, 1997. [Russian].
- Kramer K, Dijkstra H, Bast A. Control of physical exercise of rats in a swimming basin. Physiol Behav. 1993;53(2):271-6.
- Filippov MM. The process of mass transfer of respiratory gases during muscle activity. The degree of hypoxia load: The secondary tissue hypoxia. Kiev: Naukova Dumka, 1983; 197-216. [Russian].
- Emelyanov NA. Measuring the gas release or absorption of volumetric method using a Warburg apparatus. Ukr. Biokhim. Zhur. 1971;43(3):390-2. [Russian].
- Karupu B. Electron microscopy. Kiev: Vishcha shkola; 1982. [Russian].
- Hoppler H, Vogt M. Muscle tissue adaptation to hypoxia. J Experim Biol. 2001;18:3133-9.
- Yang C, Mora S, Ryder J, Coker K, Hansen P, Allen L, et al. VAMP3 null mice display normal constitutive, insulin- and exercise-regulated vesicle trafficking. Mol Cell Biol. 2001;21(5):1573-80.
- Pokotylo PB. Ultrastructural study of the cardiomyocytes mitochondrial apparatus of the intact rat. World of medicine and biology. 2014;21(5):148-51. [Ukrainian].
- Salyutin RV, Palianytsia SS, Sokolov MF, Sirman VM, Lobynceva GS. Histological structure of muscular tissue and ultrastructural description of endotheliocytes capillaries by experimental ischemia. Exp. clin. med. 2013;1(58):86-90. [Ukrainian].
- Williams K, Pannirselvam R, Derksen F, de Feijter-Rupp H, Steel C, Robinson N. Regional pulmonary veno-occlusion: a newly identified lesion of equine exercise-induced pulmonary hemorrhage. Vet Pathol. 2008;45(3):316-26. doi: 10.1354/vp.45-3-316.
- Berezovsky BA, Yanko RV, Chaka EG, Litovka IG. The influence interval hypo- and hyperoxia on the condition respirator part of lung. Pulmonologia. 2013;2:57-60. [Russian].
- Sudarikova YuV, Bakeeva LE, Ciplenkova VG. Destructive changes in mitochondria of human cardiomyocytes in alcoholic heart damage. Arkh. Patol. 1999;9:19-23. [Russian].
- Zagoruiko GE. The restructuring of myocardium stroma during adaptation to tissue hypoxia and kraniocerebral hypothermia. Kriobiologia. 1990;2:3-10. [Russian].
- Ryamova KA, Rosenfeld AS. Features of mitochondrial respiration in hypoxia and acidosis Bull. South Ural St. Univ. Ser.: Educ., healthcare serv., physic. educ. 2008;16:31-5. [Russian].
- Tashke K. Introduction to quantitative cytohistological morphology. Bucharest: Akademiya;1980. [Russian].
- Agarwal B, Dash R, Stowe D, Bosnjak Z, Camara A. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. Biochim Biophys Acta. 2014;1837(3):354-65. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.006.

Матеріал надійшов до редакції 22.04.2016

Стан психофізіологічних функцій у висококваліфікованих спортсменів різних вікових груп

Л.Г. Коробейнікова¹, М.Ю. Макаруч², Г.В. Коробейніков¹, В.С. Міщенко¹,
О.Б. Заповітряна¹

¹ Національний університет фізичного виховання і спорту України; Київ;

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: lesia.66@mail.ru

Вивчали вплив вікових особливостей кваліфікованих спортсменів на психофізіологічний стан на етапі підтримки високих результатів. Було досліджено три групи спортсменів різного віку - від 18 до 20 років, від 21 до 25 років і від 26 до 34 років, члени збірної команди України з греко-римської боротьби. Виявлено, що спортсмени старшої вікової групи відрізняються від молодших наявністю більшої втоми з одночасним зниженням автономності при формуванні стратегій спортивної діяльності і досконалим механізмом вегетативних реакцій. Вікові погіршення сприйняття зорової інформації у них проявляються у зниженні продуктивності, ефективності і швидкості порівняно зі спортсменами молодших груп. Також виявлено більш високий рівень напруження автономної регуляції ритму серця порівняно з молодими спортсменами та більш оптимальна активація симпатичного відділу вегетативної нервової системи.

Ключові слова: психофізіологічний стан; особливості сприйняття; переробка інформації; вікові особливості.

ВСТУП

У спорті вищих досягнень актуальним і складним є питання керування фізіологічними процесами організму в тренувальному процесі та при підготовці до вирішальних змагань [1,2]. Оцінка психофізіологічних функцій в той або інший час використовується як інтегральний показник загального функціонального стану.

Характеризуючи психофізіологічні функції, можна отримати інформацію про індивідуально-типологічні характеристики вищої нервової діяльності спортсмена, ймовірно є основою не лише спортивного відбору, а й підґрунтям диференційної діагностики функціонального стану спортсменів на різних етапах тренувального чи змагального процесу [3-5]. Крім того, стан психофізіологічних функцій відображає ступінь вдосконалення спеціальних рухових навичок, що дає змогу використовувати їх як показник технічної підготовки спортсменів [6-8]. Важливим є і

те, що процеси стомлення, які розвиваються при напруженій м'язовій діяльності, перш за все розпочинаються у нервових центрах. Виходячи з всього цього можна сказати, що стан психофізіологічних функцій спортсмена можна вважати унікальним індикатором розвитку процесів напруження, перенапруження і стомлення організму [9-11].

Впродовж останнього часу, у змаганнях світового рівня (з 2004 по 2012 рр.) намітилася чітка тенденція до зростання віку переможців і призерів [12,13]. Доказом цього є те, що на сьогодні переможці Олімпійських ігор, чемпіонатів світу та континентів є спортсмени віком 35 років і старші [14]. Незважаючи на достатню кількість досліджень, присвячених різним аспектам підготовленості спортсменів: функціональної [15-17], психологічної [18,19], техніко-тактичної [1,20], нині мало вивченим залишається питання щодо впливу на структуру та склад підготовки спортсменів високої кваліфікації вікових впливів.

© Л.Г. Коробейнікова, М.Ю. Макаруч, Г.В. Коробейніков, В.С. Міщенко, О.Б. Заповітряна

Метою нашої роботи було вивчення вікових особливостей стану психофізіологічних функцій висококваліфікованих спортсменів.

МЕТОДИКА

Обстежено 41 спортсмена високої кваліфікації (заслужені майстри спорту – ЗМС, майстри спорту міжнародного класу – МСМК та майстри спорту України – МС), віком від 18 до 34 років. Для вивчення вікових особливостей сприйняття та переробки зорової інформації всіх обстежуваних спортсменів було розділено на три групи: до 1-ї групи (юніори) було віднесено 15 спортсменів, віком 18-20 років, кожний із яких мав кваліфікацію МС. Другу групу (умовно молодшу) склали 14 спортсменів, віком 21-25 років. Серед них – 4 мали кваліфікацію МСМК, 10 – МС. До третьої групи (умовно старша) було віднесено 12 спортсменів, віком 26-34 років з кваліфікацією ЗМС 5 чоловік, 5 – МСМК, 2 – МС.

Для оцінки психофізіологічного стану та рівня працездатності нервової системи було використано восьмикольоровий тест Люшера комп'ютерної системи «Мультисихометр-05». В основу методики покладено концепцію про існування асоціативного зв'язку між кольорами та станом людини, що відображає різні способи його адаптації до навколишнього середовища [21, 22]. Завдання обстежуваного полягало у виборі кольору, якому він віддавав перевагу. Для цього потрібно було натискати відповідну клавішу спеціальної клавіатури (праву або ліву). Вивчали показники – працездатність, стомленість, тривога, вегетативний коефіцієнт, гетерономність та автономність.

За допомогою методики «Перцептивна швидкість» психодіагностичного комплексу «Мультисихометр-05» оцінювали характеристики зорового сприйняття, які відносяться до рівня елементарних перцептивних дій. Використана методика дала змогу визначити швидкість і точність співвіднесення геометричних фігур. Завдання обстежуваного

полягало в ідентифікації фігури, частиною якої був тестовий сигнал, котрий становив 75 чи 50% від самої фігури. Оцінювали структурність сприйняття, тобто здатність людини відображати загальне бачення предмета.

Під час дослідження визначали стандартні показники: продуктивність, швидкість, точність, ефективність. Продуктивності вказує на швидкість процесів сприйняття та мислення і залежить від рухливості нервових процесів. Відносна частота помилкових відповідей діагностує ефективність психічних процесів.

Ми використовували методику «Встановлення закономірностей», яка оцінювала рівень розумових здібностей людини. Цей тест призначений для вивчення деяких особливостей процесу мислення та оперативної пам'яті [23]. Визначали показники загальних розумових здібностей: продуктивності – загальна кількість правильно виконаних завдань за весь час виконання тесту; швидкості – відношення кількості «переглянутих» завдань до витраченого на це часу в хвилинали, сигналів за 1 хв; точності – кількість помилкових відповідей; ефективності – процентне відношення правильно виконаних завдань до загальної кількості завдань у тесті, скоригована на ймовірність випадкового вгадування.

Стан регуляторних механізмів у обстежуваних різних груп оцінювали за показниками статистичного аналізу варіабельності ритму серця. Для цього використовували кардіомонітор «Polar RS800CX». Отримані результати аналізували за допомогою статистичної програми «KubiosHRV».

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням комп'ютерних пакетів прикладних програм MS Excel і Statistica 6.0. Оскільки показники, які аналізували, підлягали закону нормального розподілу відповідно до критерію Манна-Уїтні, то для визначення статистичної значущої різниці між вибірками використовували критерій t Стьюдента при рівні значущості не нижче ніж 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення психофізіологічного стану засвідчило відсутність достовірної різниці за досліджуваними показниками між групами юніорів та молодшою віковою групою. Водночас спортсмени старшої вікової групи відрізняються від двох молодших груп за значним зростанням втоми, що свідчить про зниження функціональних можливостей нервової системи (див. табл. 1).

При цьому нижчі значення вегетативного коефіцієнта у спортсменів старшої вікової групи порівняно із молодшими та юніорами вказує на меншу залежність діяльності їх вегетативної нервової системи від зовнішніх чинників (див. табл. 1). Разом з тим зниження автономності у цих спортсменів свідчить про більш високу залежність їх поведінкових реакцій від умов змагальної діяльності.

Таким чином, можна стверджувати, що спортсмени старшої вікової групи виявляють порівняно з більш молодшими вищі ознаки стомлення із одночасним зниженням автономності при формуванні поведінкових реакцій, що компенсується у них більш досконалішими механізмами регуляції вегетативних функцій.

Аналіз результатів тесту «Перцептивна швидкість» виявив наявність різниці за дослідженими показниками у спортсменів різних вікових груп. Встановлено, що рівень продуктивності, ефективності та швидкості сприйняття найвищим є у юніорів порівняно з спортсменами молодшої та старшої вікових

груп (табл.2). При цьому значення точності (відображає відношення кількості позитивних реакцій на відповідні подразники до загальної кількості подразників) найвищим було у спортсменів старшої вікової групи.

Таким чином, загальне вікове погіршення сприйняття зорової інформації у спортсменів старшої вікової групи, яке проявляється у зниженні продуктивності, ефективності та швидкості сприйняття порівняно з юніорами та молодшими спортсменами, не впливає на точність сприйняття зорової інформації, що досягається у спортсменів старшої вікової групи за рахунок їхнього досвіду (див. табл.2).

Слід відмітити закономірне зниження когнітивних функцій у спортсменів старшої вікової групи порівняно із молодшими. Наслідком цього є те, що у них зниженими є продуктивність, швидкість та ефективність переробки інформації (табл.3). Водночас точність вказує на нижчий рівень зорового сприйняття зовнішньої зорової інформації та процесів мислення у старших спортсменів (див. табл.3).

Вікове погіршення сприйняття зорової інформації у спортсменів старшої вікової групи проявляється у зниженні продуктивності, ефективності та швидкості порівняно з юніорами та молодшою групою. Однак у спортсменів старшої вікової групи, за рахунок наявності більшого досвіду, виявляються кращі властивості сприйняття та переробки зорової інформації.

В умовах спортивної діяльності реєстрація та оцінка характеру коливальної струк-

Таблиця 1. Основні показники (ум.од.) психофізіологічного стану елітних спортсменів різних вікових груп, визначені за кольоровим тестом Люшера ($X \pm S(X)$)

Показники	Юніори (n=15)	Молодші (n=14)	Старші (n=12)
Працездатність	9,75±0,97	9,81±0,71	9,42±1,02
Втома	3,62±0,32	3,18±0,99	4,71±0,22*,**
Тривога	2,87±0,97	2,54±0,74	2,71±0,89
Вегетативний коефіцієнт	15,25±0,75	15,90±0,40	14,42±0,76*,**
Гетеромність	6,50±1,05	6,18±0,77	7,00±1,15
Автономність	9,00±0,73	9,72±0,64	8,28±0,06*,**

Примітка: тут і в табл. 2–4 * статистично вірогідна різниця порівняно із групою юніорів, ** – порівняно із молодшою віковою групою.

Таблиця 2. Основні показники перцепції серед елітних спортсменів різних вікових груп ($\bar{X} \pm S(\bar{X})$)

Показники	Юніори (n=15)	Молодші спортсмени (n=14)	Старші спортсмени (n=12)
Продуктивність, ум.од.	19,62±0,13	18,91±0,63	18,42±0,39*
Швидкість, хв ⁻¹	8,28±0,96	7,16±0,63*	4,37±0,77*,**
Точність, ум.од.	0,82±0,09	0,78±0,06*	0,85±0,02**
Ефективність, ум.од.	67,74±2,19	61,63±1,30*	60,31±2,86*

тури (варіабельності) серцевого ритму, що відображає активність регуляторних систем, є досить інформативною при об'єктивному аналізі функціональних можливостей організму спортсмена [24].

Проведений аналіз варіабельності ритму серця свідчить про відмінності між спортсменами старшої вікової групи та молодшими групами. За середньою тривалістю кардіоінтервалів у спортсменів старшої вікової групи виявляється вищий рівень функціонування системи кровообігу (табл.4). Крім того, у них спостерігається вищий рівень напруження регуляції ритму серця, порівняно із молодшими спортсменами. Це підтверджується зниженими значеннями середнього квадратичного відхилення RR-інтервалів та триангулярного індексу. Слід відмітити наявність відмінностей за спектральними характеристиками варіабельності ритму серця між віковими групами спортсменів (див. табл.4). Найнижчий рівень активації наднизькочастотного спектра RR-інтервалів спостерігається у молодшій віковій групі, найвищий – у спортсменів старшої групи. Ця обставина свідчить про посилення активації нейрогуморальних центрів автономної нервової системи у спортсменів в умовах вікової інволюції [25]. Однак збільшені порівняно

із молодшою групою спортсменів значення наднизькочастотного спектра RR-інтервалів у юніорів вказують на недосконалість механізму нейрогуморальної регуляції (див. табл.4).

Водночас найнижчі значення низькочастотного спектра RR-інтервалів у спортсменів старшої вікової групи порівняно із молодшими спортсменами та юніорами є наслідком оптимальної активації симпатичного відділу вегетативної нервової системи. Аналогічний результат отримано за значенням високочастотного спектра RR-інтервалів, який свідчить про більшу активацію парасимпатичного тону автономної регуляції ритму серця у спортсменів старшої вікової групи порівняно із молодшими та юніорами (див. табл.4). Отже, відношення низькочастотного до високочастотного спектра (вегетативний баланс) узгоджується змінами показнику середнього квадратичного відхилення RR-інтервалів, що проявляється у зростанні напруження регуляції ритму серця збільшенням віку спортсмена.

Таким чином, спектральний аналіз кардіоінтервалів виявив більш досконалу систему вегетативної регуляції у спортсменів старшої вікової групи. Однак вікові зміни впливають на активацію компенсаторних механізмів запобігання інволюційних процесів. Зокрема, це виявляється у посиленні

Таблиця 3. Основні показники тесту «встановлення закономірностей» серед спортсменів різних вікових груп ($\bar{X} \pm S(\bar{X})$)

Показники	Юніори (n=15)	Молодші спортсмени (n=14)	Старші спортсмени (n=12)
Продуктивність, ум.од.	23,12±0,89	23,33±0,89	18,42±0,04*,**
Швидкість, хв ⁻¹	13,82±1,28	12,70±1,04	10,80±1,57*
Точність, ум.од.	0,77±0,02	0,77±0,02	0,63±0,09*,**
Ефективність, ум.од.	55,78±5,33	57,56±5,43	40,53±3,40*,**

Таблиця 4. Основні показники варіабельності ритму серця у елітних спортсменів різних вікових груп (X±S(X))

Показники	Юніори (n=15)	Молодші спортсмени (n=14)	Старші спортсмени (n=12)
Середня тривалість кардіоінтервалів, мс	1114,96±49,80	1080,11±34,50	986,10±33,01*,**
Середнє квадратичне відхилення інтервалів, мс	125,21±4,37	112,33±3,71*	101,28±2,99*,**
Триангулярний індекс, ум.од	19,81±0,86	20,09±1,18	13,92±1,83*,**
Наднизькочастотний спектр, мс ²	9501,86±382,01	7392,82±254,19*	10105,20±581,64**
Низькочастотний спектр, мс ²	3164,43±359,55	2849,82±266,26	2260,10±310,51*
Високочастотний спектр, мс ²	2807,00±231,49	2471,82±197,38	13928,30±2428,02*,**
Відношення низькочастотного до високочастотного спектра	1,48±0,03	1,64±0,01	1,94±0,06*
Ширина «хмари» скатерограми кардіоінтервалів	67,71±5,41	62,26±7,79	47,68±6,33*,**
Довжина «хмари» скатерограми кардіоінтервалів	160,37±10,22	142,95±15,16*	132,69±18,99*,**

активації нейрогуморальних центрів та парасимпатичної ланки автономної нервової системи на фоні зростання рівня напруження регуляції ритму серця.

Дослідження абсолютних значень показників скатерограми варіабельності ритму серця показало наявність виразних відмінностей між спортсменами різних вікових груп (див.табл.4). Зменшення абсолютних значень ширини «хмари» у спортсменів старшої групи порівняно із юніорами і молодшими спортсменами вказує на уповільнення аперіодичних коливань кардіоінтервалів. Менші значення довжини «хмари» у спортсменів старшої групи порівняно з юніорами і молодшими спортсменами вказують на уповільнення періодичних коливань кардіоінтервалів, що узгоджується із спектральними характеристиками серцевого ритму (див. табл.4).

Таким чином, зростання рівня напруження регуляції кардіоінтервалів у спортсменів старшої вікової групи супроводжується уповільненням аперіодичних та періодичних коливань.

ВИСНОВКИ

1. Спортсменів високої кваліфікації старшої вікової групи порівняно з більш молодшими спортсменами характеризує вищий рівень стомлення на фоні зниження автономності при формуванні стратегій діяльності, що компенсується більш досконаліми механізмами регуляції вегетативних функцій.

2. Вікове погіршення сприйняття зорової інформації у спортсменів старшої вікової групи проявляється у зниженні продуктивності, ефективності та швидкості порівняно з молодшою групою та юніорами. Однак за рахунок досвіду точність зорового сприйняття у спортсменів старшої групи не страждає.

3. У спортсменів старшої групи зростання активації нейрогуморальних центрів регуляції діяльності серцево-судинної системи проявляється уповільненням аперіодичних і періодичних коливань кардіоінтервалів.

**Л.Г. Коробейникова¹, Н.Ю. Макаrchук²,
Г.В. Коробейников¹, В.С. Мищенко¹,
О.Б. Заповитряна¹**

СОСТОЯНИЕ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ВЫСОКОВАЛИФИЦИРОВАН- НЫХ СПОРТСМЕНОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

В работе изучалось влияние возрастных особенностей высококвалифицированных спортсменов на психофизиологическое состояние на этапе поддержания высоких результатов. Исследовано три группы спортсменов разного возраста. Первая группа – спортсмены в возрасте 18-20 лет, вторая – 21-25 лет, третья – 26-34 года, члены сборной команды Украины по греко-римской борьбе. Выявлено, что спортсмены старшей возрастной группы имеют отличия в наличии утомления, с одновременным снижением автономности при формировании стратегий спортивной деятельности и совершенным механизмом вегетативных реакций. Возрастное ухудшение восприятия зрительной информации у высококвалифицированных спортсменов старшей возрастной группы проявляется в достоверном снижении производительности, эффективности и скорости в сравнении со спортсменами младших групп. Также в старшей возрастной группе наблюдался более высокий уровень напряжения автономной регуляции ритма сердца по сравнению с молодыми спортсменами и наличие оптимальной активации симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Ключевые слова: психофизиологические состояния; особенности восприятия; переработка информации; возрастные особенности.

