

# Фізіологічний журнал

ТОМ 63 № 1 2017

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Мись Л.А., Будько А.Ю., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф.</i> Піридоксаль-5-фосфат відновлює синтез сірководню та редокс-статус тканин серця і судин старих тварин . . . . .	3
<i>Лінник О.О., Гончар О.О., Носар В.І., Древицька Т.І., Ковальов О.М., Маньковська І.М.</i> Вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі . . . . .	10
<i>Falalyeyeva T.M., Leschenko I.V., Beregova T.V., Lazarenko L.M., Savchuk O.M., Sichel L.M., Tsyryuk O.I., Vovk T.B., Spivak M.Ya.</i> Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity . . . . .	17
<i>Григор'єва Н.В., Поворознюк В.В., Гонкалова І.В., Орлик Т.В.</i> Вікові та статеві особливості показників мінеральної щільності кісткової тканини щурів . . . . .	26
<i>Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Обухова О.А., Атаман О.В.</i> Аналіз зв'язку поліморфізму rs2592551 гена $\gamma$ -глутамілкарбоксилази з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту . . . . .	33
<i>Грушка Н.Г.</i> Вплив інгібітора полі (АДФ-рибозо) полімерази 4-гідроксиквіназоліну на загибель імунокомпетентних клітин за умов імунокомплексної патології у мишей . . . . .	43
<i>Хапіцька О.П., Іваниця А.О., Стефаненко І.С., Сарафинюк Л.А., Мороз В.М.</i> Зміни реографічних показників гомілки у спортсменів різних видів спорту . . . .	51
<i>Шкуронат А.В., Тарасова О.О.</i> Зміни нормованої спектральної потужності ритмів електроенцефалограми дітей і підлітків із приглухуватістю . . . . .	60
<i>Черешнюк І.Л., Альчук О.І., Маринич Л.І., Кравець Р.А., Іваниця А.О., Ходаківський О.А.</i> Вплив блокаторів НМДА-рецепторів на динаміку внутрішньоочного тиску у кролів . . . . .	69

<i>Фіщенко Я.В., Заводовський Д.О., Мотузюк О.М., Матвієнко Т.Ю., Ноздренко Д.М.</i> Протифіброзна дія дипроспану, лонгідази та їх комбінацій при механічному травмуванні міжхребцевих дисків у щурів . . . . .	77
<i>Ткачов О.В., Шеремета В.І., Ткачова О.Л., Россоха В.І.</i> Фізіологічний зв'язок еритроцитарних антигенів із показниками спермограми коней . . . . .	84
<i>Веселовська Н.М.</i> Зміни прижиттєвих морфологічних показників сітківки на тлі корекції ліпідного обміну у хворих на цукровий діабет 2-го типу . . . . .	91
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Матвієнко Т.Ю., Заводовський Д.О., Ноздренко Д.М., Міщенко І.В., Мотузюк О.П.,</i> <i>Богущька К.І., Склярів Ю.П., Прилуцький Ю.І.</i> М'язова втома: фактори розвитку та шляхи корекції . . . . .	95
<b>ЮВІЛЕЇ</b>	
До 75-річчя з дня народження Василя Максимовича Мороза . . . . .	105
Життєвий та творчий шлях Макаренка Миколи Васильовича (до 80-річного ювілею) . . . . .	108