**L.G. Korobeynikova¹, M.Yu. Makarchuk²,
G.V. Korobeynikov¹, V.S. Mischenko¹,
O.B. Zapovitryana¹.**

STATES OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF ELITE ATHLETES IN DIFFERENT AGING GROUPS

The influences of aging peculiarities in elite athletes on the psychophysiological states on the stage of the maximum capacity were studied. Three groups of athletes with different age were studied. The first group was composed of the athletes aged 18-20, the second one included athletes aged 21-25, the third group included athletes aged 26-34, and were the members of the team of Ukraine in Greco-Roman wrestling. We revealed that elite athletes of older age group were significantly different from the younger by the presence of a large fatigue with the decline of autonomy when forming strategies of sports activities and more perfect the mechanism of autonomic reactions. The aging deterioration of perception of visual information in elite athletes of older age group manifested in a significant

decrease of productivity, efficiency and speed for comparison with the groups of younger athletes. Also, in elite athletes older age group there is a significantly higher level of tension of autonomic regulation of heart rhythm compared with young athletes and the presence of more optimal activation of the sympathetic division of the autonomic nervous system.

Key words: psychophysiological states; visual perception; information processing; age peculiarities.

¹National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv;

²Kyiv National University named Taras Shevchenko

REFERENCES

1. Shiyan V. Methods for improvement of wrestlers' motor skill stability. *Int J Wrest Sci.* 2013; 3 (1): 58-70.
2. Robson-Ansley PJ, Gleeson M, Ansley L. Fatigue management in the preparation of Olympic athletes. *J Sport Sci.* 2013; 27: 1409-20.
3. Korobeynikov G, Korobeynikova L, Jagello W, Mazmanian K. Psychophysiological states and motivation in elite judokas. *Arch Bud Sci Mart Arts.* 2010; 6: 129-36.
4. Khudolii OM, Iermakov SS, Ananchenko KV. Factorial model of motor fitness of junior forms' boys. *J Physi Educat Sport.* 2015; 15(3): 585 – 91.
5. Kozina Z, Sobko I, Bazulyuk T, Ryepko O, Lachno O, Ilitskaya A. The applying of the concept of individualization in sport. *J Physi Educat Sport.* 2015; 15 (2): 172-7.
6. Rodionov AV. Principle of psychophysiological conjugation in the preparation of elite combat athletes. *Sci Olymp Sport.* 2003; 1: 143-6. [Russian].
7. Starosta W. Kinesthetic sense and awareness in wrestling: the Structure, conditions and development of an «opponent's feeling». *Int J Wrest Sci.* 2013; 3(2): 29-50.
8. Gierczuk D, Buljak Z, Rowinski J, Dmirtiev A. Selected coordination motor abilities in elite wrestlers and taekwondo competitors. *Pol J Sport Tourism.* 2013; 19 (4): 230-4.
9. Il'in EP. Psychophysiological states of human. Sankt-Petersburg: Piter. 2005. [Russian].
10. Eston R, Faulkner J, Gibson AC, Noakes T, Parfitt G. The effect of antecedent fatiguing activity on the relationship between perceived exertion and physiological activity during a constant load exercise task. *Psychophysiol.* 2007; 44 (5): 779–86.
11. Ament W, Verkerke JG. Exercise and Fatigue. *Sport Med.* 2009; 39(5): 389-422.
12. Pavlenko UO. Scie methodol sup sports pract devel countr. *Act Probl Phys Cult Sport.* 2011; № 20 (1): 12-8. [Ukrainian].
13. Pavlenko U, Kozlova N. Scientific and methodological provision of preparation athletes in Olympic sport. *Sci Olym Sport.* 2013; № 2: 73-9. [Ukrainian].
14. Pavlenko UO. Prospects of Ukraine national team at the Games of the XXIX Olympiad in Beijing. *Act Probl Phys Cult Sport.* 2007; 12: 4-32. [Ukrainian].

15. Mischenko VS, Lisenko EN, Vinogradov VE. The reactive properties of the cardiorespiratory system as a reflection of adaptation to strenuous muscle activity. Kiev: Naukoviy svit. 2007. [Ukrainian].
16. Dudnik O. Studied of psychophysiological states in athletes with different level of adaptation to intensive muscular activity. Visn Cherkas Univ Biol Sci. 2008; 128: 31-8. [Ukrainian].
17. Schnike RJ, RC Battocchio, TV Dube. Adaptation process affecting performance in elite sport. J Clin Sport Psychol. 2012; 6: 180-195.
18. Grin OR. Psychological support and accompaniment of preparation in elite athletes. Kiev: Olymp literature. 2015. [Ukrainian].
19. Horn TS, Spreemann J. Sport psychology sources of stress in junior elite wrestlers. J Sport Exerc Psychol. 2010; 5(2):159-71.
20. Tunnemann H. Evolution and adjustments for the new rules in wrestling. Psychophysiological. Int J Wrest Sci. 2013; 3 (2): 94-105.
21. Sobchic LN. Introduction to the psychology of personality. Moscow. 1997. [Russian].
22. Sugoniaev KV, Chuplin AU, Medvedev EV. Hardware-software complex psychodiagnostic Multipsihometr. Guidelines. Moscow: «Scientific production center DIP». 2008; 1. [Russian].
23. Sterenberg R. Intelligence as Developing Expertise. Contemp Educ Psychol. 2013;24: 359-75.
24. Korobeynikov GV. The characteristics of autonomic regulation in persons with different levels of mental work capacity. Fiziol Zh. 2000; 46(1): 82-8. [Ukrainian].
25. Korobeynikov G, Korobeinikova L, Shatskih V. Age, psycho-emotional states and stress resistance in elite wrestlers. Int J Wrest Sci. 2013; 3 (1): 58-70.

Матеріал надійшов до редакції 01.03.2016

Морфологічні зміни підшлункової залози після введення мелатоніну у різні сезони року

Р.В. Янко

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

Досліджували морфологічні зміни підшлункової залози (ПЗ) молодих щурів лінії Вістар після введення екзогенного мелатоніну у весняний і осінній періоди року. Препарат тварини отримували щодня протягом 28 діб у дозі 5 мг/кг. Виявлено, що екзокринна частина ПЗ щурів неоднаково реагує на вплив мелатоніну у різну пору року. Так, після його введення у весняний період збільшуються розміри ацинусів, висота їх епітелію (на 7 %), площа екзокриноцитів (на 58 %), їх ядер (на 20 %) та цитоплазми (на 69 %), кількість ядерців в ядрах клітин (на 18 %), знижується ширина прошарків міжчасточкової (на 20 %) та міжацинусної (на 8 %) сполучної тканини. А восени спостерігали зменшення розмірів ацинусів, висоти та площі екзокриноцитів, зростання кількості екзокриноцитів у ацинусі, ядерців та ширини прошарків міжчасточкової сполучної тканини у залозі. Це може свідчити, що мелатонін у весняний період підвищує ознаки синтетичної активності екзокринної частини ПЗ, тоді як восени (за більшістю морфометричних показників) – децю знижує її функціональний стан. Виявлено, що введення гормону як у весняний (більшою мірою), так і в осінній період підвищує ознаки функціональної активності ендокринної частини ПЗ. На це вказує зростання розмірів острівців Лангерганса, збільшення кількості розташованих у них ендокриноцитів.

Ключові слова: мелатонін; підшлункова залоза.

ВСТУП

Підшлункова залоза (ПЗ), якій властива зовнішня та внутрішня секреторна діяльність, відіграє важливу роль в організмі тварин і людини. Вона синтезує ферменти (трипсин, ліпаза, амілаза тощо), які необхідні для перетравлення білків, жирів та вуглеводів. В ендокринній частині залози виробляються гормони (інсулін, глюкагон, соматостатин та ін.), які регулюють вміст цукру в крові та підтримують певний рівень гомеостазису в організмі [1]. Протягом усього життя людини ПЗ зазнає впливу різних несприятливих факторів: вживання алкоголю, неякісної їжі і води, куріння, переїдання, надмірне споживання цукру, забруднення навколишнього середовища, інфекційні хвороби тощо. Це часто призводить до зниження функціонального стану та розвитку патології залози. Одним із офіційних засобів підвищення

функціональних можливостей ПЗ може бути препарат гормонального типу мелатонін. Відомо, що він має універсальні адаптогенні властивості, які реалізуються на різних функціональних рівнях і стосуються більшості органів і систем. Мелатонін є регулятором метаболічних, імунних і репродуктивних процесів, бере участь у механізмах терморегуляції та старінні [2].

Показано, що мелатонін, як прямий акцептор радикалів кисню та азоту і активатор антиоксидантних ферментів, ефективно захищає тканини ПЗ від окисного стресу і запального пошкодження [3]. Встановлено, що його введення поліпшує функцію ПЗ [4], активує синтез нею панкреатичної амілази [5] тощо. Переважна більшість наукових праць присвячена дослідженню дії мелатоніну на ендокринну частину ПЗ [6, 7], тоді як його вплив на екзокринну частину залози – вивчений недостатньо [8]. Літературні дані часто

неоднозначні і суперечливі [7, 9]. Це може бути пов'язано як з використанням в експериментах тварин різного виду і віку, так і з відмінностями проведення експериментів у різний час доби і різну пору року, в дозах введеного препарату, тривалістю експериментів тощо.

Мета нашої роботи – дослідити та порівняти морфологічні зміни екзо- та ендокринної частини ПЗ молодих щурів після введення мелатоніну у весняний та осінній періоди року.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс у весняний (квітень) та осінній (листопад) періоди року. Тваринам дослідних груп щодня перорально вводили екзогенний мелатонін (“Unipharm Inc., США”) о 10.00 в дозі 5 мг/кг. Щури всіх груп перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природним циклом світло/темрява. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щури були розділені на чотири групи: I і III групи – інтактні тварини у весняний та осінній періоди відповідно, II і IV – щури, які отримували екзогенний мелатонін у весняний і осінній період року відповідно. Роботу з щурами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Морфофункціональну активність тканини ПЗ оцінювали за допомогою гістологічних і морфометричних методів дослідження. З тканини ПЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 96°) та діоксані. Отримані зразки заливали в парафін. Парафінові зрізи, завтовшки 5–6 мкм, виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксилином Бемера та еозином. Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували методи дво- та триколірного забарвлення за

Ван-Гізоном та Массоном [10]. З використанням цифрової камери мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nicon» (Японія). Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Image J».

На гістологічних зрізах тканини ПЗ проводили гістоморфометричний аналіз екзо- та ендокринної частини органа. В екзокринній частині ПЗ вимірювали діаметр і площу поперечного перерізу ацинусів, висоту і площу екзокриноцитів, їх ядер та цитоплазми, підраховували кількість ядерців в ядрах екзокриноцитів і середню кількість клітин в ацинусі. В ендокринній частині ПЗ рахували середню кількість панкреатичних острівців на одиницю площі (500 мкм²) і кількість ендокриноцитів, вимірювали площу і діаметр поперечного перерізу острівців, визначали щільність розташування клітин у них. Для визначення стану сполучнотканинних елементів у залозі вимірювали ширину прошарків міжчасточкової та міжацинусної сполучної тканини [11].

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 5.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Структура ПЗ розділяється на екзо- та ендокринну частини. Екзокринна частина складає основну масу залози і представлена ацинусами, вставочними, міжацинусними, внутрішньо-, міжчасточковими і головними протоками. Форма ацинусів як в контрольних, так і в дослідних щурів різноманітна: округла, овальна та видовжена. Ацинуси вистелені з середини секретопродукуючими конусоподібними клітинами – екзокриноцитами, які мають трикутну, чотирикутну, округлу чи овальну форму. Одним полюсом, більш звуженим (верхівка), вони направлені до центра ацинуса, протилежними розширеним

(основа) – назовні. Цитоплазма клітин має зернистість. Ядро розміщується біля основи, де зернистість виражена меншою мірою, та містить ядерця. Ацинуси об'єднуються в часточки, зовні покриті сполучнотканиною оболонкою, яка представлена пухким переплетінням тонких пучків еластичних і колагенових волокон (рис. 1).

В отриманих морфометричних показниках виявлено відмінності функціонального стану екзокринної частини ПЗ контрольних щурів у різну пору року. Так, в осінній період вони мали більші розміри ацинусів, а саме: середній діаметр і площу поперечного перерізу на 10 і 17 % відповідно порівняно зі значеннями у весняний період. При цьому, кількість екзокриноцитів в ацинусі та їх висота мали тенденцію до зростання. Контрольні щури восени мали вірогідно більшу площу екзокриноцитів, їх ядер та цитоплазми на 58, 27 і 67 % відповідно порівняно з весняним періодом (табл. 1). Тобто можна зробити висновок, що щури в осінню пору року мають більшу функціональну активність екзокринної частини ПЗ порівняно з весняним періодом.

В отриманих морфометричних показниках виявлено відмінності функціонального стану екзокринної частини ПЗ після введення мелатоніну у весняний та осінній періоди. У весняний період спостерігали вірогідне зростання середнього діаметра та площі поперечного перерізу ацинусів на 12 та 21 % відповідно порівняно з контролем. Введення гормону в осінній період, навпаки – знижувало розміри ацинусів, а саме: діаметр – на 6 % та площу – на 16 % ($P < 0,05$; табл. 1).

Кількість екзокриноцитів у ацинусі після введення мелатоніну зросла на 10 (весною) та 19 % (восени) порівняно з контролем. У весняний період площа екзокриноцита, його ядра та цитоплазми вірогідно зросла на 58, 20 і 69 % відповідно порівняно з контрольними показниками. Втричі більше зростання площі цитоплазми екзокриноцита, ніж його ядра, призвело до вірогідного зниження ядерно-ци-

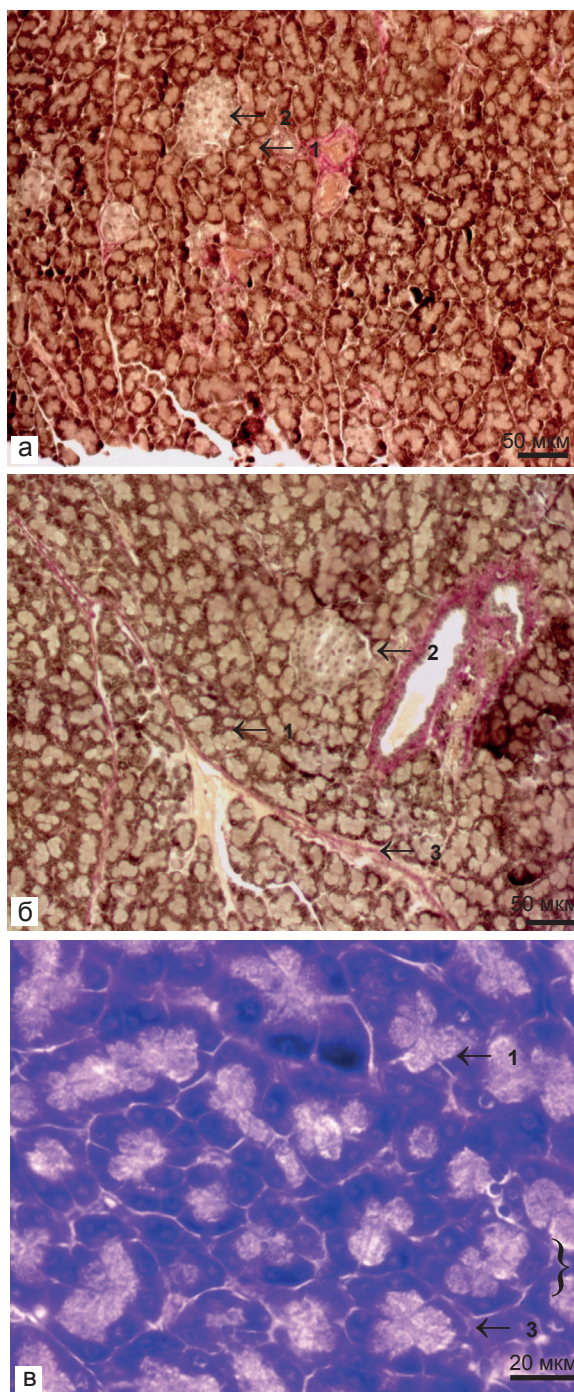


Рис. 1. Зрізи підшлункової залози інтактної тварини (а) та щура, якому вводили мелатонін у весняний період (б): 1 – ацинус; 2 – острівець Лангерганса; 3 – міжчасточкова сполучна тканина. Забарвлення за методом Ван-Гізона. Збільшення у 200 разів; в – мікрофотографія екзокринної частини підшлункової залози: 1 – екзокриноцит; 2 – ацинус; 3 – міжацинусна сполучна тканина. Забарвлення за методом Ван-Гізона. Збільшення у 800 разів

топлазматичного співвідношення на 29 %. Це свідчить про зростаюче навантаження на цитоплазму клітин та підвищену секреторну функцію органа [12]. У дослідних щурів у осінній період площа екзокриноцитів, їх ядер та цитоплазми не мали вірогідних відхилень від контрольних показників. Висота екзокриноцитів після весняного введення мелатоніну мала тенденцію до зростання на 7 %, а восени, навпаки – знижувалася на 6 % порівняно з контролем. Ядерця в екзокриноцитах добре візуалізувалися, мали чіткі межі. Відмічено вірогідне зростання кількості ядерців в ядрах клітин дослідних щурів на 18 (весною) та 13 % (восени). Суттєвих відмінностей у значеннях ядерцево-ядерного співвідношення, незалежно від пори року, між контрольними і дослідними групами щурів не виявлено (табл. 1).

Ендокринна частина займає значно меншу частину тканини ПЗ. Вона утворена острівцями Лангерганса, які дисперсно розміщені в залозі. Острівці відмежовані від ацинусів

тонким сполучнотканинним прошарком та являють собою пронизані густою сіткою капілярів клітинні скупчення (ендокриноцити) округлої форми. Їх форма переважно округла та овальна (рис. 1).

Контрольні щури в різний період року мали відмінності в морфофункціональних показниках стану ендокринної частини залози. Так, у осінній період виявлено вірогідно меншу кількість острівців (на 45 %), їх середній діаметр (на 25 %) і площу (на 13 %) та кількість розміщених в них ендокриноцитів (на 15 %) порівняно з весняним періодом. Можна зробити висновок, що гормонсинтезуюча функція ПЗ значно вища у весняний період, ніж восени (табл. 2).

Після введення мелатоніну весною та восени виявлено вірогідне зниження середньої кількості острівців (на одиницю площі 500 мкм²) на 40 і 18 % відповідно порівняно з контрольними групами щурів. Проте самі острівці у дослідних груп тварин мали значно більші розміри, ніж у контролі. Так,

Таблиця 1. Морфометричні показники структури екзокринної частини підшлункової залози після введення екзогенного мелатоніну (M±m, n=12)

Показники	Весна		Осінь	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Середній діаметр ацинуса, мкм	30,7±0,87	34,3±1,51*	33,7±0,94	31,3±0,62
Площа ацинуса, мкм ²	860±27,65	1044±13,7*	1006±43,92	842±42,1*
Кількість екзокриноцитів у ацинусі	7,9±0,35	8,7±0,37	8,4±0,24	10,0±0,35*
Площа, мкм ²				
екзокриноцита	76,6±12,7	121,2±5,50*	121,1±4,81	111,6±6,44
ядра	16,9±1,02	20,2±1,78*	21,4±0,8	22,3±2,35
цитоплазми	59,7±2,6	101±5,27*	99,7±4,27	89,3±5,89
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,28±0,08	0,2±0,02*	0,21±0,008	0,25±0,01*
Висота епітелію ацинуса, мкм	11,5±0,62	12,3±0,11	13±0,56	12,2±0,43
Кількість ядерців (на 100 ядер) в екзокриноцитах	1,42±0,07	1,68±0,02*	1,41±0,03	1,6±0,03*
Ядерцево-ядерне співвідношення	0,084±0,007	0,083±0,01	0,066±0,003	0,072±0,009

Примітка: тут і в табл. 2. *P<0,05 порівняно з контролем.

Таблиця 2. Морфометричні показники структури ендокринної частини підшлункової залози після введення екзогенного мелатоніну ($M \pm m$, $n=12$)

Показники острівців Лангерганса	Весна		Осінь	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Кількість на 500 мкм ²	2±0,24	1,21±0,15*	1,1±0,28	0,9±0,18*
Площа, мкм ²	11596±1057	15409±1304*	8681±195	10533±1004*
Діаметр, мкм	109,8±10,9	129,5±12,9*	95,1±11,6	103,3±12,9
Кількість ендокриноцитів	104,2±12,7	137,7±12,3*	88,3±15,5	110,9±15,2*
Щільність розміщення ендокриноцитів	0,009±0,0009	0,009±0,0009	0,01±0,001	0,011±0,006

після впливу мелатоніну у весняний період спостерігали вірогідне зростання площі поперечного перерізу (на 33 %) та середнього діаметра острівців (на 18 %). Після осіннього введення гормону їх розміри зростали меншою мірою, а саме: площа – на 21 % ($P<0,05$) та діаметр – на 9 %. Збільшення розмірів острівців пов'язане зі зростанням кількості ендокриноцитів у них на 32 (весною) і 26 % (восени) ($P<0,05$) щодо контролю. Щільність розташування ендокриноцитів в панкреатичних острівцях дослідних щурів зросла на 10 % лише восени. Отже, мелатонін, незалежно від пори року, підвищує функціональну активність ендокринної частини ПЗ (табл. 2).

Літературні дані свідчать, що мелатонін безпосередньо впливає на секреторну активність острівців Лангерганса [13]. В

одних працях показано, що він стимулює дію α - і β -клітин. Так, Кушнір та співавт. [9] виявили, що введення мелатоніну (в дозі 10 мг/кг впродовж 7 діб) щурам з модельованою формою цукрового діабету, відновлює морфологічну структуру острівців ПЗ. Відмічено збільшення розмірів острівців та кількості розміщених у них ендокриноцитів. Інші дослідники надають мелатоніну роль інгібітора щодо синтезу та вивільнення інсуліну. Peschke та співавт. [7] показали й охарактеризували мелатонінові рецептори на β -клітинах панкреатичних острівців, через які пригнічується продукція інсуліну. Інші автори стверджують, що мелатонін впливає на активність острівців не прямо, а опосередковано через соматотропний гормон і інсуліноподібний фактор росту 1 [14]. Група дослідників на

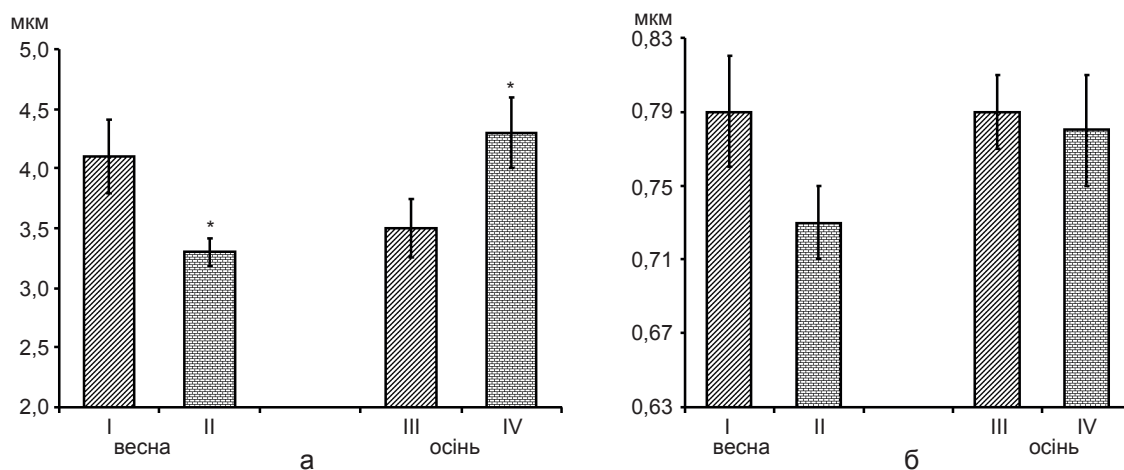


Рис. 2. Ширина прошарків міжчасточкової (а) та міжацинусної (б) сполучної тканини підшлункової залози щурів після впливу мелатоніну у весняний та осінній періоди. * $P<0,05$ порівняно з контролем

чолі з Ramraeheya [6] вважають, що ефекти мелатоніну видоспецифічні: він пригнічує функцію β -клітин гризунів, проте стимулює їх активність у людей. Окремі дослідники припускають, що мелатонін має здатність регенерувати β -клітини [15, 16].

У наших дослідженнях вимірювали ширину прошарків міжчасточкової та між ацинусної сполучної тканини. Виявлено відмінності у зміні цього показника у залозі після впливу мелатоніну у різну пору року. Так, введення мелатоніну у весняний період знижує ширину прошарків міжчасточкової та міжацинусної сполучної тканини на 20 ($P < 0,05$) і 8 % відповідно порівняно з контролем. Після впливу гормону в осінній період спостерігали вірогідне зростання ширини міжчасточкової сполучної тканини на 23 % (рис. 2). Тобто введення мелатоніну щурам у весняний період має ознаки зниження кількості елементів сполучної тканини у ПЗ, а восени, навпаки – збільшення.

Отже, з отриманих морфометричних результатів можна зробити висновок, що інтактні щури в осінню пору року мають більшу функціональну активність екзокринної частини ПЗ порівняно з весняним періодом. Тоді як активність ендокринної частини залози більша у весняний період, ніж восени. Екзокринна частина ПЗ щурів неоднаково реагує на вплив мелатоніну у різну пору року. Введення мелатоніну у весняний період збільшує розміри ацинусів, висоту, площу екзокриноцитів, їх ядер та цитоплазми, кількість ядерців в ядрах клітин, знижує ширину прошарків сполучної тканини. Після введення гормону восени зменшуються розміри ацинусів, висота та площа екзокриноцитів, зростає кількість екзокриноцитів у ацинусі, чисельність ядерців та ширина прошарків міжчасточкової сполучної тканини у залозі. Це може свідчити, що мелатонін у весняний період підвищує ознаки синтетичної активності екзокринної частини ПЗ, а восени (за більшістю морфометричних показників), навпаки – дещо знижує її функціональний

стан. Виявлено, що введення мелатоніну як у весняний (більшою мірою), так і в осінній період підвищує ознаки функціональної активності ендокринної частини ПЗ. На це вказує зростання розмірів островців Лангерганса, збільшення кількості розміщених у них ендокриноцитів. Отримані результати можуть мати не тільки теоретичне значення, але і представляти практичний інтерес для сезонного підвищення ефективності терапевтичного призначення мелатоніну.

Р.В. Янко

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА У РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Исследовали морфологические изменения поджелудочной железы (ПЖ) молодых крыс линии Вистар после введения экзогенного мелатонина в весенний и осенний периоды года. Препарат животные получали ежедневно в течение 28 сут в дозе 5 мг / кг. Выведено, что экзокринная часть ПЖ крыс по-разному реагирует на воздействие мелатонина в разное время года. Так, после его введения в весенний период увеличиваются размеры ацинусов, высота их эпителия (на 7 %), площадь экзокриноцитов (на 58 %), их ядер (на 20 %) и цитоплазмы (на 69 %), количество ядершек в ядрах клеток (на 18 %), снижается ширина прослоек междольковой (на 20 %) и межацинусной (на 8 %) соединительной ткани. А осенью наблюдали уменьшение размеров ацинусов, высоты и площади экзокриноцитов, рост их количества в ацинусе, численности ядершек и ширины прослоек междольковой соединительной ткани в железе. Это может свидетельствовать, что мелатонин в весенний период повышает признаки синтетической активности экзокринной части ПЖ, тогда как осенью (за большинством морфометрических показателей) – несколько снижает ее функциональное состояние. Обнаружено, что мелатонин как в весенний (в большей степени), так и в осенний период повышает признаки функциональной активности эндокринной части ПЖ. На это указывает рост размеров островков Лангерганса и увеличение количества в них экзокриноцитов.

Ключевые слова: мелатонин; поджелудочная железа.

R.V. Yanko

MORPHOLOGICAL CHANGES PANCREAS AFTER OF MELATONIN'S EFFECT IN DIFFERENT SEASONS

Morphological changes of the pancreas of young rats after exposure of exogenous melatonin in the spring and autumn

periods was investigated. Exogenous melatonin (Unipharm Inc., USA) was administered to experimental group of animals daily at a dose 5 mg/kg. The duration of the experiment was 28 days. It was revealed that the exocrine part of the pancreas responds differently to the effects of melatonin at different times of the year. Thus, after administration of melatonin in the spring increase of the size of acinus, the height of the epithelium (by 7 %), area exocrinocytes (by 58 %), of their nucleus (by 20 %) and cytoplasm (69 %), the amount of nucleoli in cells (18 %), reduction the amount of connective tissue elements. Melatonin introduction in the autumn decrease in the size of acinus, height and area of exocrinocytes, growth the number of exocrinocytes in the acinus, nucleoli and width layers interlobular connective tissue in the gland. This may indicate that melatonin increases in the spring of the synthetic activity of the exocrine pancreas, whereas in the autumn (for the majority of the morphometric parameters) – somewhat reduces its functional state. The administration of melatonin in the spring (mostly) and in the autumn periods increased the functional activity of the endocrine pancreas. This is indicated by growth in the size of Langerhans islets, increasing the number and density of the (autumn) endocrinocytes.

Key words: melatonin; pancreas.

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

REFERENCES

1. Fedyukovich N. Anatomy and physiology human: Textbook. Rostov: Phoenix. 2002. [Russian].
2. Anisimov V. Melatonin: role in an organism, application in a clinic. SPB: Sistema. 2007. [Ukrainian].
3. Yıldırım A, Tuncer M, Pamukcu O, Aktas A, Akkus M. Effects of ischemia / reperfusion on β cells of pancreas and protective effects of melatonin treatment. *Int J Morphol.* 2009; 27 (2): 519–25.
4. Cuesta S, Kireev R, García C, Rancan L, Vara E, Tresguerres J. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr).* 2013; 35 (3): 659–71.
5. Svehkina E, Tyutyunnik N, Vinogradova I. Influence of light regimes, melatonin and epithalon on the activity of pancreatic and intestinal amylase in rats of different ages. *Advances Gerontol.* 2006; 19: 66–71. [Russian].
6. Ramraheya R, Muller D, Squires P. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2008; 44 (3): 273–79.
7. Peschke E, Bach A, Villbaure E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res.* 2006; 40 (2): 184–91.
8. Yanko R. Morphological characteristics of the exocrine pancreas after administration of exogenous melatonin. Materials of XV scientific conference of students and young scientists «News and perspectives of medical science». 2015; 48–9. [Ukrainian].
9. Kushnir Yu, Davydenko I. Influence of melatonin on condition pancreatic islets in aloksa-diabetic rats. *World of Med and Biolog.* 2009; 4: 31–5. [Ukrainian].
10. Korzhevsky D. Principles of histological techniques. SPB: SpetsLit. 2010. [Russian].
11. Verigo L. Variability of connective tissue of the pancreas. (Morpho-experimental research). Author. dissertations. 03.00.13. Physiology: Moscow. 2005. [Russian].
12. Nikolaeva O, Kovaltsova M, Gorgol N. Morphofunctional characteristics of pancreas of rats with chronic stress. *Theoretic and Experien Med.* 2013; 59 (2): 23–7. [Russian].
13. Lima L, Reis L, Lima M. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Rev Brasil Biol.* 2001; 61 (2): 333–40.
14. Goncharova N, Khavinson V, Lapin B. Pineal gland: age pathology (mechanisms and correction). St.Petersburg: Nauka. 2007. [Russian].
15. Mehmet K, Hamdi U, Turan K, Ozdemir S. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic b-cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Toxicol.* 2006; 80 (6): 362–9.
16. El-Desouk N, Basyony M, El-Nenaey M, Abdel-Magied R. Histological and cytological studies on the effect of melatonin on experimentally induced pancreatic diabetes in rats. *Egypt J Exp Biol (Zool).* 2007; 3: 69–82.

Матеріал надійшов до редакції 24.12.2015

Взаємозв'язок активності епіфіза та гонад у щурів-самців у різні сезони року

В.В. Гнатюк, Н.М. Кононенко

Національний фармацевтичний університет, Харків; e-mail: gvalery_nice@ukr.net

За допомогою вивчення вмісту мелатоніну та тестостерону в сироватці крові досліджено функціональну активність епіфіза та гонад у різних сезонах року у щурів-самців різного віку – 3, 9, 15 та 20 міс, що відповідає віку людини 14, 29-30, 43-44, 55-56 років. Виявили наявність циркануального ритму секреції як мелатоніну, так і тестостерону. Найбільший вміст мелатоніну спостерігається у щурів-самців у літній та зимовий період, найменший – восени. На відміну від мелатоніну найвищий вміст тестостерону в усіх вікових групах був восени, найменший – взимку. Встановлений зворотний кореляційний зв'язок між вмістом мелатоніну та тестостерону в вікових групах 3, 9 та 15 міс в усі сезони. Найбільший коефіцієнт кореляції ($r=-0,92$) визначили у щурів віком 9 міс восени, коли вміст мелатоніну в сироватці крові був найменшим, а тестостерону – найбільшим відносно всіх вікових груп та сезонів. Отримані результати дають змогу стверджувати про наявність зв'язку між функціональною активністю епіфіза та гонад у щурів-самців різного віку в різних сезонах року.

Ключові слова: епіфіз; гонади; мелатонін; тестостерон; сезони року; стать; вік

ВСТУП

Більшість фізіологічних процесів на різних рівнях організації – від молекулярного до органного – проходять із визначеною періодичністю. Ритми окремих показників і функцій у нормі синхронізовані між собою, що забезпечує високу надійність функціонування організму [1]. Згідно з сучасними уявленнями роль провідного водія ритму відіграють супрахіазматичні ядра гіпоталамуса (СХЯ). Через контакти з гіпоталамічними нейроендокринними клітинами, що містять рилізінг-гормони, СХЯ регулюють добові ритми секреції гормонів гіпофіза та надсилають свої сигнали до розташованих на периферії ендокринних залоз (надниркові, щитоподібна та статеві залози), викликаючи ритмічні зміни рівня синтезованих ними гормонів [2].

Унікальне регуляторне значення для роботи нервової та ендокринної систем має епіфіз, здатний інтегрувати різні екзогенні й ендогенні сигнали, трансформуючи їх у

гормональну відповідь. Позбавлений власних ритмозадавальних властивостей у ссавців, він забезпечує поєднання, координацію різних за періодом біологічних ритмів [3]. В останні роки мелатонін розглядають як провідний інтегратор, що опосередковує всі найбільш важливі функції епіфіза, пов'язані з контролем діяльності периферичних ендокринних залоз та центральної нервової системи. В нормі його функціональна активність знаходиться в протифазі з діяльністю гіпофіза. Якщо гіпофіз за рахунок тропних гормонів активує ендокринну функцію, то епіфіз, навпаки, її гальмує [4]. При цьому зниження вмісту мелатоніну в крові стимулює синтез гіпофізом лютеїнізуючого (ЛГ) та фолікуло-стимулюючого (ФСГ) гормонів [5].

Тестостерон – є головним гормоном, що підтримує сексуальну функцію у чоловіків та забезпечує взаємодію між нервовою, ендокринною та судиною системами [6]. Процес синтезу тестостерону знаходиться під контролем гіпоталамо-гіпофізарної системи

та реалізується за механізмом зворотного зв'язку на двох рівнях: гіпоталамічному та гіпофізарному [7]. Враховуючи відомості про вплив мелатоніну на синтез ЛГ і ФСГ, знання про взаємозв'язок цих гормонів та синтезу тестостерону, обговорюється наявність зв'язку і між рівнями мелатоніну та тестостерону безпосередньо. Також відомо, що деяким хворобам, в патогенезі яких нині велике значення надається мелатонінодефіциту, – виразкова хвороба шлунка, інфаркт міокарда, гіпертонічна хвороба [8], притаманні гендерні та вікові особливості виникнення – статистично високі рівні захворюваності у осіб чоловічої статі молодого віку [9], але ж робіт, де було б вивчено взаємозв'язок між рівнями мелатоніну та тестостерону в сироватці крові у щурів або чоловіків різного віку в різні сезони року ми не зустріли.

Мета роботи: встановити взаємозв'язок активності епіфіза та гонад у щурів-самців різного віку в різні сезони року за допомогою вивчення вмісту мелатоніну та тестостерону в сироватці крові.

МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 96 щурах-самцях, які були розподілені на групи за віком, а саме 3, 9, 15 та 20 міс, що відповідає віку людини 14, 29-30, 43-44, 55-56 років відповідно, в чотирьох сезонах: осінь (жовтень), зима (січень), весна (березень) та літо (липень). Під час досліду тварини були розподілені на групи по 6 тварин в кожній, утримувалися на стандартному харчовому раціоні та температурному режимі в умовах природного освітлення без впливу штучних джерел освітлення. Співвідношення світло/темрява було таким: осінь – 10:14, зима – 8:16, весна – 12:12, літо – 16:8. Визначення вмісту мелатоніну та тестостерону в сироватці крові щурів виконували методом імуноферментного аналізу, з використанням набору Melatonin ELISA («IBL-International», Німеччина) та набору DRG Тестостерон ELISA («DRG», Німеччина). Збір крові проводили з

10.00 до 12.00. Період для забору крові було обрано таким чином, щоб не було збігів піків циркадіанних ритмів секреції досліджуваних гормонів – для мелатоніну це з 2.00 до 4.00, для тестостерону – 6.00-8.00 [3, 10], а також з урахування наявності низько- та високоамплітудних ритмів секреції мелатоніну, співвідношення яких по-різному представлені в різних вікових групах – у молодих переважають високоамплітудні ритми, а у осіб похилого віку – низькоамплітудні [11]. Усі втручання та евтаназію тварин проводили згідно з вимогами комісії з біоетики НФаУ та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та I Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Для визначення взаємозв'язку вмісту мелатоніну та тестостерону розраховували коефіцієнти кореляції. Оцінку щільності зв'язку проводили за «Таблицею Чеддока» [12]:

Коефіцієнт кореляції	Щільність зв'язку
1,0	Зв'язок функціональний
0,9 – 0,99	Дуже сильний
0,7 – 0,9	Сильний
0,5 – 0,7	Значний
0,3 – 0,5	Помірний
0,1 – 0,3	Слабкий
0,00	Зв'язок відсутній

Статистична обробка матеріалу включала використання стандартних методів варіаційної статистики, розрахунок середніх значень (М) та середньої похибки (m); оцінку отриманих результатів проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, вірогідною вважали різницю при $P \leq 0,05$ [13]. Використовували програмне забезпечення Statistica 7.0 та Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було встановлено, що найбільший вміст мелатоніну спостерігається у щурів-самців в літній та зимовий період, а найменший – восени

(рис. 1,а). Восени цей показник вірогідно знижувався у всіх вікових групах в 1,9-2,4 раза порівняно зі значеннями влітку та в 1,8-2 рази щодо значень в зимовий період. Найменший вміст восени було встановлено в групі щурів віком 9 міс – $127,28 \pm 5,11$ пмоль/л, що було на 22% нижче порівняно з 3-місячними щурами ($P \leq 0,05$) та на 20% – з щурами віком 15 міс ($P \leq 0,05$). Навесні вміст мелатоніну був вищий ніж восени в усіх вікових групах, хоча вірогідна різниця відмічена лише у щурів віком 3 міс – 17% ($P \leq 0,05$).

Встановлено, що найменший вміст мелатоніну навесні спостерігається у щурів віком 20 міс – $140,54 \pm 8,43$ пмоль/л та, як і восени, у щурів 9 міс – $142,33 \pm 7,18$ пмоль/л, що відповідно на 29-28% ($P \leq 0,05$) нижче, ніж у щурів віком 3 міс – $198,66 \pm 10,24$ пмоль/л. Також навесні вірогідна різниця вмісту цього показника була між віковими групами 9 і 20 міс – 25% та 15 і 20 міс – 16%. У тварин всіх вікових груп навесні спостерігалася і різниця щодо вмісту мелатоніну зимою та літом ($P \leq 0,05$).

Таким чином, у всі сезони найбільший вміст мелатоніну виявлено у щурів віком 3 міс, найменший – у щурів 20 міс. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури [3], де автори відмічають зниження вмісту мелатоніну у людей більш похилого віку. Водночас у нашому дослідженні був визначений низький вміст мелатоніну восени, притаманний 9-місячним щурам. Оцінюючи сезонні коливання встановлено, що влітку в усіх вікових групах цей показник був найвищий, що не збігається з даними Бондаренко [14], в якій були досліджені нічні піки синтезу мелатоніну в сироватці крові радіоімунним методом, але узгоджується з даними іншої праці [15], де обговорюються питання наявності високої екскреції метаболіту мелатоніну – 6-сульфтоксимелатоніну саме влітку вночі. Цей факт автор [15] та інші науковці [16], в тому числі і Бондаренко [17], пов'язують зі змінами вертикального компонента геомагнітного поля Землі. Отримані

дані вказують на те, що цикл світло-темрява хоча і є потужним, але не єдиним фактором зовнішнього середовища, який регулює формування біоритмів у пінеальній залозі. Також слід враховувати екстрапінеальні джерела синтезу мелатоніну, який може потрапляти в кровотік і впливати на віддалені клітини-мішені [18], а отже бути частиною мелатоніну, що визначається під час аналізу. Найменший вміст мелатоніну було виявлено восени та навесні, що узгоджується з даними літератури, де обговорюються питання існування сезонного фізіологічного десинхронозу в період біологічної весни та осені [19].