# Піридоксаль-5-фосфат відновлює синтез сірководню та редокс-статус тканин серця і судин старих тварин

Л.А. Мись, А.Ю. Бudyко, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

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

*Показано порушення обміну сірководню ( $H_2S$ ), а також розвиток оксидативного і нітрозативного стресу у серцево-судинній системі за старіння. Введення піридоксаль-5-фосфату, кофактора  $H_2S$ -синтезувальних ферментів, сприяло відновленню ендогенного вмісту  $H_2S$  та редокс-статусу у тканинах серця та аорти. За цих умов суттєво знижувалися такі показники оксидативного стресу – швидкість генерації супероксидного ( $\bullet O_2^-$ ) у 3 і 2,2 рази і гідроксильного ( $\bullet OH$ ) аніон-радикалів у 1,8 та 2,2 рази відповідно у тканинах серця та аорти порівняно з суттєво підвищеним значенням цих показників у тканинах старих тварин. Про обмеження оксидативного стресу при старінні за умов стимуляції ендогенного синтезу  $H_2S$  свідчать також зниження вмісту продуктів неферментативного (діснові кон'югати – ДК та малоновий діальдегід – МДА) та ферментативного (сечова кислота, пептидолейкотрієн  $C_4$  –  $LTC_4$  і тромбоксан  $B_2$  –  $TxB_2$ ) окиснення ліпідів. Важливим наслідком стимуляції ендогенного синтезу сірководню при старінні є зниження показників нітрозативного стресу, а саме активності індукцйбельної NO-синтази та нітратредуктази, а також відновлення активності конститутивної NO-синтази, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера у серцево-судинній системі. Отже, стимуляція ендогенного синтезу сірководню сприяла зниженню продукції активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу) в тканинах серця та аорти при старінні. Наявність вираженого антиоксидантного ефекту та модульовального впливу піридоксаль-5-фосфату на редокс-статус тканин серця і судин при старінні вказує на кардіопротекторні властивості досліджуваної речовини та перспективність подальших досліджень.*

*Ключові слова:* серце; аорта; сірководень; оксидативно-нітрозативний стрес; старіння; щури.

## ВСТУП

Активні форми кисню, азоту та сірки являють собою продукти нормальної функції клітин та їх реакції на різноманітні стимули. Дисбаланс цих проміжних продуктів обміну речовин призводить до такого відомого феномену, як оксидативно-нітрозативний стрес, за якого вільні радикали можуть пошкоджувати різні біомолекули, призводячи до порушень функції різних органів та їх систем. У тканинах серцево-судинної системи він є характерним для старих організмів і, як наслідок, вільнорадикальна теорія старіння є домінуючою протягом багатьох років [1, 2]. Вирішальна роль вільнорадикальних впливів відводиться і в розвитку таких хвороб похилого віку, як

гіпертензія, діабет, атеросклероз, серцева недостатність, паркінсонізм тощо [3, 4]. Особливістю розвитку оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах тварин є зниження конститутивного синтезу оксиду азоту (сNOS) та значне збільшення продукції супероксидного радикала. Така ситуація ймовірно зумовлена надлишковою активністю супероксидсинтезувальних процесів внаслідок підвищеної активності ксантиноксидази, цикло- і ліпоксигенази, НАДФН-оксидази, а також збільшення виходу супероксидного аніона з мітохондрій. Причиною таких змін редокс-статусу тканин може бути зниження активності (експресії) ферментів, що забезпечують антиоксидантний захист, а саме, супероксиддисмутази, каталази, пероксидази та ін. [5, 6].

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

За умов розвитку оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах тварин знижується конститутивний синтез сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ) [7]. Цей газовий трансмітер продукується з амінокислоти цистеїну такими ферментами: цистатіонін- $\gamma$ -ліазою, цистатіонін- $\beta$ -синтазою, а також 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою, що кон'югована з цистеїнамінотрансферазою, для яких кофактором є піридоксаль-5-фосфат (П5Ф) [8–10]. Тісно взаємодіючи з системою оксиду азоту, сірководень як фізіологічний медіатор бере участь у регуляції судинного тону, ангиогенезу, кардіопротекції, нейромодуляції [10, 11]. Синтез ендogenous сірководню суттєво знижується у тканинах старих тварин [12–14]. Нещодавно нами було показано, що введення старим тваринам донора сірководню відновлювало його вміст в тканинах старих тварин, а також спраження NOS та редокс-статус тканин серця і судин [14].

Мета нашої роботи – з'ясування впливу кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів П5Ф на синтез сірководню і відновлення його пулів у тканинах старих тварин, а також на їх редокс-статус.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на дорослих (6 міс, 200–250 г) і старих (22–24 міс, 300–350 г) самцях-щурів лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Дослідних тварин було поділено на 3 групи по 10 щурів у кожній. До 1-ї та 2-ї контрольних груп увійшли дорослі та старі тварини відповідно, яким вводили впродовж 14 діб дистильовану воду (*per os*). Щурам 3-ї групи давали П5Ф (*per os*) з розрахунку 0,714 мг/кг [15] протягом такого самого терміну.