Слід відмітити, що найвищий вміст тестостерону у всіх вікових групах спостерігався восени, найменший – взимку ($P \leq 0,05$; див. рис. 1,б). Отримані результати узгоджуються з даними літератури [20], підтверджуючи наявність циркануального ритму секреції тестостерону та можливий взаємозв'язок вмісту мелатоніну та тестостерону. Протягом всього експерименту вміст тестостерону у 20-місячних щурів залишався низьким порівняно з іншими віковими групами, не мав вірогідних відмінностей в різні сезони року, що є важливим показником старіння, яке відбувається в організмі чоловіків [21]. Найбільший вміст тестостерону у крові був восени у самців віком 9 міс – $7,57 \pm 0,53$ нмоль/л та 15 міс – $6,73 \pm 0,93$ нмоль/л, що відповідає віку чоловіків з найвищими значеннями цього показника [22]. При цьому у щурів віком 3 міс вміст тестостерону вірогідно зменшений – $5,52 \pm 0,27$ нмоль/л порівняно з 9-місячними тваринами, що враховуючи більш високий вміст мелатоніну, визначений у щурів віком 3 міс, підтверджує наявність гальмуючого впливу останнього на систему гіпоталамус-гіпофіз-гонади [4, 6]. Однак вірогідна різниця між вмістом тестостерону в групах, що відповідають репродуктивному періоду, а це щури-самці віком 3, 9 та 15 міс, була тільки восени; взимку, навесні та літом – вірогідні відмінності між вмістом тестостерону в сироватці крові відсутні.

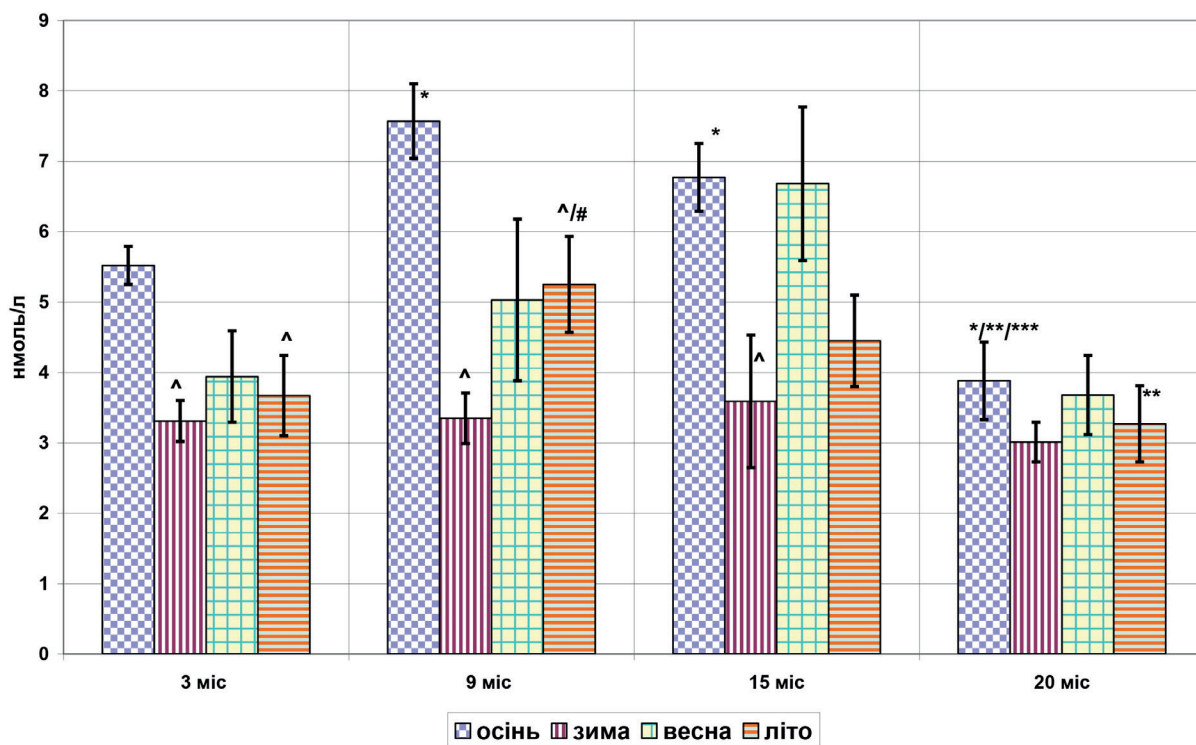
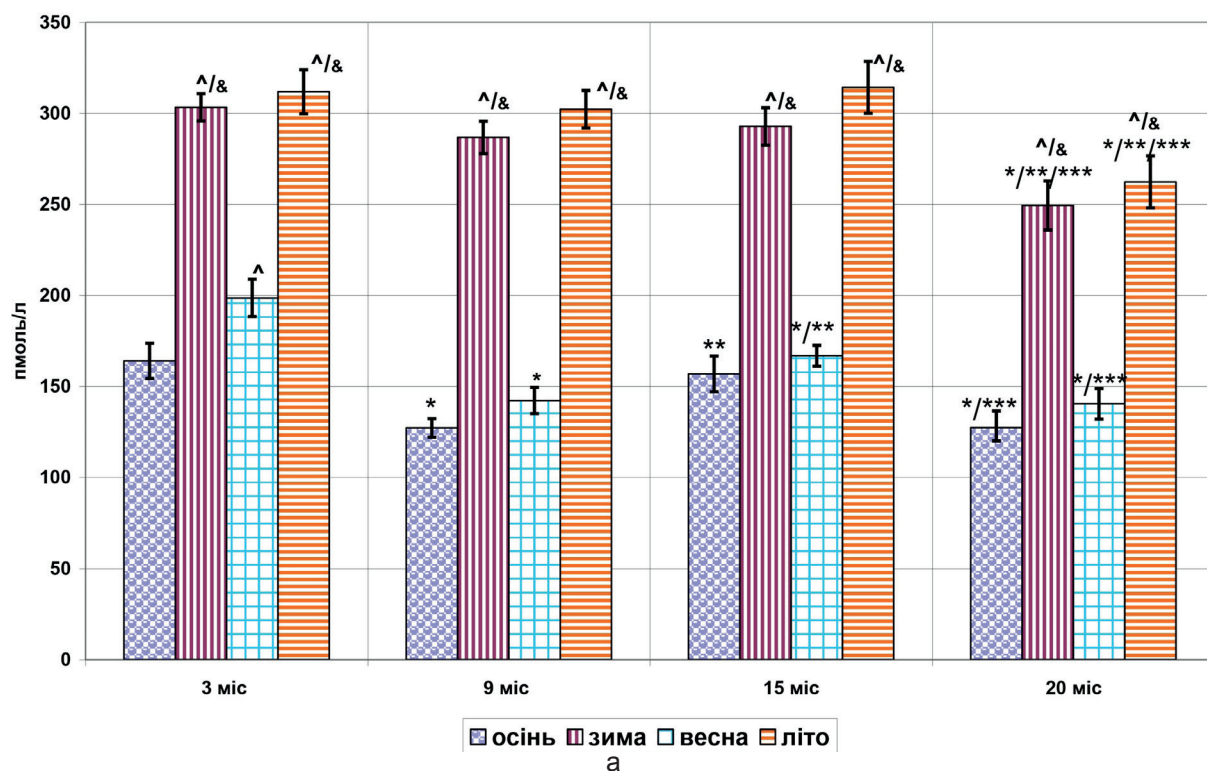


Рис. 1. Вміст мелатоніну (а) та тестостерону (б) в сироватці крові щурів-самців різного віку в різні сезони року.
 * $P \leq 0,05$ відносно щурів віком 3 міс; ** $P \leq 0,05$ відносно щурів віком 9 міс; *** $P \leq 0,05$ відносно щурів віком 15 міс; ^ $P \leq 0,05$ відносно значень восени; & $P \leq 0,05$ відносно значень навесні

Для визначення взаємозв'язку вмісту мелатоніну та тестостерону нами було розраховано коефіцієнти кореляції. Встановлено, що у щурів віком 3, 9 та 15 міс в різні сезони року був зворотний кореляційний зв'язок між вмістом гормонів (рис. 2), що означає – зниження вмісту мелатоніну може призводити до підвищення вмісту тестостерону та навпаки, і ще раз, підтверджує гальмувальний вплив мелатоніну на синтез гонадотропних гормонів гіпофіза [4, 6], а відповідно й на зміни секреції гормонів периферичної ендокринної ланки.

Ступінь кореляції відрізнявся у щурів різного віку та в різні сезони року. Найвищий – дуже сильний – кореляційний зв'язок між вмістом мелатоніну та тестостерону спостерігався у щурів віком 9 міс восени $-0,92$ (рис. 2). До груп зі значним рівнем кореляції (від $-0,50$ до $-0,70$) увійшли щури віком 3 та 15 міс восени – $-0,62$ та $-0,69$ та щури віком 9 та 15 міс у весняний період – $-0,56$ і $-0,59$ відповідно. В інших вікових групах взимку та літом

коефіцієнт кореляції був помірний – від $-0,33$ до $-0,47$. Слабким та різноманітним він був у щурів віком 20 міс від $-0,06$ навесні до $+0,17$ – восени, що свідчить про зміни в системі нейрогормональної регуляції, котрі відбуваються з віком [21]. Отримані результати, можливо пояснити, інтегруючи два механізми: по-перше, гальмувальну дію мелатоніну на систему гіпоталамус-гіпофіз-сім'яники за допомогою пригнічення синтезу гонадотропних гормонів; по-друге, зниження синтезу мелатоніну призводить до підвищення секреції ФСГ та ЛГ, що стимулює синтез тестостерону в клітинах Лейдіга, який в свою чергу, разом з ЛГ, може спричинити ще більше зниження вмісту мелатоніну блокуванням трансляції мРНК N-ацетилтрансфери – головного ферменту перетворення серотоніну в мелатонін [23].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено наявність взаємозв'язку функціональної активності епіфіза та гонад

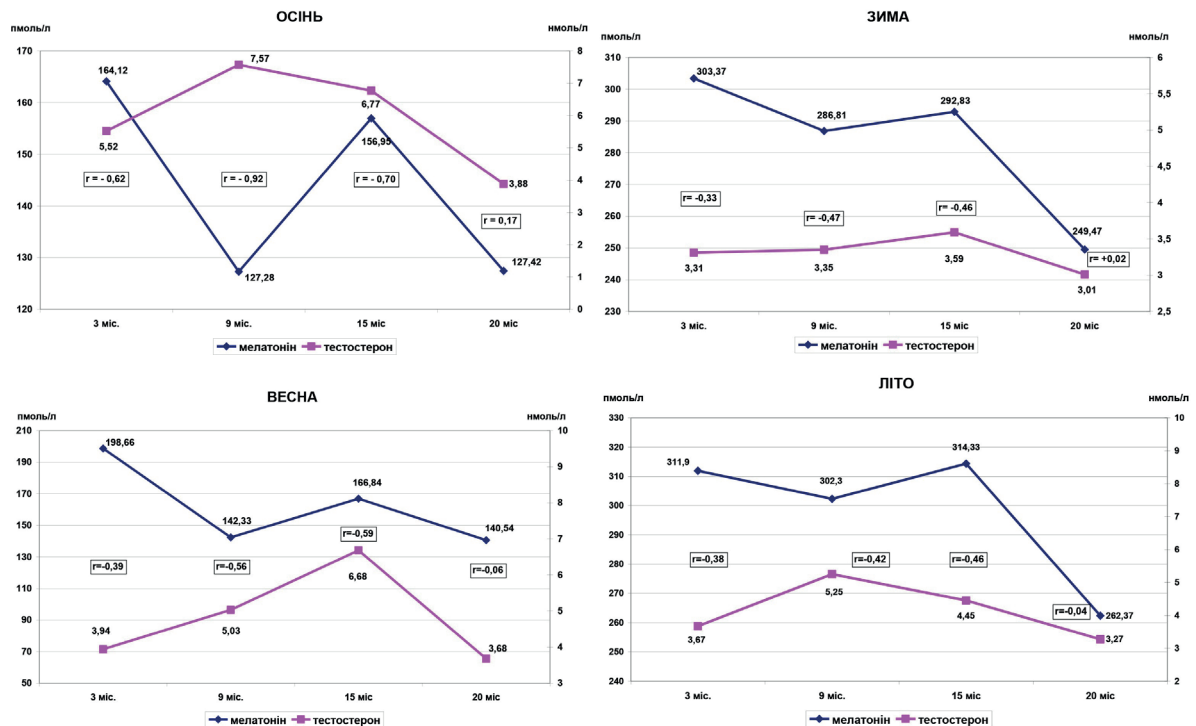


Рис. 2. Показники кореляції мелатоніну та тестостерону в сироватці крові щурів-самців різного віку в різні сезони року

на підставі вивчення вмісту мелатоніну та тестостерону в сироватці крові щурів-самців різного віку в різні сезони року.

2. Найщільніший зворотний кореляційний зв'язок між вмістом мелатоніну та тестостерону спостерігався восени у щурів віком 9 міс.

В.В. Гнатюк, Н.Н. Кононенко

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ АКТИВНОСТИ ЭПИФИЗА И ГОНАД У КРЫС-САМЦОВ В РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Определяя содержание мелатонина и тестостерона в сыворотке крови провели исследование функциональной активности эпифиза и гонад в разные сезоны года у крыс-самцов разного возраста – 3, 9, 15 та 20 мес, что соответствует возрасту человека 14, 29-30, 43-44, 55-56 лет. Установили присутствие цирканнуального ритма секреции как мелатонина, так и у тестостерона. Наибольшее содержание мелатонина наблюдается у крыс-самцов в летний и зимний период, наименьшее – осенью. В отличие от мелатонина наивысшее содержание тестостерона во всех возрастных группах было осенью, наименьшее – зимой. Установлена обратная корреляционная связь между содержанием мелатонина и тестостерона в возрастных группах 3, 9 и 15 мес во все сезоны. Наибольший коэффициент корреляции ($r=-0,92$) был определен у крыс возрастом 9 мес осенью, когда содержание мелатонина в сыворотке крови было наименьшим, а тестостерона – наибольшим относительно всех возрастных групп и сезонов. Полученные результаты позволяют утверждать, что существует связь между функциональной активностью эпифиза и гонад у крыс-самцов разного возраста в разные сезоны года.

Ключевые слова: эпифиз; гонады; мелатонин; тестостерон; сезоны года; пол; возраст.

V. Hnatiuk, N. Kononenko

THE STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY OF EPIPHYSIS AND GONADS IN MALE RATS IN DIFFERENT SEASONS

In male rats of different ages, we studied the functional activity of the pineal gland and the gonads during different seasons by determining the levels of melatonin and testosterone in the blood serum. It was found that the highest levels of melatonin observed in male rats in summer and winter, and the lowest – in autumn. The lowest level of melatonin has been established in the group of rats aged 9 months – 127.28 ± 5.11 pmol/l that was 22% lower than the level of melatonin in 3 months old rats ($P \leq 0,05$), and 20% below the level of melatonin in rats of 15 months old ($P \leq 0,05$). The highest level determined in rats aged 3 months (corresponds to the age of man – 14 years old),

the lowest – in rats 20 months (corresponds to the age 55-56 years old). At the same time, the low level of melatonin was defined in rats aged 9 months in the autumn (corresponds to the age of man 29-30 years). In the study of testosterone levels in different seasons it was found that the highest level in all age groups presents in autumn, the lowest – in winter. When comparing the levels of testosterone in different age groups, it was determined that the fall of the highest level of testosterone present in the blood of males age 9 months and 15 months, which corresponds to the age of 29-30 and 43-44 of human years. Significant difference between the levels of testosterone in the groups that correspond to the reproductive age – rats of age 3, 9 and 15 months, are present only in the autumn; spring and summer – significant differences between the levels of testosterone absent. The degree of correlation differed in rats of different ages in different seasons: the highest correlation between the levels of melatonin and testosterone was determined in rats aged 9 months in autumn. The correlation coefficients in rats aged 20 months old have been weak - from 0.05 in the spring to 0.17 in autumn that shows the changes in neurohormonal regulation which occur with age.

Key words: epiphysis; gonads; melatonin; testosterone; seasons; sex; age.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

REFERENCES

1. Korkushko OV, Shatilo VB. Functional status pineal gland of the brain with aging: ways of correction desynchronosis. *Bukovin Med Visnik*. 2006;4(10):8–10. [Ukrainian].
2. Komarov FI, Rapoport SI, Malinovskaja NK, Anisimov VN. Melatonin in health and disease. Moscow; 2004. [Russian].
3. Anisimov VN. Chronometer of life. *Priroda*. 2007;7:3–10. [Russian].
4. Yanko RV. Morphofunctional state of the thyroid gland after exposure to melatonin. *Fiziol Zh*. 2015;5(61):47–51. [Ukrainian].
5. Kaladze NN, Soboleva EM, Skoromnaia NN. Results and prospects of physiological, pathogenetic and pharmacological effects of melatonin. *Zdorov Reb*. 2010; 2(32):156–66. [Russian].
6. Minukhin AS. The role of androgens in the provision of sexual function in men. *Probl Endocr Path*. 2010; 1:99–106. [Russian].
7. Minukhin AS, Bondarenko VA. The role of hormonal factors in the regulation and maintenance of sexual function of men. *Probl Endocr Path*. 2011; 1:76–82. [Russian].
8. Kostenko E, Manevich TM, Razumov NA. Desynchronosis as One of the Most Important Factors of Cerebrovascular Disease. *Lecheb Delo*. 2013; 2:104–116. [Russian].
9. Osnovni prichini visokogo rinvya smertnosti v Ukraini. *News Med and Pharm*. 2010; 22 (350):URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/15170>. (Accessed 01.04.2016). [Russian].

10. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(3):907–13.
11. Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Pisaruk AV, Labunets IF. Diurnal rhythms of changes in the function of cardiovascular system and its autonomic regulation in apparently healthy elderly subjects with special reference to the state of melatonin-producing function of the epiphysis. *J Acad Med Sci Ukr.* 2005; 1 (11):136–47.
12. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malaw Med J Sept.* 2012; 24(3): 69–71.
13. Kochetov AG, Liang OV, Masenko VP, Zhiron IV, Nakonechnikov SV, Tereshchenko SN. Statistical methods of medical data. Moscow, 2012. [Russian]
14. Bondarenko LA. Comparative estimation of season influence on the night melatonin concentration peak formation in young and old rats. *Physiol J.* 1992; 2(38):111–14. [Russian].
15. Bartsch H, Bartsch C, Mecke D, Lippert TH. Seasonality of pineal melatonin production in the rat: possible synchronization by the geomagnetic field. *Chronobiol Int.* 1994; 11(1):21–6.
16. Rapoport SI, Malinovskaya NK. Epiphysis – the target-organ of biotropic action of natural magnetic waves. *Bukov Med Herald.* 2006; 4(10):13–15. [Russian].
17. Bondarenko LA. The role of interactions between internal and external environmental factors in regulation of pineal gland functional activity. Manuscript. Kyiv, 2003. P.10. [Russian].
18. Belenichev IF, Gubskiy YuI, Llevitsky EL, Kovalenko SI, Marchenko AN. Regulation of antioxidant homeostasis and system detoxication of organism by hormone melatonin. Role of melatonin dependent receptors in realization of this function. *Mod Probl Toxicol.* 2003; 2:2–16. [Russian].
19. Johnsson A. Light, circadian and circannual rhythms. *Solar Radiat Human Health.* Oslo, 2008. P. 57–75.
20. Agadzhanian NA, Radish IV, Khisamutdinov AF. The lipid and hormone metabolism in healthy men in different seasons. *Kazan Med J.* 2009; 6 (90):776–79. [Russian].
21. Bondarenko LA. Some hormonal mechanisms of accelerated aging at gipopinealizme. Kharkiv, 2015. [Russian].
22. Iarygina VN, Melenteva AS. Manual Gerontology and Geriatrics. Moscow, 2010. [Russian].
23. Belichev IF, Gubskii YI, Levickii EL, Kovalenko SI, Marchenko AN. Regulation of antioxidant homeostasis and detoxification system of the body of the hormone melatonin. The role of melatonin-dependent receptors in this function. *Such Probl Toksik.* 2003; 2:2–16. [Russian].

*Матеріал надійшов до
редакції 22.01.2016*

Оцінка функціонального стану печінки та ефективності терапії за ентеропатології телят

В.А. Грищенко¹, Т.М. Чернишенко², О.В. Горницька², Т.М. Платонова²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; e-mail: viktoriya_004@ukr.net

Проведено комплексний аналіз гепатоспецифічних біохімічних показників крові та системи гемостазу в телят, які перехворіли на ентеропатологію у 2–7-добовому віці. Використання комплексу тестів для оцінки функціонального стану печінки та ефективності терапевтичних схем показало, що у тварин цієї групи порівняно з контролем на 30-ту добу життя істотно підвищена концентрація кон'югованого білірубіну (в 1,6 раза), активність аспартат- і аланінамінотрансфераз (в 1,2 раза), γ -глутамілтранспептидази (в 1,5 раза) і лужної фосфатази (в 1,4 раза), а також вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів (в 4 рази). Таке відхилення зазначених параметрів від норми свідчить про необхідність контролю за функціональним станом печінки навіть через 3 тиж після клінічного видужування тварин. Для запобігання розвитку вторинної гепатопатології рекомендовано продовження медикаментозного коригування. Визначено, що за токсичної диспепсії новонароджених телят для відновлення функціонального стану печінки у терапевтичні схеми доцільно включати фосфоліпидовмісну біодобавку «FLP-MD» як засіб репаративної терапії, котру варто застосовувати й у період реабілітації, до 30-добового віку включно, що забезпечує остаточне відновлення досліджуваних показників.

Ключові слова: гепатоспецифічні біохімічні показники крові; система гемостазу; новонароджені телята; печінка; токсична диспепсія; реабілітація; терапевтичні схеми; БАД «FLP-MD».

ВСТУП

В організмі новонароджених тварин з моменту ініціації власних процесів газообміну спрацюють і поступово вдосконалюються механізми терморегуляції, детоксикації, травлення, регуляції кислотно-лужного й електролітного балансу та інші, що забезпечується генетично визначеною метаболічною перебудовою в тканинах. Тому перший місяць життя телят характеризується значним напруженням метаболізму і легкістю виникнення «транзиторних» або субклінічних порушень гомеостазу [1, 2]. В цей період у телят часто виникає шлунково-кишкова патологія різної етіології (проста і токсична диспепсія, колибактеріоз тощо), що значно порушує становлення процесів обміну та зумовлює появу розладів структурно-функціонального стану органів системи травлення, у тому числі найбільшої

в організмі травної залози – печінки [3, 4]. Відомо, що при гострих і хронічних розладах травлення у новонароджених в паренхімі печінки відмічають дистрофічні зміни гепатоцитів, а у важких випадках – дрібно-, середньо- і великокрапельне жирове переродження [5]. Порушення функціонального стану печінки виявляються впродовж тривалого часу після клінічного видужування тварин [3, 5, 6]. Водночас швидкість і якість відновлення порушених функцій печінки та зневоднення організму під час хвороби здатні суттєво впливати на систему гемостазу, яка є вкрай важливою для підтримання гомеостазу тварин, що перехворіли на ентеропатологію.

Стабільність стану системи гемостазу забезпечується динамічною рівновагою між прокоагулянтною, антикоагулянтною та фібринолітичною ланками [7, 8]. Набуті порушення системи гемостазу проявляються

© В.А. Грищенко, Т.М. Чернишенко, О.В. Горницька, Т.М. Платонова

комплексом динамічних біологічних реакцій, які починаються з моменту надходження в кровообіг або генерації в ньому прокоагулянтних активаторів [8–10]. Припускають, що у новонароджених телят, які перехворіли на токсичну форму диспепсії, відбуваються компенсаторні зміни регуляторної активності системи гемостазу у відповідь на суттєві розлади водно-електролітного обміну, кислотно-лужного стану та реологічних властивостей крові, зумовлені порушенням функціонального стану шлунково-кишкового тракту, а також печінки.

Мета нашої роботи – комплексний аналіз гепатоспецифічних біохімічних показників крові та системи гемостазу в телят, які перехворіли на токсичну диспепсію, для оцінки функціонального стану печінки та контролю ефективності терапевтичних схем.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 2-добових телятах, яких було поділено на 3 групи по 10 голів у кожній. До I групи (контрольна) ввійшли клінічно здорові тварини; до II і III – хворі на токсичну диспепсію, яких лікували за традиційною терапевтичною схемою, а у разі останньої – додатково застосовували ліпосомальну форму 1 %-го розчину БАД «FLP-MD». Біодобавку випоювали хворим телятам з молоком раз на добу, вранці, з розрахунку 1 мл розчину на 1 кг маси за один прийом, яку продовжували застосовувати і в період реабілітації до 30-ї доби життя включно.

Традиційна схема лікування тварин включала патогенетичну терапію: напівголодна дієта на 6–12 год і випоювання теплого 1 %-го розчину натрію хлориду; у разі різко виражених явищ токсикозу – підшкірне введення розчинів електролітів у дозі 400–500 мл, випоювання відварів лікарських рослин, введення антибактеріальних препаратів тромексину і тіломіцину В та нутрилу Se (вітамінно-амінокислотної добавка з селеном) згідно з чинними інструкціями щодо їх використання. Ліпосомальна форма 1 %-го

розчину БАД «FLP-MD» включає різні класи фосфоліпідів, виділених з молока, ненасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева, ліноленова) та антиоксиданти (α -токоферол та ретинолу ацетат) [11]. Основними фосфоліпідами мембран жирових глобул молока є фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін і сфінгомієлін, які містять більше ніж 80 % загального ліпідного фосфору, а також фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол і лізофосфоліпіди, що виявляються у фосфоліпідних фракціях у незначній кількості. Фосфоліпідний склад біодобавки є подібним до плазматичних мембран печінки ссавців.

Зразки крові для визначення біохімічних показників відбирали у телят відразу після зникнення клінічних симптомів захворювання (на 7–8-му добу життя) і через 3 тиж після клінічного одужання (на 28–30-ту життя), що дало можливість простежити швидкість їх нормалізації та особливості змін залежно від схем лікування та функціонального стану печінки. Під час проведення експериментальних досліджень дотримувалися вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986), закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447 від 21.02.2006 р.

Для одержання плазми крові співвідношення об'ємів крові та стабілізатора становить 9:1. Як стабілізатор використовували 3,8 %-й розчин натрію цитрату. Кров центрифугували протягом 10 хв при 1200–1400 g. Функціональний стан печінки у дослідних тварин контролювали визначенням у плазмі крові низки біохімічних показників [12]: загального протеїну, альбуміну, глюкози, загального і кон'югованого білірубіну, активності гепатоспецифічних ензимів: аспартатамінотрансферази (АсАТ, ЕС 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, ЕС 2.6.1.2), γ -глутамілтранспептидази (γ -ГТП, ЕС 2.3.2.2), лужної фосфатази (ЛФ, ЕС 3.1.3.1) на біохімічному аналізаторі («Microlab-200», Німеччина). Підготовку

проб і визначення параметрів проводили згідно з інструкцією до приладу та з використанням реактивів фірми «Human» (Німеччина).

Для загальної характеристики основних компонентів коагуляційного гемостазу виконували скринінгові тести – активований частковий тромбoplastиновий час і протромбіновий час (ПЧ) [13]. Вміст фібриногену визначали, використовуючи тромбіноподібний фермент анцистрон-Н, виділений з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) [14]. Виявляли вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів [15]. Для визначення вмісту загального протромбіну та наявності його функціонально неактивної форми (декарбоксільованої) активацію протромбіну проводили тромбoplastином та ензимом екамуліном, отриманим з отрути ефи багатолускової (*Echis multisquamatus*) [16]. Екамулін на відміну від тромбoplastину здатен активувати і функціонально неактивні форми протромбіну. За різницею показників екамулінового часу (ЕЧ) і ПЧ оцінювали вміст функціонально неактивного протромбіну. Активність протеїну С визначали з використанням активатора протеїну С, отриманого з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) [17]. Активність антитромбіну III досліджували за інструкцією фірми «РЕНАМ» (Росія).

Результати експериментальних досліджень обробляли за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [18].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка гепатоспецифічних біохімічних показників крові. Проведений аналіз біохімічних показників виявив відсутність вірогідних змін вмісту загального протеїну плазми крові у тварин II групи відразу після клінічного одужання (табл. 1). У тварин III групи значення цього показника вірогідно зростали на 20 % (див. табл. 1). Встановлена у телят гіперпротеїнемія, ймовірно, є наслідком не тільки активації біосинтезу протеїнів у тканинах, а й визначеного нами раніше імуномодулювального впливу фосфоліпідів молока у формі БАД «FLP-MD» [19, 20]. Водночас у плазмі крові телят дослідних груп відсутні вірогідні зміни вмісту альбуміну (див. табл. 1, табл. 2), що свідчить про недостатню інформативність цього показника при діагностуванні порушень функціонального стану печінки за токсичної диспепсії.

Відразу після зникнення клінічних симптомів захворювання у телят II групи виявлено високу порівняно з контролем активність гепатоспецифічних ензимів: АлАТ – в 1,7, АсАТ – в 1,4, γ -ГТП – у 2,8, ЛФ – в 1,9 раза, що може свідчити про порушення функціонування гепатоцитів та наявність запального процесу в ендотелії жовчних протоків і паренхімі печінки. Зазначені порушення є менш вираженими у тварин III групи, для лікування яких додатково застосовували біодобавку: активність АлАТ і ЛФ підвищено однаково в

Таблиця 1. Біохімічні показники плазми крові у дослідних телят на 7–8-му добу життя ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контроль	Традиційна терапія	Традиційна терапія і введення біодобавки
Загальний протеїн, г/л	77,08 \pm 1,03	82,79 \pm 1,93	92,80 \pm 2,02*
Альбумін, г/л	42,2 \pm 1,9	41,0 \pm 1,1	41,7 \pm 2,7
Білірубін загальний, мкмоль/л	4,13 \pm 0,97	8,39 \pm 0,91*	3,95 \pm 0,30
Білірубін кон'югований, мкмоль/л	1,24 \pm 0,27	4,15 \pm 0,74*	2,31 \pm 0,15
Аланінамінотрансфераза, МО/л	16,7 \pm 1,2	27,8 \pm 2,4*	20,8 \pm 1,1*
Аспартатамінотрансфераза, МО/л	29,0 \pm 2,2	41,0 \pm 2,4*	28,5 \pm 2,0
γ -Глутамілтранспептидаза, МО/л	40,6 \pm 4,2	114,0 \pm 12,1*	46,3 \pm 3,8
Лужна фосфатаза, МО/л	361,7 \pm 13,5	677,5 \pm 21,6*	482,0 \pm 11,1*
Глюкоза, ммоль/л	3,5 \pm 1,1	7,4 \pm 0,7*	2,3 \pm 0,2

Примітка: тут і в табл. 3, 4 * $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою тварин.

1,3 раза. Відсутність істотних коливань активності АсАТ, ГГТП та незначні зміни активності АлАТ і ЛФ у телят цієї групи, очевидно, є результатом мембраностабілізуючого, репаративного та гепатопротекторного ефектів дії екзогенних фосфоліпідів біодобавки.

Гіпербілірубінемія і вірогідно високий (в 3,4 раза) порівняно з контролем вміст кон'югованого білірубину в плазмі крові телят II групи на 7–8-му добу життя підтверджує факт порушення жовчовидільної функції печінки в період зникнення клінічних симптомів розладів травлення (див. табл. 1). Концентрація загального білірубину в плазмі крові телят цієї групи відновлюється на 28–30-ту добу життя (див. табл. 2). Водночас відмічено відсутність у телят III групи розладів пігментної та взаємопов'язаної жовчоутворної і жовчовидільної функцій печінки. Підвищення вмісту глюкози (у 2,1 раза) у плазмі крові телят II групи на 7–8-му добу життя (див. табл. 1) може свідчити про адаптаційно-компенсаторні зміни нейроендокринної регуляції процесів її синтезу та утилізації в організмі дослідних тварин і, можливо, посилення інтенсивності глікогенолізу і глюконеогенезу в гепатоцитах. На 28–30-ту добу відмічено позитивну динаміку концентрації глюкози у плазмі крові телят II групи, що відображає поступовий процес їх одужання. Проте у дослідних тварин III групи не було виявлено

істотних змін концентрації глюкози як на 7–8-му, так і на 28–30-ту добу життя (див. табл. 1, 2), що характеризує відсутність глибоких порушень обміну вуглеводів в організмі телят при додатковому включенні у терапевтичну схему БАД «FLP-MD».

На 30-ту добу життя у телят II групи вірогідно знизилась активність частини досліджуваних ензимів порівняно з їх значеннями на 7–8-му добу життя, за винятком АсАТ. Останнє свідчить про недостатнє відновлення функціонального стану печінки у телят, яких лікували за традиційною схемою (див. табл. 2). Подовжений період підвищеної активності аспарагінової амінотрансферази є несприятливою ознакою, що може вказувати на перехід гострого процесу в хронічний.

У телят III групи біохімічні показники плазми крові відповідають контрольним значенням (див. табл. 2). Таким чином, згідно з отриманими результатами, можна зробити висновок, що за токсичної диспепсії телят для відновлення функціонального стану печінки ефективнішим є використання базової терапії у комплексі з БАД «FLP-MD».

Аналіз показників системи зсідання крові. Активність багатьох компонентів гемостазу залежить від функціонального стану печінки. Гепатоцити є основним місцем синтезу протеїнів системи зсідання крові та плазміногену – основного проферменту

Таблиця 2. Біохімічні показники плазми крові у дослідних телят на 28–30-ту добу життя ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Контроль	Традиційна терапія	Традиційна терапія і введення біодобавки
Загальний протеїн, г/л	66,80±3,02	56,20±2,11*	65,01±2,09
Альбумін, г/л	34,0±2,8	31,0±2,5	38,5±2,2
Білірубін загальний, мкмоль/л	2,76±0,11	3,13±0,06*	2,88±0,27
Білірубін кон'югований, мкмоль/л	0,61±0,08	1,14±0,16***	0,81±0,05**
Аланінамінотрансфераза, МО/л	16,6±2,6	17,2±0,5	16,1±0,8**
Аспартатамінотрансфераза, МО/л	40,6±2,4**	50,4±1,7***	41,5±2,8**
γ-Глутамілтранспептидаза, МО/л	29,5±3,5	46,8±2,8***	27,2±3,1**
Лужна фосфатаза, МО/л	322,0±2,4	451,3±9,6***	325,8±14,7**
Глюкоза, ммоль/л	5,30±0,16	4,84±0,12*	5,19±0,26

* $P < 0,05$ відносно контролю на 28–30-ту добу життя телят; ** $P < 0,05$, відносно відповідних значень показників у розрізі груп на 7–8-му добу життя телят.

системи фібринолізу. При захворюваннях печінки знижується інтенсивність не тільки синтезу вітамін К-залежних протеїнів, але й порушується посттрансляційне карбоксилювання залишків глутамінової кислоти Гладому факторів зсідання крові II, VII, IX, X, протеїнів C, S і Z. Такі декарбоксильовані форми вітамін К-залежних протеїнів називаються PIVKA-протеїнами (утворюються за відсутності вітаміну К). Вони не формують ензимні комплекси на поверхні ліпідного бішару мембран клітин за наявності іонів кальцію та втрачають здатність виконувати відповідні функції в системі зсідання крові. Водночас накопичення функціонально неактивних форм вітамін К-залежних протеїнів за розвитку патології печінки призводить до зниження прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові [8–11, 21].

Виявлене нами подовження часу зсідання плазми крові в тесті ПЧ і зниження протромбінового індексу (ПІ) може бути пов'язано з порушенням функціональної здатності гепатоцитів синтезувати протеїни та накопиченням у плазмі крові функціонально неактивної (декарбоксильованої) форми протромбіну й інших вітамін К-залежних факторів зсідання крові (табл. 3). Використання подвійного тесту (ЕЧ і ПЧ) сприяло встановленню в плазмі крові тварин II і III груп на 7–8-му добу життя

декарбоксильованої форми протромбіну, яка була у них відсутня вже у 30-добовому віці, що свідчить про поступове відновлення функціонального стану гепатоцитів. Швидкість зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбoplastиновий час і показники фізіологічних інгібіторів зсідання крові (активність протеїну C і антитромбіну III) відповідали контрольним значенням, що доводить про достатню сформованість механізмів підтримання стабільності системи зсідання крові.

На активацію системи зсідання крові та ймовірну загрозу розвитку тромбофілії у телят II і III групи вказує поява в плазмі крові на 7–8-му добу життя розчинних фібрин-мономерних комплексів. Подальший аналіз стану системи зсідання крові показав, що навіть на 30-ту добу життя зберігається їх високий вміст, що свідчить про необхідність лабораторного контролю на всіх етапах лікування тварин (див. табл. 3, 4).

Отже, в результаті комплексного аналізу біохімічних показників плазми крові і системи гемостазу в телят, які хворіли на диспепсію, встановлено наявність функціонального порушення печінки та біліарної системи, що проявляється розладами її метаболічної, протеїнсинтезувальної, пігментної та жовчовидільної функцій навіть через 3 тиж після клінічного одужання. При цьому

Таблиця 3. Показники стану системи гемостазу в плазмі крові дослідних телят на 7–8-му добу життя ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Контроль	Традиційна терапія	Традиційна терапія і введення біодобавки
Фібриноген, г/л	5,12±0,22	5,94±0,34	6,10±0,41*
Протромбіновий індекс, %	96,3±8,3	78,5±3,5	79,2±4,8*
Активований частковий протромбіновий час, с	62,3±5,4	62,0±2,0	68,1±3,4
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мкг/мл	0,01±0,001	0,015±0,0	0,025±0,003*
Протеїн C, %	101,0±8,3	103,3±4,4	103,0±7,1
Антитромбін III, %	100,2±5,4	89,0±2,0*	98,5±3,1
Тканинний активатор плазміногену, МО/мл	0,31±0,01	0,44±0,02*	0,28±0,03
Функціонально неактивні форми протромбіну, мкг/мл	0	2,4±0,1*	3,0±0,41*

Таблиця 4. Показники стану системи гемостазу в плазмі крові дослідних телят на 28–30-ту добу життя ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Контроль	Традиційна терапія	Традиційна терапія і введення біодобавки
Фібриноген, г/л	2,65±0,16	2,99±0,01*	2,70±0,27
Протромбіновий індекс, %	100,3±5,2	100,6±9,8	96,0±6,6
Активованний частковий протромбіновий час, с	45,5±1,4	42,0±7,5	45,6±2,8
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мкг/мл	0,008±0,0003	0,025±0,0	0,042±0,01*
Протеїн С, %	105,0±4,0	141,0±4,5*	145,7±8,1*
Антитромбін III, %	100,1±5,1	95,3±1,8	94,0±2,0
Тканинний активатор плазміногену, МО/мл	0,41±0,07	0,42±0,08	0,62±0,09*

найінформативнішими біохімічними індикаторами згаданих патологічних процесів є низка показників плазми крові: вміст загального та кон'югованого білірубіну, активність амінотрансфераз, γ -ГТП і ЛФ, а також наявність декарбоксилюваної форми протромбіну (схема). Визначення в плазмі крові функціонально неактивної форми протромбіну, як маркера порушення функціонального стану гепатоцитів, є необхідною умовою своєчасного призначення лікувальних засобів для усунення гепатопатології.

Аналіз показників системи гемостазу новонароджених телят, які перехворіли на токсичну форму диспепсії, виявив активацію системи

зсідання крові, ступінь якої слід контролювати на всіх етапах лікування для запобігання розвитку тромботичних ускладнень незалежно від схем лікування.

За допомогою комплексу біохімічних гепатоспецифічних показників плазми крові виявлено значну напруженість процесів метаболізму в тканинах телят, які перехворіли на ентеропатологію, та повільний характер їх відновлення. Дисфункція гепатоцитів і розлади в системі гемостазу свідчать про необхідність застосування таким тваринам засобів репаративної терапії, в тому числі, у період реабілітації. Це стимулює відновлення функціонального стану клітин, задіяних у



Комплексна оцінка функціонального стану печінки за ентеропатології телят

патологічний процес органів і тканин. Для вирішення цього питання може бути рекомендована фосфоліпидовмісна біодобавка БАД «FLP-MD», застосування якої значно покращує лікувально-профілактичний ефект традиційних схем терапії при її комплексному застосуванні під час клінічного прояву ентеропатології та у період реабілітації.

**В.А. Грищенко¹, Т.М. Чернышенко²,
О.В. Горницкая², Т.Н. Платонова²**

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПРИ ЭНТЕРОПАТОЛОГИИ ТЕЛЯТ

Проведен комплексный анализ гепатоспецифических биохимических показателей крови и системы гемостаза у телят, которые переболели энтеропатологией в 2–7-суточном возрасте. Использование комплекса тестов для оценки функционального состояния печени и терапевтических схем показало, что у животных этой группы по сравнению с контролем на 30-тые сутки жизни существенно повышена концентрация конъюгированного билирубина (в 1,6 раза), активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (в 1,2 раза), γ -глутамилтранспептидазы (в 1,5 раза) и щелочной фосфатазы (в 1,4 раза), а также содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов (в 4 раза). Такое отклонение указанных параметров от нормы свидетельствует о необходимости контроля за функциональным состоянием печени даже спустя 3 нед после клинического выздоровления животных. Для предотвращения развития вторичной гепатопатологии рекомендовано продолжение медикаментозной коррекции. Определено, что при токсической диспепсии новорожденных телят для восстановления функционального состояния печени в терапевтические схемы целесообразно включать фосфолипидсодержащую биодобавку «FLP-MD» как средство репаративной терапии, которую следует применять и в период реабилитации, до 30-суточного возраста включительно, что обеспечивает окончательное восстановление исследуемых показателей. Ключевые слова: гепатоспецифические биохимические показатели крови; система гемостаза; новорожденные телята; печень; токсическая диспепсия; реабилитация; терапевтические схемы; БАД «FLP-MD».