У гомогенатах серця та цільних препа-

ратах аорти визначали біохімічні показники оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) і гідроксильного ( $\bullet\text{OH}$ ) радикалів, пули стабільного пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ейкозаноїдів – тромбоксану  $\text{B}_2$  ( $\text{TxB}_2$ ) та пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$  ( $\text{LTC}_4$ ), сечової кислоти, дієнових кон'югатів (ДК), маленового діальдегіду (МДА) та арахідонової кислоти [16, 17]. Визначали стан системи оксиду азоту: кальційзалежну активність cNOS, як суму ендотеліальної та нейрональної NOS (eNOS і nNOS відповідно), кальційнезалежну активність індукцйбельної NOS (iNOS), активність нітратредуктази, аргінази та пули стабільних метаболітів NO – нітрит- ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат- ( $\text{NO}_3^-$ ) аніонів, низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) та вміст ендogenous  $\text{H}_2\text{S}$  [17]. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що вміст  $\text{H}_2\text{S}$  у тканинах серця та судин істотно зменшується з віком. Так, у гомогенаті серця та аорті у старих щурів він виявився в 2 та 1,6 рази нижчим відповідно, ніж у дорослих щурів (рис. 1). Введення П5Ф викликало достовірне підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{S}$  до рівня контролю (дорослі тварини) у тканинах серця та у 2,4 рази в аорті. Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу сірководню у старих тварин, ймовірно, за рахунок активації  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів кофактором П5Ф.

Дані попередніх досліджень свідчать про посилення вільнорадикальних процесів при старінні [12]. Як видно з рис. 2, у тканинах серця та аорти старих тварин більшість показників оксидативного стресу були вищими від контрольних значень або мали тенденцію до зростання. Так, рівень генерації  $\bullet\text{O}_2^-$  в гомогенаті серця при старінні був вищими у 4 рази від контрольних значень, в аорті – у 6

разів, а після застосування П5Ф показники знижувались у 3 та 2,2 раза відповідно до значень у старих тварин. Дисмутація нестабільного радикала  $\cdot\text{O}_2^-$  в стабільний  $\text{H}_2\text{O}_2$  при старінні перевищувала контрольні значення у 1,4 та 4,3 раза у гомогенаті серця та аорті відповідно, за дії П5Ф вони знижувалися до рівня контрольних. Вміст  $\cdot\text{OH}$ -радикала в гомогенаті серця та аорті старих щурів порівняно з контролем був в 4 та більше ніж 10 разів вищим, а після дії П5Ф знижувався в 1,8 та 2,2 раза відповідно.

Про обмеження оксидативного стресу при старінні за дії П5Ф можуть свідчити також зміни вмісту продуктів неферментативного (ДК та МДА) та ферментативного ( $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$ ) окиснення ліпідів (див. рис.2). У гомогенаті серця та аорті при старінні ми отримали збільшення вмісту ДК та МДА порівняно з контролем. Водночас введення П5Ф вірогідно зменшувало в гомогенаті серця та аорті пули ДК у 3,7 і 1,65 раза відповідно, а вміст МДА – вдвічі в обох тканинах, що свідчить про потужну антиоксидантну дію  $\text{H}_2\text{S}$  та пригнічення утворення ініціаторів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) –  $\cdot\text{OH}$  та  $\cdot\text{NO}_2^-$  радикалів. Застосування П5Ф, що сприяє відновленню вмісту  $\text{H}_2\text{S}$ , чинить виражену антиоксидантну дію, пригнічуючи

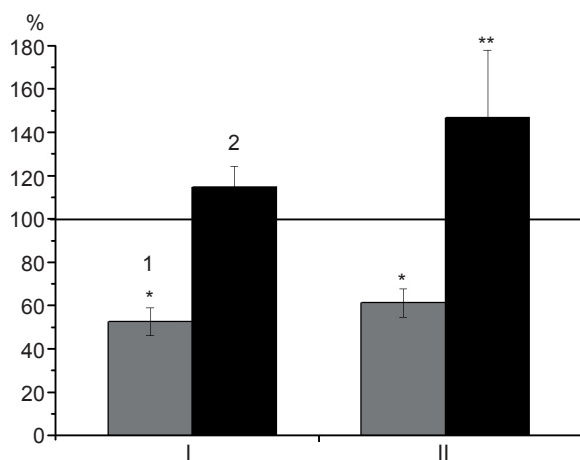


Рис. 1. Вміст сірководню у гомогенаті серця (I) та аорті (II) старих щурів (1) і після дії піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) (2). \* $P \leq 0,05$  відносно значень у дорослих щурів (100 %); \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів

активність ксантинооксидази (зниження в 2 рази вмісту сечової кислоти у тканинах серця та аорти), ліпооксигенази (зниження вмісту  $\text{LTC}_4$  до значень нижче від контрольних у гомогенаті серця, та в 1,4 раза – в аорті) та циклооксигенази (зниження вмісту  $\text{TxB}_2$ ), за активації яких утворюється супероксиданіон. Це може бути одним із важливих біохімічних механізмів кардіопротекторної дії сірководню при старінні. Більше того,  $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$  за ішемії мають коронароконстрикторну та аритмогенну дію, а лейкотрієни ще і прооксидантну [18]. Вміст вільної арахідонової кислоти, яка є маркером активності фосфоліпази  $\text{A}_2$ , у тканинах серця при старінні зростає у 2,2 раза порівняно з контролем. Важливим кардіопротекторним механізмом можна вважати зменшення вмісту вільної арахідонової кислоти (у 1,8 раза у серці), що може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, можливо в результаті пригнічення активності фосфоліпази  $\text{A}_2$ , та вказує на можливу мембраностабілізуючу дію П5Ф.

Виявлено, що при старінні знижується (у 2 та 3 рази в гомогенаті серця та аорті відповідно) такий важливий показник, як швидкість сумарного конститутивного  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного синтезу оксиду азоту, який свідчить про кардіопротекторні властивості eNOS (рис. 3). І, навпаки, після застосування П5Ф активність цього ферменту у тканинах серця та аорти зростає у 3,4 раза та вдвічі, порівняно зі старими тваринами. При старінні розвивається не лише оксидативний, як було показано вище, а і нітрозативний стрес. Натомість активність ферменту  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної iNOS при старінні зростає у 8,8 та 3,8 раза у тканинах серця і аорти відповідно. Введення П5Ф знижувало ці показники у 1,7 та 1,9 раза відповідно.

Також після застосування П5Ф зменшується активність ферменту нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{NO}_2^-$ . Нітратредуктазна активність у тканинах серця та аорти при старінні переви-