**V. A. Gryshchenko¹, T. M. Chernyshenko²,
O. V. Gornitska², T. M. Platonova²**

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF LIVER AND THE EFFICIENCY OF THERAPY FOR ENTEROPATHY OF CALVES

Comprehensive study of hepatospecific biochemical blood

markers and haemostatic system in calves which recovered from gastrointestinal pathology at age 2–7 days, was conducted. Implementation of a complex of tests for evaluation of the liver's functional state and the efficiency of therapeutic regimens shown that the experimental animals compared to control at the 30th day of life demonstrated significantly increased conjugated bilirubin concentration (1.6 times), aspartate- and alanin aminotransferase activity (1.2 times), gamma-glutamyl transpeptidase (1.5 times) and alkaline phosphatase (1.4 times), and content of soluble fibrin monomer complexes (4 times). Such deviation from the norm of the mentioned parameters of liver's functional state suggests the need to monitor the liver state even 3 weeks after their clinical health is confirmed. To prevent the development of secondary hepatopathy it is recommended to conduct further medical correction of the functional state of the liver. It is found that to stimulate recovery of liver function in case of toxic dyspepsia in newborn calves, it is advisable to implement a phospholipid containing supplement «FLP-MD» as a measure of reparative therapy till the animals are 30 days of life to ensure successful establishing of studied parameters.

Key words: hepatospecific biochemical blood markers; hemostatic system; newborn calves; liver; toxic dyspepsia; rehabilitation; therapeutic regimens; BAS «FLP-MD».

¹*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Melnychuk DO, Gryshchenko VA. The role of acid-base status and the milk phospholipids in formation of colostral immunity of newborn calves: edited by D.O. Melnychuk. Kyiv: CP "Komprint": 2015. [Ukrainian].
2. Ljubetska TV. Specific of metabolic adaptation calves of early postnatal period and correction disturbances [avtoreferat]. Kyiv: National Agrarian University; 2000. [Ukrainian].
3. Gryshchenko VA. Theoretical and applied aspects of application of reparative therapy on the basis of milk phospholipids at calves enteropathology. Kyiv: Vydavn. centr NAU: 2008. [Ukrainian].
4. Khomych VT, Gryshchenko VA. The effective influence of phospholipidcontaining bioactive substances on the ultrastructural changes in hepatocytes of calves, which had been ill with dyspepsia during the rehabilitation period. Mess Dnepr NAU. 2005;(1):82-5. [Ukrainian].
5. Levchenko VI, Zajarnjuk VP, Panchenko VI. Gastrointestinal disease of newborn calves. Voronezh: Izdat VGU: 1985. [Ukrainian].
6. Gryshchenko VA, Lytvynenko ON. Peculiarities of the bilious acid spectrum of bile and duodenal content in mice at medicamentous hepatitis and use of correction therapy. Ukr Biokhim J. 2007;79(4):97-101. [Ukrainian].
7. Volkov GL, Platonova NN, Savchuk AN, Gornitskaya

- OV, Krasnobryzhaya EN, Chernyshenko TM. Modern conception of hemostasis system. Kyiv: Naukova dumka: 2005. [Russian].
8. Lugovskoi EV, Makogonenko YM, Komisarenko SV. Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin. Kyiv: Naukova dumka: 2013. [Ukrainian].
 9. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ. Hematology: basic and practice. New York: Churchill Livingstone: 1995.
 10. Hryshenko VA, Tomchuk VA, Lytvynenko ON, Chernyshenko VO, Gryshchuk VI, Platonova TM. An estimate of protein synthesis in liver under induced hepatitis. Ukr Biokhim J. 2011;83(1):63-8. [Ukrainian].
 11. Melnychuk DO, Gryshchenko VA, Lytvynenko OM. Veterinary bioactive addition of liposomal form and method of reparative therapy in hepatology. Ukraine patent UA 200710252. 2009 Apr 27. [Ukrainian].
 12. Melnychuk DO, Tomchuk VA, Yanchuk PI, Gryshchenko VA, Reshetnyk EM, Synelnyk TB, Capenko PK, Kartyfuzova ZhV, Govorukha TM, Makarchuk MYu, Veselskyj SP. Research methods of liver and biliar system functional state. Kyiv: NUBiP Ukraine 2015: [Ukrainian].
 13. Dolgov VV, Svirin PV. Laboratory diagnostic of haemostasis disturbances. Tver: Izdat. "Triada": 2005. [Russia].
 14. Sokolovska A, Platonova T, Grinenko T, Chernyshenko T, Ivanenko T. Comparative characterization of the methods of determination of fibrinogen content in blood plasma. Exp Clin Physiol Biochem. 2002;3(3):82-6. [Ukrainian].
 15. Varetskaya TV, Mikhlovskaya LI, Svitalskaya LA, Yena YM. Blood plasma soluble fibrin determination. Klin Labor Diagn. 1992;(7/8):10-4. [Russian].
 16. Korolova DS, Vinogradova RP, Chernyshenko TM, Platonova TN, Volkov GL. Using the ecamulin – prothrombin activator from venom of *Echis multisquamatus* in clinical laboratory diagnostics. Lab. Diagn. 2006;3(37):18-22. [Russian].
 17. Platonova TM, Gornitska OV, Chernyshenko TM, Gryshchuk VI, Chernyshenko VO, Lugovskoi EV. Clinical significance of the determination of protein C level in diagnostics. Lab Diagn. 2013;3(65):3-7. [Russian].
 18. Kucherenko ME, Babenjuk YuD, Voitsytskyj VM. Modern methods of biochemical researches. Kyiv: Fitosociocentr: 2001. [Ukrainian].
 19. Gryshchenko VA. Biochemical and clinical explanations for application of milk phospholipids based remedy for reparative therapy of calves enteropathology [avtoreferation]. Kyiv: National Agrarian University; 2006. [Ukrainian].
 20. Gryshchenko VA, Tomchuk VA. I Immunomodulatory properties of liposomes based phospholipids milk with immunodeficiencies of animals. Nauk Vysnyk NUBiP Ukr. 2013; 188:4:107-15. [Ukrainian].
 21. Gryshchenko VA, Tomchuk VA, Lytvynenko OM, Chernyshenko VO, Platonova TM. Diagnostics and correction of coagulation disorders during the drug-induced hepatitis. Lab Diagn. 2010; 3(53):20-4. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до
редакції 11.05.2016*

Reparative processes in jaw bones under using of different plastic materials

Kh. R. Pohranychna

Danylo Halytsky Lviv National Medical University; e-mail: pohranychna@ukr.net

The comparative experimental study of osseous tissue regeneration in the created foraminous mandibular defects being implanted with bioceramics Kergap T-300 and osteoplastic material Osteopor, as well as justifying the possibility of using the developed reparative material in the maxillofacial surgery clinics based on the analysis of histomorphological research results for are the paper objectives. 78 nonlinear white male rats weighing 240-300 g with foraminous mandibular defects were used as models for studying impact on the reparative osteogenesis processes made by the bonegraft material. Reparative changes in the implantation sites were studied in real time with the help of histological drugs under the optical microscopy. The graft components were the morphometry object calculated at the percentage ratio per the graft space unit in three cuts from each section. In 27.7% cases the rats' mandibular defects repair under the natural environment conditions of osseous tissue regeneration achieved with a blood clot was complicated by purulence, the surgical wound dehiscence with pyorrhea or perimandibular abscess. In other cases regeneration caused the development of heterogeneous graft made of chondroid-fibroblastic and osteoid tissues of different organization levels. The comparative experimental morphological and histomorphometric studies of the bone regeneration involving the replacement of created jaw defects with osteoplastic material Kergap-T alone and in the combination with the lyophilized biological placenta implant Osteopor proved that the latter speeded up the beginning of active regenerative processes promoting the early defect filling with the neogenic organotypic osseous tissue comprising 52(43-63)[46-58]% and 74(57-85)[64-79]% of the bone graft in 60 and 90 days after the surgical intervention correspondingly (being equal to 24(13-29)[20-28]% i 32(27-38)[30-34]% correspondingly in cases when Kergap-T was applied. According to the morphometric research findings, in cases of Osteopor and Kergap-T application the tabular bone element of the graft was equal to 53 (43-60) [46-56]% and 15(13-18) [14-16]% correspondingly.

Key words: reparative osteogenesis; placenta tissue; bone grafting materials.

INTRODUCTION

The difficulties of osseous regeneration or replacement after surgical interventions resulted from tumours, gun shot injuries, traumas, osteomyelitis, cystic lesion and other maxilla pathologies are one of the most important issues having been studied in the maxillofacial surgery. Osseous tissue regeneration in postsurgical jaw gaps is a challenging process because of long-lasting neogenesis (in cases when the healing period is required to be reduced), frequent cases of incomplete osseous tissue recovery and relatively high frequency of purulent complications [1-3].

According to the tissue engineering theory the availability of relevant cells (osteogenic progenitor cells and osteoblasts), signal molecules assuring osteoinduction (activating growth factors, morphogenic proteins), matrix made of the osteoplastic material specifying the osseous tissue space and form, in other words the development of launch environment necessary for the well-disposed proliferation of osseous tissues and capillaries in the defined space are required for the goal-oriented osseous tissue regeneration.

The autogenous osseous tissue with the osteogenic, osteoinductive and osteoconductive potential is the gold standard for the bone

regeneration. As practice shows, despite the sufficient motivation the patients are reluctant to the reparative surgery being aware of the additional trauma inevitability. In the consideration of the foregoing, the maxillofacial surgeons have been in the recent years striving to optimize the reparative osteogenesis followed after the surgical intervention taking into account different factors among which the local application of various plastic stuff is predominant [4-7]. It is the authors' opinion that no universal osteoplastic material has been so far invented to be used in odontology for filling postsurgical bone gaps [8-10].

The search of appropriate implantation stuff widely used in the reparative maxillofacial surgery contributed to the application of the human placental cells being an easily available and economically advantageous biological material.

There is a great amount of collagen and yellow fibers in the placenta villus stroma at the end of pregnancy. Collagen is the main fibrillary protein containing amino acids actively engaged with cells promoting the reparative process. As far as osteoregeneration processes are similar with embryogenesis an idea of applying fetoplacental tissues for the plastic reconstruction of maxilla defects appeared [11].

Placenta is an active polyfunctional organ consisting of a great number of collagen fibres, synthesizing almost all hormones and over 40 fetal immunomodulating factors. It is a natural repository of vitamins, cytokines, peptides, α -fetoproteins, antioxidants, adaptogenes and other biologically active agents stimulating reparative regeneration processes [12]. Placenta is a producer of many growth factors: insulin-like growth factor – a well-known mitogen for stromal fibroblasts; placental growth hormone – the main regulation hormone of insulin-like growth factors; vascular endothelial growth factor involved in angiogenesis [13]. Adjusting to the microenvironment conditions and answering the local organ- and tissue specific regulating signals the placenta biological implant serves as a “reparative construction

material” performing morphogenesis function and recovering damaged structures [14]. A new compositional osteoplastic material Osteopor was made of (at the percent ratio) a double-phase porous bioceramics Kergap T-300 (55-60%), lyophilized placenta fragments (30-35%) and polymer blend consisting of polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone (5-10%) serving as a binding component. The declaration patent of Ukraine was obtained for the invention No. 67927A. No data was found in the literary sources about the research of the combined use of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) with placenta tissue for filling postsurgical maxilla defects.

The comparative experimental study of osseous tissue regeneration in the created foraminous mandibular defects being implanted with bioceramics Kergap T-300 and osteoplastic material Osteopor, as well as justifying the possibility of using the developed reparative material in the maxillofacial surgery clinics based on the analysis of histomorphological research results for are the paper objectives.

METHODS

78 nonlinear white male rats weighing 240-300 g with foraminous mandibular defects were used as models for studying impact on the reparative osteogenesis processes made by the osteoplastic material. The well-known standard method [15] was applied for conducting a surgery. Above abdominal anesthesia with 10% hexenalum solution at the rate of 0.6 mg hexenalum per 100 g of the animal's mass. Having achieved the periosteum detachment and bone surface baring by means of a dental drill a perforated foraminous defect of 5 mm in diameter was made in the rat's mandibular angle by applying a conical dental cutter with a restrictor.

Periosteum was resected over the gap space in order to exclude the impact of paraosseous tissues on osteogenesis. The implant material was inserted into the created bone defects. The experiment consisted of three sets. The bone

wound repair with a blood clot was observed in the first set of experiments (18 animals) being a test group. The double-phase bioceramics Kergap T-300 with the particle sizes of 0.25-0.40 mm was inserted into the rats' mandibular defects in the second set (30 animals). The newly elaborated ompositional osteoplastic material Osteopor was used for the third set of experiments (30 animals).

The animals were sacrificed by ether anesthesia overdosing on the 7th, 14th, 21st, 30th, 60th and 90th days. The jaw bone fragments with defects were removed, fixed in 10% neutral formalin solution, decalcified in 10% trilon B solution with the borate buffer (pH=7.2), dehydrated in the alcohols of increasing concentration and put in paraffin. Three histological sections of 10 mCIU thick were made by means of a microtome from each unit being stained in hematoxylin and eosin [16]. Reparative changes in the implantation sites were studied in real time with the help of histological drugs under the optical microscopy.

The received agents were investigated and taken micro photos by means of Leica Galen III microscope under 150 and 357 zooming. Histological studies were carried out to evaluate the graft structural organization and the osseous tissue enclosing the defect. Morphometric study was conducted with the application of spectacular inserts with measuring grids applied for cytohistostereometric research [17].

The graft components were the morphometry object calculated at the percentage ratio per the graft space unit in three cuts from each section. A big quadrate of the spectacular stereo logical grid containing 100 node points regarded as 100% of the graft square was the space unit. The spectacular grid points accidentally coinciding with the graft components were used to measure the volumetric percentage ratio of the osteoplastic material, connective and osseous tissues contained in the osseous graft allowing for the mathematical representation of the dynamic pattern in the course of the biological implant reconstruction.

The received numerical research findings were processed by means of the variation statistics method by means of the computer program STATISTICA for Windows 8.0 (Stat Soft, USA) used for medical and statistical computations.

RESULTS AND THEIR DISCUSSION

The special features of the osseous graft and new organotypic bone development in the created foraminous mandibular defects observed in rats from the experimental and control sets were compared by applying the histomorphological and morphometric methods. In 27.7% cases the rats' mandibular defects repair under the natural environment conditions of osseous tissue regeneration achieved with a blood clot was complicated by purulence, the surgical wound dehiscence with pyorrhea or perimandibular abscess. Having been revealed pyorrhea the animals were sacrificed. The remaining rats with no detected suppurative complications were observed the neutrophil leucocytic infiltration, intense macro- and microphagal detritus resorption up to 14-21 days after the surgery.

The development of cicatrical connective tissue, poor periosteal reaction manifested as the newly-made short and slightly winding bone trabeculas developed on the 21st – 30th days of the experiment and partial defect filling of the defect with the slightly differentiated chondroid and osteoid graft are the main evidence of the reparative processes in this experiment set (Table1).

Along with the development of the osseous tissue the osteogenic structures of which are of disordered orientation in the graft peripheral sites no complete neogenesis of bone architectonics was evident in the defects even in three months of the bone regeneration during the experimental set. The graft structure was of mosaic type with the osteoid osseous tissue interchanging the immature fungoid polymorphic structure. A complicated low differentiated graft of the mixed chondroid-osteoid type was developed (Figure 1).

Table 1. Morphometric characteristics of the rats' reparative regeneration of mandibular defects under the conditions of natural regeneration.

Day of observation	Regenerate composition (%): Me (min-max) [low-upper quartiles]					
	Blood clots, tissue detrite	Soft connective tissue	Osteoid connective tissue	Cartilage tissue	Rough-fiber bone tissue	Plate bone tissue
7	76 (72-80) [75-78]	24 (20-28) [22-25]	-	-	-	-
14	53 (48-58) [50-55]	39 (36-42) [38-40]	5 (4-6) [4-6]	4 (3-5) [4-4]	-	-
21	10 (7-13) [8-12]	74 (71-77) [73-75]	8 (6-10) [7-9]	6 (3-8) [5-8]	2 (1-3) [2-2]	-
30	-	69 (67-71) [68-70]	12 (9-15) [11-13]	8 (7-9) [7-9]	11 (9-14) [10-12]	-
60	-	40 (35-46) [37-43]	32 (29-35) [30-34]	4 (3-5) [3-5]	19 (17-21) [18-20]	5 (4-6) [4-6]
90	-	25 (23-27) [25-26]	39 (36-42) [37-40]	2 (1-3) [1-3]	25 (22-27) [24-26]	9 (7-11) [8-10]

The slow osteogenesis of defects achieved with a blood clot can be explained by the lack of the sufficient amount of cells, their poor density during the first and next regeneration stages and osteogenesis conditions unfavourable for osteogenesis, thus, confirming the necessity of replacing postsurgical defects with plastic materials in order to optimize osteoreparative processes.

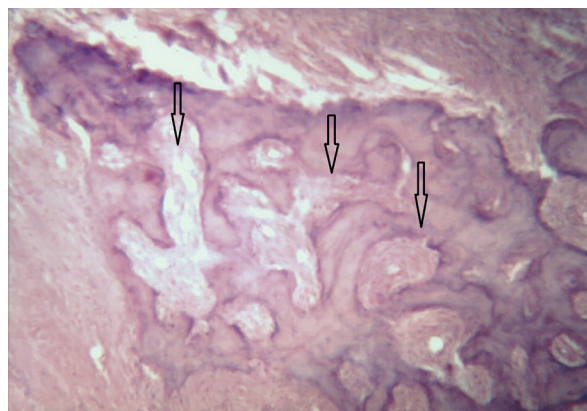


Figure 1. The bone defect filled with the neogenic osseous tissue of different maturity level and connective tissue. Haematoxylin and eosin staining. Zoom – 150. The 90th day of the experiment. Test group

Having analysed the results obtained in the 2nd and 3rd sets of the experiment some consistent patterns were revealed in the course of implantation material replacement. On the 14 day of observation in animals of the 3rd series capillary net in the regenerate have been developed. The optimization of the cellular fibroblast proliferation and differentiation, the osteoblastic tissue formation in the graft and its further reformation starting from the 14th day of the experiment were the characteristic features of the osseous tissue neogenesis (Table 2).

Presumable dynamics ($P < 0.05$) in terms of all morphometric aspects of osseous regeneration as compared to the previous sampling and between the both experimental animals groups was determined in the course of the study.

The comparison of the experimental findings gave us the grounds for stating about more active reparative regeneration in the created rats' mandibular defects filled with the compositional biological stuff Osteopor versus the defects filled with Kergap. As a result of the active resorption the osteoplastic material was comprising less than a half of the graft space in only three weeks

Table 2. Morphometric aspects of the rats' mandibular defects regeneration after their being replaced with Kergap T (K) and Osteopor (O) osteoplastic materials.

Day	Regenerate composition (%): Me (min-max) [low-upper quartiles]									
	Bonegraft material		Soft connective tissue		Osteoid connective tissue		Rough-fiber bone tissue		Plate bone tissue	
	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O
	85	73	12	19	2	7		1		
7	(82-88) [83-87]	(70-76) [71-75]	(10-13) [11-13]	(17-22) [18-20]	(1-5) [2-5]	(5-9) [6-8]	-	(0-2) [1-1]	-	-
	77	60	16	22	6	12	1	6		
14	(74-80) [75-79]	(57-63) [58-62]	(15-17) [15-17]	(19-25) [20-24]	(4-8) [5-7]	(9-15) [10-14]	(0-2) [1-1]	(4-8) [5-7]	-	-
	66	44	18	26	11	17	5	9		4
21	(63-69) [64-68]	(41-47) [42-46]	(15-21) [16-20]	(18-28) [19-28]	(8-14) [8-14]	(14-20) [15-19]	(3-7) [3-7]	(7-14) [8-13]	-	(3-7) [4-7]
	55	32	17	15	14	22	9	17	5	14
30	(52-58) [53-57]	(29-35) [30-34]	(14-20) [16-19]	(12-19) [13-17]	(12-16) [13-15]	(19-25) [20-24]	(6-12) [7-11]	(14-20) [15-19]	(3-7) [3-7]	(12-16) [13-15]
	43	18	16	9	17	21	14	22	10	30
60	(40-47) [41-44]	(15-21) [16-20]	(14-18) [15-17]	(7-14) [8-13]	(14-20) [16-19]	(14-25) [18-23]	(12-16) [13-15]	(19-25) [20-24]	(1-13) [7-13]	(24-38) [26-34]
	38	5	13	6	17	18	17	21	15	53
90	(35-40) [37-39]	(4-6) [5-5]	(11-15) [12-14]	(5-7) [5-7]	(14-20) [16-19]	(15-21) [16-20]	(14-20) [16-18]	(14-25) [18-23]	(13-18) [14-16]	(43-60) [46-56]

following the surgery with the application of Osteopor. For 60 days - loose and instant masses of composite material were imbued with osteoid tissue full of capillaries.

The closure of the bone trabecular grid having been developed in the soft connective tissue resulted in the early formation of rough fibrous osseous tissue and spongy structure. Later it underwent the oppositional growth with osteoblasts playing the main role, forming new osseous tissue layers and making a sheet structure. The newly formed bone mineralization was accomplished due to the physical and chemical reprecipitation of calcium and phosphate having been released from the implant material and due to the osteoblasts.

The neogenic rough-fiber and plate bone tissue elements were comprising 52 (43-63)[46-58]% and 74 (57-85)[64-79]% of the bone graft in 60 and 90 days after the surgical intervention

correspondingly. In cases of Kergap-T application it was equal to 24 (13-29)[20-28]% and 32 (27-38)[30-34]% correspondingly. In cases of "Osteopor" application the plate bone element of the graft was comprising 53 (43-60)[46-56]% by the end of the experiment while the use of Kergap-T resulted only in 15 (13-18)[14-16%].

By the end of the experiment the latter comprised 1/3 of the graft space which was equal to 38 (35-40)[37-39]% being hidden in the osseous tissue. Consequently, according to the morphometric research, the osseous tissue development, maturing and secondary reconstruction of osseous structures, as well as biodegradation of composite material substances were faster and the maturity of the osseous tissue was observed by the end of the experiment in the group of animals with the Osteopor used for filling the created bone defects (Figures 2a, 2b).

Figure 2a) The enlargement of osseous graft with the hidden Kergap-T granules

Figure 2b) Neogenic osseous tissue with the evidence of compaction

This resulted from the intense reparative osteogenesis developed under the conditions of constant engagement with the composition material implanted into the bone defect. High porosity of the material simplified the fast implant revascularisation, as well as the migration and proliferation of osteoplastic peripheral blood cells and the surrounding loose connective tissue. Being a biologically active material Osteopor promoted angiogenesis, migration, the attachment of stromal cells, their differentiation into osteoblasts and further reparative osteogenesis.

At that, osteogenesis was developing in two directions: from the periphery towards the center due to the proliferation of spongy mandibular osteoblasts and from the central cavity area towards the periphery being the result of the neogenic bone trabeculas newly formed in the loose connective tissue and presented as “spot osteogenesis” areas. The latter was not observed in cases when Kergap-T was applied.

SUMMARY

The repair of created foraminous mandibular defects achieved with a blood clot in the

course of the experiment was complicated with the defect stuff purulence (in 27.7% cases). In other cases regeneration caused the development of heterogeneous graft made of chondroid-fibroblastic and osteoid tissues of different organization levels. The comparative experimental morphological and histomorphometric studies of the bone regeneration involving the replacement of created jaw defects with osteoplastic material Kergap-T alone and in the combination with the lyophilized biological placenta implant Osteopor proved that the latter speeded up the beginning of active regenerative processes promoting the early defect filling with the neogenic organotypic osseous tissue.

The availability of lyophilized placenta fragment (LPF) in the osteoplastic material promoted HA (hydroxyapatite) and TCP (tricalcium phosphate) bioresorption, fast development and mineralization of the osseous graft. Osteopor proved to have osteogenesis promoting properties due to the following aspects of the implant elements: 1) lyophilized placenta fragments (LPF) being the source of biologically active agents, in particular, polypeptide osteogenesis factors, serve as the inducers for the osteoblastic cell population and for the secretion of bone matrix proteins; LPF assure microenvironment favourable for osteogenesis,

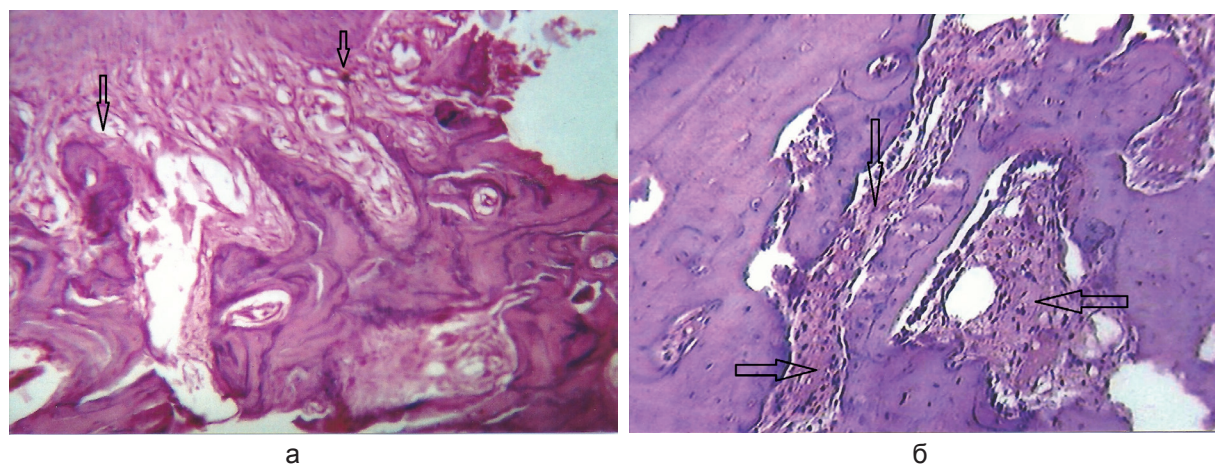


Figure 2. the 90th day of the experiment. The bone defect filled with Kergap (a) and Osteopor (b). Haematoxylin and eosin staining. Zoom – 150

intercellular fluid diffusion and fast graft vascularization; 2) activating proliferation of fibroblasts and their biosynthetic function the placenta collagen promotes collagen development; 3) depositing and restraining the osteogenetic cell material Kergap-T serves as a frame gradually reabsorbing and being replaced with the normal osseous tissue. Kergap-T assures the neogenic bone mineralization due to the physical and chemical reprecipitation of calcium and phosphate having been released from the implant material.

Consequently, according to the experimental study findings the offered composition plastic material Osteopor was proved to have osteoinductive and osteoconductive effects assuring the development of a compact osseous tissue. Thus, it is recommended for the clinical use as an osseointegrated implant effective for the stimulation of reparative osteogenesis in the wound jaw defect area.

Х.Р.Пограничная

РЕПАРАТИВНІ ПРОЦЕСИ ЩЕЛПНИХ КІСТОК ПРИ ЗАСТОСУВАННІ РІЗНИХ ОСТЕОПЛАСТИЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Метою нашої роботи було вивчення у порівняльному аспекті в експерименті процесів регенерації кісткових тканин у штучних дірчастих дефектах нижньощелепних кісток при імплантації в них біокераміки Кергап Т-300 та остеопластичного матеріалу Остеопор, та на основі аналізу результатів гістоморфологічних досліджень обґрунтувати можливість застосування розробленого нами пластичного матеріалу в клініці щелепно-лицевої хірургії. Вплив пластичного матеріалу на репаративні процеси остеогенезу вивчали на моделі дірчастих дефектів нижньої щелепи у 78 лабораторних білих щурів. Гістологічні дослідження проводили для оцінки структурної організації регенерату і стану кісткової тканини, що оточувала дефект. Об'єктом морфометрії були складові компоненти регенерату, які підраховувалися у відсотковому відношенні на одиницю площі регенерату в трьох зрізах кожного блоку. Загоєння штучно утворених дірчастих кісткових дефектів нижньої щелепи в експерименті під кров'яним згустком у 27,7% ускладнювалося нагноєнням вмісту дефекту. В інших випадках регенерація призводила до утворення неоднорідного регенерату з хондрофібробластичної та остеοїдної тканин на різних стадіях організації. Порівняльні експериментальні морфологічні та гістоморфометричні

дослідження регенерації кістки при заміщенні штучно утворених кісткових дефектів щелеп остеопластичним матеріалом Кергап Т самостійно і в композиції з ліофілізованим біоімплантатом з плаценти – Остеопором показали, що останній прискорює початок активних процесів регенерації, сприяє ранньому заповненню дефекту новоутвореною органотиповою кістковою тканиною, яка через 60 діб після операції становила 52(43-63)[46-58]%, а через 90 – 74(57-85)[64-79]% кісткового регенерату, тоді як при застосуванні матеріалу Кергап Т –24(13-29) [20-28]% і 32(27-38)[30-34]% відповідно. Морфометричні дослідження засвідчили, що при застосуванні Остеопору частка пластинчастої кістки в регенераті до кінця експерименту становила 53 (43-60) [46-56]%, в той час, як при застосуванні Кергапу Т - 15(13-18) [14-16]%. Ключові слова: репаративний остеогенез; плацентарна тканина; кістково-пластичні матеріали.

Х.Р.Пограничная

РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЧЕЛЮСТНЫХ КОСТЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ПЛАСТМАСС

Целью нашей работы было изучение в сравнительном аспекте в эксперименте процессов регенерации костных тканей в искусственных дырчатых дефектах нижнечелюстных костей при имплантации в них биокерамики Кергап Т-300 и остеопластического материала Остеопор, и на основе анализа результатов гистоморфологических исследований обосновать возможность применения разработанного нами пластического материала в клинике челюстно-лицевой хирургии. Влияние пластического материала на репаративные процессы остеогенеза изучали на модели дырчатых дефектов нижней челюсти у 78 лабораторных белых крыс. Гистологические исследования проводили с целью оценки структурной организации регенерата и состояния костной ткани, окружавшей дефект. Объектом морфометрии были компоненты регенерата, которые подсчитывались в процентном отношении на единицу площади регенерата в трех срезах каждого блока. Заживление искусственно образованных дырчатых костных дефектов нижней челюсти в эксперименте под кровяным сгустком в 27,7% осложнялось нагноением содержания дефекта. В других случаях регенерация приводила к образованию неоднородного регенерата с хондрофибробластичной и остеοидной тканей на разных стадиях организации. Сравнительные экспериментальные морфологические и гистоморфометрические исследования регенерации кости при замещении искусственно созданных костных дефектов челюстей остеопластическим материалом Кергап Т самостоятельно и в комбинации с лиофилизированным биоимплантатом из плаценты - Остеопором показали, что последний ускоряет начало активных процессов регенерации, способствует раннему заполнению дефекта новообразованной органотипических костной тканью,

которая через 60 сут после операции составляла 52 (43-63) [46-58]%, а через 90 - 74 (57-85) [64-79]% костного регенерата, тогда как при применении материала Кергап Т - соответственно 24 (13-29) [20-28]% и 32 (27-38) [30-34]%. Морфометрические исследования свидетельствуют, что при применении Остеопора доля пластинчатой кости в регенерате к концу эксперимента составляла 53 (43-60) [46-56]%, в то время, как при применении Кергап Т - 15 (13-18) [14-16]%.
 Ключевые слова: репаративный остеогенез; плацентная ткань; костно-пластиченкие материалы.

REFERENCES

1. Rubio ED, Mombrú CM. Spontaneous bone healing after cysts enucleation without bone grafting materials: a randomized clinical study. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2015;8(1):14-22.
2. Tee B, Desai G, Sonnichsen B. Reconstructing jaw defects with MSCs and PLGA-encapsulated growth factors *J Transl Res.* 2016; 8(6): 2693–2704.
3. Zhao JH, Tsai CH, Chang YC. Management of radicular cysts using platelet-rich fibrin and bioactive glass: a report of two cases. *J Form Med Assoc.* 2014;113(7):470-6.
4. Pavlenko OV, Dmitriyeva YE. Morphological bases of choice of bone graft materials in parodontology. *Morphology.* 2011; 5(1):5–12. [Ukrainian].
5. Wagdargi SS, Rai KK, Arunkumar KV, Katkol B. Evaluation of Spontaneous Bone Regeneration after Enucleation of Large Cysts of the Jaws using Radiographic Computed Software. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17(6):489-95
6. Vovk V, Vovk Y. Clinically-biometric and x-ray densitometry assessment tissue defects alveolar processes of the jaws during their bone tissue regeneration. *Dentalnews.* 2012; 4:36-44.
7. Kattimani VS, Chakravarthi PS, Prasad LK. Biograft Block: A Ray of Hope in the Reconstruction of Maxillofacial Defects. *J Craniofac Surg.* 2016;27(1):247-52.
8. Hertsen Y. Experimental aspects combinative plastics of cavity defects using different compelex materials on the basis of hydroxyapatite. *Chronicl Traumatol and Orthoped.* 2014; 1(2):85-87.
9. Mysula I, Skochylo O. Bone-plastic materials for the replacing of jaw defects: from the past to the present *Hosp Surg.* 2013;3:97-101.
10. Makeyev V, Siryi O, Cherpak M, Slipyi V. Comperative experimental evaluation of reparative osteogenesis of jaw bone defects filled in by different osteoplastic biografts. *Dentalnews* 2010; 1:42–45.[Ukrainian].
11. Murphy BF, Brandley MC, Murphy CR, Thompson MB. Morphology and development of the placenta. *J Anat.* 2012; 220(5): 454–71.
12. Hryshchenko V, Shcherbyna N, Tanko O, Potapova L, Kuzmina I. Fetal, cell and tissue therapy: results and perspectives of application. *Obstet Gynecol.* 2001; 2: 6-8. [Russian].
13. Hryshchenko V, Holtsev A. Transplantation of the embrioplacental complex. *Probl Cryobiol.* 2002; 1:54-64. [Russian].
14. Hryshchenko V, Holtsev A. Modification of lymphohemopoetic complex of the organism in conditions of fetoplacental products complex application. *Transplantology* 2001;3: 5. [Russian].
15. Luzin V. Method of bone defects modeling in laboratory animals. *Ukr Med Almanc.* 2005; 8(2):162.[Ukrainian].
16. Sarkisov D, Perov Y. Microscopical technique Moscow: Medicine 2006; 542p. [Russian].
17. Avtandilov H. Medical morphometry. Moscow: Medicine 2010;383p. [Russian].

Received: 02.09.2016

Оцінка функціональних змін сльозопродукції під дією очних крапель на основі природної молекули ектоїну та штучної сльози у хворих на синдром сухого ока на тлі ендокринної офтальмопатії

Н.М. Веселовська, І.Б. Жеребко

Київський медичний університет УАНМ;

Київський міський офтальмологічний центр КМКЛ № 1; e-mail: nnvesel@gmail.com

Проведено порівняльний аналіз функціональних змін сльозопродукції у хворих на синдромом сухого ока (ССО) та ендокринною офтальмопатією в умовах тривалої дії безконсервантного медикаментозного засобу на основі природної речовини. Обстежені 30 осіб віком від 35 до 53 років з клінічними проявами ССО на фоні ендокринної офтальмопатії, які були розподілені на дві групи. Обстеженням I групи призначали очні краплі на основі природної молекули ектоїну, а II – сльозозамінники. Обстеження включало загальні та спеціальні (показники сльозопродукції, час розриву слізної плівки, сумарна сльозопродукція - тест Ширмера I) методи дослідження. Термін спостереження - 30 діб. Встановлено, що тривале застосування очних крапель на основі ектоїну призводить до більш виразних позитивних змін у стані поверхні ока та показниках сльозопродукції (збільшення часу розриву сльозової плівки, сумарної сльозопродукції та проби Ширмера I у більшій кількості осіб за рахунок відновлення якості сльозової плівки та відсутності консерванта, аніж після застосування сльозозамінників.

Ключові слова: синдром сухого ока; подразнення, ендокринна офтальмопатія; природна молекула ектоїну.

ВСТУП

Останнім часом синдром сухого ока (ССО) набуває значної поширеності в Україні і в світі. Клінічні прояви цього захворювання коливаються від поверхневого подразнення ока до значних трофічних порушень рогівки з погіршенням або повною втратою зору. В патогенезі ССО головну роль відіграють порушення з боку сльозової плівки як внаслідок зменшення секреції сльози, так і в результаті надмірного випаровування вологи з поверхні ока. Відомо, що сльозова рідина формує на поверхні ока слізну плівку, яка виконує низку найважливіших функцій, в тому числі трофічну, захисну й оптичну. Сучасні методи мас-спектрометрії та ядерно-магнітного резонансу дали змогу визначити важливу роль зовнішньо розташованого ліпідного

© Н.М. Веселовська, І.Б. Жеребко

шару сльозової плівки у забезпеченні її стабільності та нормального випаровування вологи, у збереженні фізіологічного рівня термоізоляції поверхні ока та якості оптичної поверхні рогівки. За отриманими даними відмінності ліпідного складу сльози у хворих на ССО, а саме зниження співвідношення полярних і нейтральних ліпідів та збільшення жорсткості ліпідного шару сльозової плівки призводять до передчасного розриву слізної плівки та порушення її бар'єрної функції [1–7]. Нині встановлено, що відновлення ліпідного шару, порушення якого спостерігається майже у 2/3 хворих на ССО та у переважній більшості хворих на ендокринну офтальмопатію, є вкрай важливим для нормалізації зволоженості та трофіки поверхні ока [8–11]. Враховуючи підвищену

чутливість тканин ока, особливо у хворих на ССО до деяких фармакологічних засобів, значну перевагу в схемі лікування все більш віддають препаратам на основі природних за походженням діючих речовин та препаратам без або з мінімальним вмістом консерванта [1,2–4,6,7]. Сучасний арсенал засобів для лікування ССО розширено очними краплями на основі природної молекули ектоїну, що мають властивості відновлювати ліпідний склад ліпідного шару та стабільність слъозової плівки, запобігаючи прогресуванню ССО.

Мета нашого дослідження провести порівняльний аналіз функціональних змін слъозопродукції у хворих на ССО та ендокринною офтальмопатією в умовах тривалої дії безконсервантного медикаментозного засобу на основі природної речовини ектоїну.

МЕТОДИКА

Обстеження включало передню біомікроскопію та дослідження функціонального стану слъозопродукції з визначенням якості слъозової плівки за показниками флюоресцеїнового тесту, часу розриву слізної плівки та сумарної слъозопродукції (тест Ширмера І). Під наглядом знаходилися дві групи пацієнтів по 15 жінок (30 очей) у кожній віком від 35 до 53 років з клінічними проявами ССО на фоні ендокринної офтальмопатії легкого ступеня. У хворих І групи було призначено очні краплі штучної слъози 3–4 рази на день, ІІ групи - очні краплі на основі ектоїну (EYE-t® 0,5% Ektoin, “Farmaplant”) 3–4 рази на день протягом 30 днів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До лікування хворі обох груп відмічали відчуття стороннього тіла і дискомфорт в очах. Стан передньої поверхні ока відповідав легкому ступеню захворювання ССО: гіперемія з потовщенням кон'юнктиви очного яблука та нижньої повіки без патологічних змін поверхні рогівки та незначний секрет

пінистого характеру. До призначення лікування в обох групах проба Ширмера І була в інтервалі 4,0–10,0 мм, а час розриву слізної плівки коливався у межах 4–7 с.

По завершенні лікування, незважаючи на збереження клінічних проявів ендокринної офтальмопатії, всі хворі суб'єктивно відмічали значне покращення та зменшення скарг на подразнення та гіперемію очей, що було підтверджено даними офтальмоскопії. За результатами кінцевого обстеження кількість осіб з позитивними змінами в обох групах була не однаковою: в І групі число таких хворих збільшилося до 60% (9 з 15 осіб); в ІІ групі їх кількість була на рівні 93 %, що на 33 % більше, ніж у І групі. Разом з цим у ІІ групі 6 з 15 хворих (40 %) відмічали одужання та відчуття повного комфорту з боку очей. При визначенні сумарної слъозопродукції було встановлено більш істотне покращення у всіх хворих з ІІ групи, які протягом 30 діб вживали очні краплі на основі ектоїну: збільшення слъозопродукції на 2,5 мм, зростання інтервалу значень проби Ширмера І в межах 6,0 – 12,0 мм та виміру часу розриву слъозової плівки в межах 6–11 с. В осіб з І групи, де за таким самим режимом застосовували препарати штучної слъози, зміни зазначених показників були меншими: зростання слъозопродукції на 2,0 мм при збільшенні інтервалу значень проби Ширмера І в межах 5,0 – 11,0 мм, а часу розриву слізної плівки в межах 5,0 – 10 с (таблиця).

За результатами опитування, пацієнти з групи ІІ спостерігали добру переносимість очних крапель на основі природної молекули ектоїну (EYE-t Ektoin 0,5 %).

Отримані результати свідчать про певні позитивні зміни слъозопродукції під впливом ектоїну, що позначилося у збільшенні слъозопродукції, покращенні якості та стабільності слъозової плівки у хворих ІІ групи. У них також спостерігали зменшення симптомів подразнення з боку передньої поверхні ока, а у 40% осіб – взагалі відсутність гіперемії кон'юнктиви. На наш погляд більш виражені позитивні зміни у хворих ІІ групи

Порівняльний аналіз результатів дослідження

Показники	Групи обстежених хворих			
	Вихідні значення		По закінченні дослідження	
	Група I (краплі штучної слюзи)	Група II (краплі на основі ектоїну)	Група I (краплі штучної слюзи)	Група II (краплі на основі ектоїну)
Тест Ширмера I, мм	4,0 - 10,0	4,0 - 10,0	5,0-11,0	6,0-12,0
Час розриву слізної плівки, с	4,0 - 7,0	4,0 - 7,0	5,0-10,0	6,0-11,0

після тривалого застосування очних крапель на основі ектоїну порівняно з обстеженням та опитуванням хворих I групи, які вживали зволожуючі препарати штучної слюзи, можна пояснити як певним покращенням структури шарів слюзової плівки, зокрема шару ліпідів внаслідок відновлювальної дії ектоїну, так і зменшенням подразнювального впливу очних крапель за відсутності консерванту. Про це свідчить покращення тесту Ширмера I та часу розриву слізної плівки. Відомо, що молекули ектоїну є продуктом життєдіяльності аеробних хемогетеротрофних, галофільних та галотолерантних бактерій в екстремальному за температурою, рівнем вологості та солоності середовищі. За цих умов ектоїн набуває особливих біохімічних властивостей стосовно ліпідного шару слюзової плівки, а застосування очних крапель на основі ектоїну патогенетично обґрунтовано як зволожувальний засіб, так і для покращення функціонального стану поверхні ока за рахунок відновлення ліпідного шару.

Н.Н. Веселовская, И.Б. Жеребко

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛЕЗОПРОДУКЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОЙ МОЛЕКУЛЫ ЕКТОИНА И ИСКУССТВЕННОЙ СЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ СУХОГО ГЛАЗА НА ФОНЕ ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ

Проведен сравнительный анализ функциональных изменений слезопродукции у больных с синдромом сухого глаза (ССГ) и эндокринной офтальмопатией

в условиях длительного действия безконсервантного медикаментозного средства на основе природного вещества. Обследованы 30 человек в возрасте от 35 до 53 лет с клиническими проявлениями ССГ на фоне эндокринной офтальмопатии, которые разделены на две группы. Пациентам I группы назначали глазные капли на основе природной молекулы эктоина, а II – слезозаменители. Обследование включало общие и специальные (показатели слезопродукции, время разрыва слезной пленки, суммарная слезопродукция - тест Ширмера I) методы исследования. Срок наблюдения - 30 сут. Установлено, что длительное применение глазных капель на основе эктоина приводит к более выраженным положительным изменениям в состоянии поверхности глаза и показателях слезопродукции (увеличение времени разрыва слезной пленки, суммарной слезопродукции и пробы Ширмера I) у большего количества лиц за счет восстановления качества слезной пленки и отсутствия консерванта, чем после применения слезозаменителей. Ключевые слова: синдром сухого глаза; раздражение; эндокринная офтальмопатия; природная молекула эктоина.

N.N. Veselovskaya, I.B. Zherebko

ASSESSMENT OF FUNCTIONAL CHANGES TEAR PRODUCTION UNDER THE ACTION OF THE EYE DROPS ON THE BASE OF NATURAL MOLECULE OF ECTOINE AND ARTIFICIAL TEARS IN PATIENTS WITH DRY EYE SYNDROME ON THE BACKGROUND OF ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY

Conducted a comparative analysis of functional changes in tear production in patients with dry eye syndrome and endocrine ophthalmopathy in the conditions of the long-term acting of preservative free medications based on natural substances. A total of 30 people, aged 35 to 53 years old with clinical manifestations of DES on the background of EO were divided on two groups. In I group eye drops of ectoine and in II – artificial tears were administered. The examination included general and specific methods. The term of follow up - 30 days. It was found that long-term use of preservative free eye drops

based on ectoine leads to more expressive positive changes in the condition of the anterior surface of the eye and the secretion and quality of the tear.

Key words: endocrine ophthalmopathy; dry eye syndrome; irritation; natural molecule of ectoine.

Kyiv Medical University UAFM;

Kyiv City Eye Center; KCH №1

REFERENCES

1. Veselovskay ZF, Veselovskay NN. New approaches to pharmacotherapy of allergic eye diseases. INTSCI and PRACT J «Ophthalmology». 2015; (1): 18. [Russian].
2. Zabegaylo AO, Polunin GS, Polunina YeG, Kasparova YeA. Modern ideas about blepharoconjunctival form of dry eye syndrome. J Ophthalmol. 2007; (2): 45. [Russian].
3. Gallinski EA, Pfeiffer HP, Truper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid-a novel cyclic amino-acid from halophilic phototrophic bacteria of genus Ectothiodospira. Eur J Biochem. 1985; (149): 135.
4. Marube J, Nemeth J, Hoh K. The triple classification of dry eye for practical and clinical use. Eur J Ophthalmol. 2005; (15): 660.
5. Shine WE, McCulley JP. Keratoconjunctivitis sicca associated with meibomian secretion polar lipid abnormality. Arch Ophthalmol. 1998; (116): 849.
6. Dews Membership. Report of the International Dry Eye Workshop (DEWS). Ocul Surf. 2007; (5): 65.
7. Wollensak G, Mur E, Mayr F, Baier G. Effective methods for the investigation of human tear lipids. Chem and Phys Lipid. 2007; (147): 87.
8. Brzheskiy VV, Somov YeYe. Kerato-conjunctival xerosis (clinic, diagnostics, treatment), 2003.- 120 p. [Russian].
9. Brovkina AF, Panteleeva OG. Prevention and treatment of the syndrome of "dry eye" with endocrine ophthalmopathy Dry eye syndrome. Special edit Moscow Associat Ophthalmol. 2003. -№4. - P. 21. [Russian].
10. Drozhzhina GI, Troychenko LF. New possibilities of substitution of the lipid layer of the tear film. J Ophthalmol. 2015; (3): 13 p. [Russian].
11. Rantamäki AH, Seppänen-Laakso T, Oresic M. Human tear fluid lipidome: from composition to function. PloS One. 2011; (6). doi: 10.1371/journal.pone.0019553.

*Матеріал надійшов до
редакції 01.09. 2016*

VII конгрес наукового товариства патофізіологів України

5-7 жовтня 2016 р. у м. Харків на базі Національного фармацевтичного університету відбувся VII Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», який був присвячений пам'яті першого президента Наукового товариства патофізіологів України у незалежній державі - академіку НАН України Олексію Олексійовичу Мойбенку. В організації конгресу взяли участь Національна академія наук України, Національна академія медичних наук України, Міністерство охорони здоров'я України, Наукове товариство патофізіологів України, Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Національний фармацевтичний університет та Харківський національний медичний університет. Конгрес проходив під девізом інтеграції патофізіологічної та фармацевтичної науки.

У роботі конгресу взяли участь 250 учасників (з них 64 – делегати з правом голосу) від 13 областей України, в тому числі ректори медичних вищих наукових закладів, директори науково-дослідних інститутів, завідувачі профільних кафедр, голови обласних патофізіологічних товариств, провідні спеціалісти кафедр медичних вузів, науково-дослідних інститутів та установ. Серед присутніх були 1 член ради міжнародного товариства патофізіологів (проф. А.В. Кубишкін), 3 акад. НАНУ та НАМНУ, 3 чл.-кор. НАНУ, НАМНУ та НААНУ, 35 докторів наук, 62 кандидати наук.

Науковий форум відкрив в.о. президента Наукового товариства патофізіологів України, академік НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резніков. На адресу конгресу надійшли вітання від Комітету Верховної Ради України з питань

охорони здоров'я за підписом О.В. Богомолець та від президента Національної академії медичних наук України акад. В.І. Цимбалюка. З вітаннями та побажаннями плідної роботи звернулися директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, академік-секретар відділення біохімії, фізіології та молекулярної біології НАН України, акад. НАН і НАМН України С.В. Комісаренко, в.о. начальника управління охорони здоров'я Харківської обласної державної адміністрації Г.М. Сіроштан, ректор Національного фармацевтичного університету, акад. НАН України В.П. Черних, проректор з наукової роботи Харківського національного медичного університету проф. В.В. М'ясоєдов та генеральний секретар Українського фізіологічного товариства, д.б.н. Л.М. Шаповал.

На відкритті конгресу присутні вшанували пам'ять академіка НАН України О.О. Мойбенка, який протягом 23 років був президентом Наукового товариства патофізіологів України. З доповіддю «Мойбенко О.О. - життя в ім'я науки» виступив чл.-кор. НАН України В.Ф. Сагач. У пленарній доповіді академіка НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резнікова «Актуальний аспект патофізіології: епігенетичне програмування вродженої патології» підкреслена суттєва роль пренатальних патогенних чинників у розвитку епігенетично зумовлених функціональних розладів нейроендокринної та інших фізіологічних систем. Великий інтерес викликала доповідь акад. НАНУ В.П. Черниха «Безпека ліків – камертон фармації», в якій була розгорнута сучасна картина досліджень з мінімізації ризиків при застосуванні ліків на основі поглиблення знань про механізми їх дії. Привернули увагу учасників конгресу

пленарні доповіді провідних учених проф. Ю.М. Колесника «Ремоделивання міокарда при артеріальній гіпертензії та цукровому діабеті: структурно-функціональні молекулярно-генетичні аспекти», акад. НАН України А.М. Гольцева «Патологічні фактори розвитку аутоімунних захворювань. Сучасні підходи до їх лікування», проф. А.І. Гоженка «Сучасна теорія хвороби: стан та перспективи», проф. А.В. Кубишкіна «Патогенетичні взаємозв'язки при формуванні основних синдромів критичних станів», чл.-кор. НАМН України проф. О.М. Пархоменка «Клінічна патофізіологія у практиці невідкладної кардіології - пам'яті академіка НАНУ О.О. Мойбенка», проф. В.Є. Досенка «Корвітин - найуспішніший український лікарський засіб: історія створення та механізми дії» та проф. М.О. Клименка «Деякі сучасні аспекти патогенезу запалення».

На 3 пленарних та 12 секційних засіданнях було заслухано і обговорено 118 наукових доповідей, а також представлено 96 стендових та Е-постерних доповідей, з яких 25 зробили молоді вчені-патофізіологи.

На засіданнях розглядалися наступні актуальні проблеми: молекулярно-генетичні епігенетичні механізми розвитку патологічних процесів і хвороб, сучасні уявлення щодо патогенезу типових патологічних процесів (запалення, аутоімунні ураження, шок тощо), експериментальні та патофізіологічні аспекти уражень різних органів та систем (серцево-судинної, ендокринної, репродуктивної, нервової та ін.), зв'язок патофізіології з фармацевтичним сектором галузі охорони здоров'я.

За змістовні та чудово ілюстровані постерні доповіді були премійовані наступні молоді вчені: П.П. Єрмурак (м. Одеса), І.В. Марченко (м. Суми), Л.В. Галузінська (м. Харків), Н.С. Краснова (м. Харків), Н.Я. Мартинюк (м. Київ). З великим успіхом пройшла виставка монографій, опублікованих патофізіологами України за звітний період від VII до VII конгресів НТПУ (2012-2016рр.).

На третьому пленарному засіданні делегати заслухали звіт про діяльність Наукового товариства патофізіологів України (доповідач акад. НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резніков) та звіт ревізійної комісії (доповідач проф. І.М. Маньковська). Проведено вибори правління та ревізійної комісії. Президентом НТПУ обрано з.д.н.т. України, проф. А.І. Гоженка; віце-президентами: з наукової роботи – проф. В.Є. Досенка, з міжнародної діяльності – проф. Н.М. Кононенко, з навчальної роботи – проф. О.В. Атамана, головою ради старійшин – акад. НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резнікова; вченим секретарем – проф. Р.С. Вастьянова; головою ревізійної комісії – проф. І.М. Маньковську.

До списку почесних членів НТПУ були внесені видатні патофізіологи акад. НАНУ і НАМНУ Г.М. Бутенко, чл.-кор. НАМНУ В.М. Єльський, проф. Н.К. Казимірко, проф. А.В. Кубишкін, проф. В.Я. Березовський та проф. С.Б. Французова.

У межах конгресу була проведена нарада завідувачів кафедр патологічної фізіології ВМНЗ України та круглий стіл «Питання викладання патофізіології», на яких було вирішено почати роботу по створенню фонду загальнонаціональної бази наочного матеріалу (муляжі, тести, лекції, відеофільми, методичні рекомендації за предметом, відео-архів класичних експериментальних досліджень тощо), національного підручника з патологічної фізіології для студентів вищого фармацевтичного навчального закладу і фармацевтичних факультетів вищих медичних навчальних закладів III-IV рівнів акредитації, а також створення умов для впровадження курсу дистанційного навчання з патологічної фізіології.

Спільнота патофізіологів вдячна спонсорам, які підтримували організацію та проведення конгресу: фармацевтичній компанії «Здоров'я», Борщагівському хіміко-фармацевтичному заводу, аптечній мережі «9-1-1», тижневику «Аптека», ТОВ «Фарма Старт», фармацевтичній компанії «Фіто-Лек», хіміко-

фармацевтичному заводу «Червона зірка».

Матеріали конгресу (58 статей) опубліковано в журналах «Експериментальна і клінічна медицина» та «Український біофармацевтичний журнал» та у збірці тез (253 тези доповідей).

Конгрес постановив провести наступний пленум НТПУ у 2018р. (III квартал) у м. Полтава на базі ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Оргкомітет конгресу висловлює щиру подяку ректору Національного фармацев-

тичного університету академіку НАНУ В.П. Черних, завідувачу кафедри патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету проф. Н.М. Кононенко, завідувачу кафедри патологічної фізіології Харківського національного медичного університету проф. О.В. Ніколаєвій та співробітникам кафедр патофізіології, які доклали великих зусиль для успішного проведення VII Національного конгресу патофізіологів України.

Акад. НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резніков,
ст.н.с. С.І. Павлович

НЕКРОЛОГИ



**Пам'яті
Руслана Федоровича Макулькіна**

21 вересня 2016 р. на 85-му році закінчився життєвий шлях видатного патофізіолога України, багаторічного завідувача кафедри патологічної фізіології Одеського національного медичного університету Заслуженого діяча науки і техніки України, доктора медичних наук, професора Руслана Федоровича Макулькіна.

У 1955 р. Р.Ф. Макулькін з відзнакою закінчив Одеський медичний інститут ім. М.І. Пирогова і отримав диплом лікаря загального профілю, після чого вступив до аспірантури до відомого нейрофізіолога професора Пилипа Миколайовича Серкова. Після закінчення аспірантури займав посаду асистента кафедри нормальної фізіології рідного ВНЗ.

На ті роки прийшлися початкові успіхи Руслана Федоровича як майбутнього науковця, визначного нейропатофізіолога. Вже тоді він опановував низку складних

нейрохірургічних методик, досліджував механізми роботи мозку з використанням електроенцефалографічної методики, зокрема, використовував механізми функціонування деаферентованого мозку, динаміку кіркової та кірково-таламічної взаємодії за умов глибокого аферентного «недовантаження» мозку при його нейрональній ізоляції, а також вивчав компенсаторні механізми порушень функцій мозку після повної гемісферектомії. На підставі отриманих результатів він вдало захистив у 1962 р. кандидатську дисертацію.

З 1965 по 1969 рр. Руслан Федорович працював доцентом кафедри нормальної фізіології. Протягом наступних 30 років він був завідувачем кафедри патологічної фізіології Одеського медичного інституту ім. М.І. Пирогова. Ще одним подарунком долі для Р.Ф.Макулькіна була зустріч та дружба з академіком Російської АМН професором Г.М. Крижановським, у подальшій співпраці з яким на базі принципу детермінанти та теорії генераторних, детермінантних і системних механізмів невропатологічних синдромів були створені нові моделі епілептичного синдрому. Низка проведених досліджень надали можливість разом із колегами отримати принципово нові дані стосовно патогенетичної терапії останнього.

Прекрасно знаючи патофізіологію та нейропатофізіологію, Р.Ф.Макулькін разом із колегами розкрив численні механізми діяльності центральної нервової системи за умов норми та патології. Під його керівництвом співробітники кафедри патофізіології отримали дані, які відіграли значну роль у створенні нового напрямку в біомедичній науці – загальної патофізіології нервової системи. Подібні наукові розробки, подальша співпраця з Інститутом загальної патології та патологічної фізіології сприяли вдалому захисту докторської дисертації у 1982 р.

Наукові праці та винаходи Р.Ф.Макулькіна

відмічені державними нагородами. Його теоретичні та експериментальні дослідження дали змогу розробити та втілити в клінічну практику оригінальні методи діагностики та комплексної терапії судомного синдрому. Багато разів Р.Ф.Макулькін представляв вітчизняну науку на міжнародних конгресах та симпозіумах. У 1989 р. йому присвоєно почесне звання «Заслужений діяч науки і техніки України». Під науковим керівництвом Р.Ф.Макулькіна було підготовлено та захищено 4 докторські та 24 кандидатські дисертації. Він є автором 350 наукових праць, в тому числі 5 монографій та 5 авторських свідоцтв на винаходи.

Професіонал найвищого рівня, вчений з чітко вираженою життєвою позицією, переконаннями і принципами, яким він ніколи не зраджував, людина з надзвичайною інтуїцією і незвичайним тактом, пристрасно і нестримно закохана в життя, він став лідером і авторитетом в науці. Думку Руслана Федоровича з самих різних питань завжди жадали дізнатися його друзі, колеги, учні та послідовники. Велика кількість наукових ідей, якими Руслан Федорович готовий був щедро ділитися, постійно притягувала

до нього не лише експериментаторів, а й клініцистів різних галузей науки.

Руслан Федорович займав активну життєву та громадську позицію, виконував значний обсяг роботи. Він був членом редакційних рад низки наукових журналів, серед яких «Фізіологічний журнал», «Журнал патологічної фізіології та експериментальної терапії», «Одеський медичний журнал», а також членом спеціалізованої вченої ради при Одеському державному медичному університеті та Інституті очних хвороб та тканинної терапії ім. акад. В.П.Філатова.

Наукове товариство патофізіологів України, колеги та учні, співробітники кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. проф. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету, вся наукова громадськість глибоко сумує з приводу смерті Руслана Федоровича Макулькіна та великої втрати для вітчизняної патофізіологічної науки.

Світла пам'ять про Руслана Федоровича – відомого вченого, щиро, добру, чуйну, талановиту людину, людину-посмішку, назавжди залишиться в серцях вдячних учнів, друзів, колег і всіх тих, хто спілкувався з ним.

CONTENTS

O.A. Kotyk, A.B. Kotliarova, A.O. Polishchuk, S.M. Marchenko. Single-channel ion currents in the nuclear envelope of rat cardiomyocytes	3
K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, V.F. Sagach. The role of hydrogen sulfide in diastolic function restoration during aging	9
O.S. Zapukhliak, O.V. Netsyk, O.S. Rasulova, D.S. Isaev. Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy	19
T.M. Boychuk, O.M. Nika, S.S. Tkachuk. The ratio of p53-proapoptotic and Bcl-2 antiapoptotic activity in the hippocampus of rats with brain ischemia-reperfusion and experimental diabetes	25
I.A. Palagina, M.Y. Kudria, O.S. Lalymenko. Role of nitric oxide metabolites within the impact of the sub-toxic succinamides doses on state of hemostasis	34
V.Y. Mokrii, S.V. Ziablytsev. Polymorphism Pro12→Ala of the peroxisome proliferator-activated receptors gamma gene effect on lipid peroxidation and antioxidant defense in patients with type 2 diabetes	43
L.M. Shapoval, B.S. Kop'yak, O.V. Dmytrenko, V.O. Mayskiy, O.P. Mankivska, V.F. Sagach. NO-ergic control of blood circulation in the medulla oblongata of rats with experimental hemiparkinsonism under exposure to continuous light	50
O.S. Kryvopustov, V.E. Dosenko. Progesterone receptor gene polymorphisms as genetic risk factor of threatened abortion	60
O. Linnik, T. Drevytska, K. Tarasova, G. Portnichenko, V. Dosenko, I. Mankovska. Doxorubicin-induced disturbances of cardiomyocyte contractile activity.	65
K.V. Rosova, T.V. Bolgova, K.R. Tymoshenko, Ju.D. Vinnichuk, L.M. Gunina, V.V. Bezugla. Restructuring of skeletal muscle, lung and heart tissues of rats under hypoxia training	72
L.G. Korobeynikova, M.Yu. Makarchuk, G.V. Korobeynikov, V.S. Mischenko, O.B. Zapovitryana. States of psychophysiological functions of elite athletes in different aging groups	81
R.V. Yanko. Morphological changes pancreas after of melatonin's effect in different seasons	88
V. Hnatiuk, N. Kononenko. The study of the relationship between the activity of epiphysis and gonads in male rats in different seasons	95
V. A. Gryshchenko, T.M. Chernyshenko, O. V. Gornitska, T.M. Platonova. Evaluation of the functional state of liver and the efficiency of therapy for enteropathy of calves	102
Kh. R. Pohranychna. Reparative processes in jaw bones under using of different plastic materials	110
N.M. Veselovskaya, I.B. Zherebko. Assessment of functional changes tear production under the action of the eye drops on the base of natural molecule of ectoine and artificial tears in patients with dry eye syndrome on the background of endocrine ophthalmopathy	118
CRONICLE	122
NECROLOGS	125