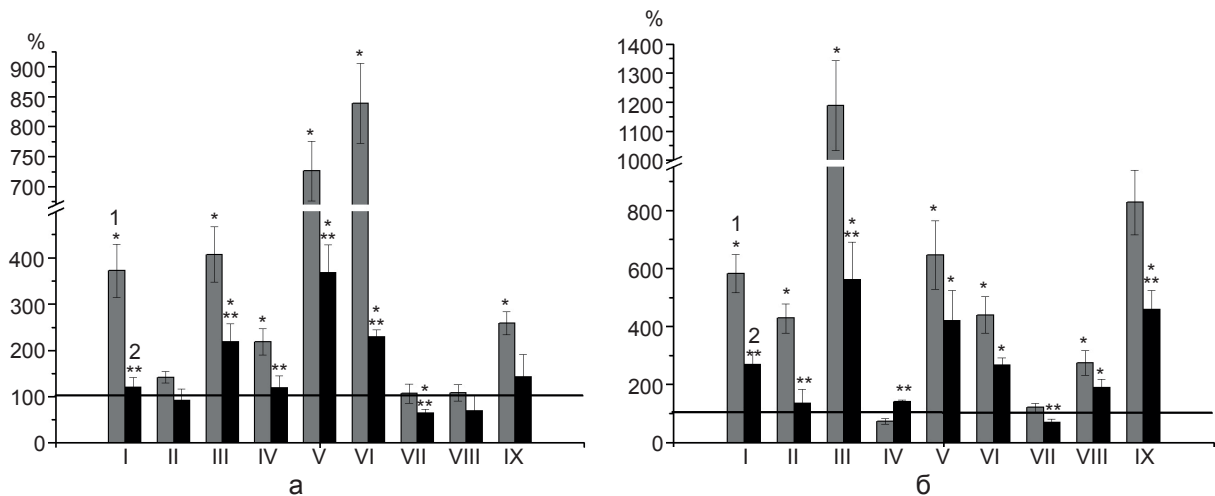


Рис. 2. Вплив піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на показники оксидативного стресу в тканині серця (а) та аорті (б) старих щурів: 1 – контроль; 2 – дія П5Ф; I – швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , II – вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , III – швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ , IV – вміст арахідонової кислоти, V – вміст малонового діальдегіду, VI – вміст дієнових кон'югатів, VII – вміст тромбоксану  $\text{B}_2$ , VIII – вміст пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ , IX – вміст сечової кислоти. \* $P \leq 0,05$  відносно значень у дорослих щурів (100 %); \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів

щувала контрольні значення у 2,6 та 2,2 рази відповідно. Введення П5Ф суттєво знижувало значення цих показників, що свідчить про значне пригнічення надлишкового реутилізаційного синтезу NO та нітрозативного стресу за цих умов. У разі старіння спостерігали зростання активності аргінази, ферменту, що конкурує з NOS за субстрат L-аргінін і каталізує його розщеплення до орнітину і

сечовини: в 4 і 3,4 рази відповідно у тканинах серця і аорті. Стимуляція синтезу сірководню у старих тварин призводила до зниження в 5 і 1,5 рази активності цього ферменту у серці і аорті відповідно.

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу при старінні за дії П5Ф, ми також визначали зміни пулів стабільних метаболітів NO: нітрит- і нітрат-аніонів (див. рис. 3) та

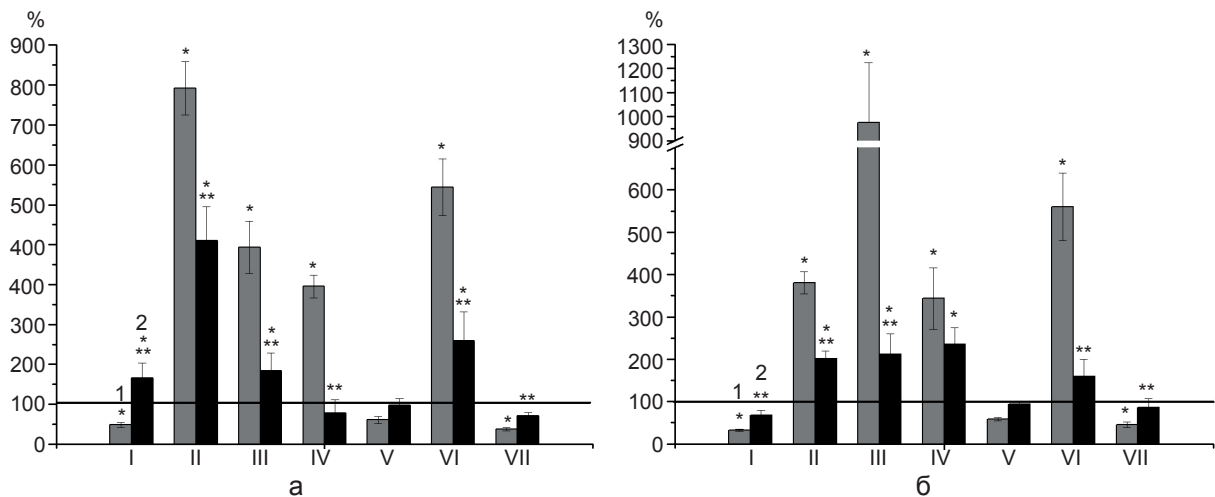


Рис. 3. Вплив піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на показники нітрозативного стресу в тканині серця (а) та аорті (б) старих щурів: 1 – контроль; 2 – дія П5Ф; I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукційної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – аргіназна активність, V – вміст  $\text{NO}_2^-$ , VI – вміст  $\text{NO}_3^-$ , VII – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів. \* $P \leq 0,05$  відносно значень у дорослих щурів (100 %); \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів



продуктів нітрозилювання активних форм азоту НМНТ, в основному це нітрозилюваний глутатіон. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  [19]. Встановлено, що в тканинах серця та аорті старих щурів пули  $\text{NO}_2^-$ , що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються майже вдвічі. Водночас введення П5Ф призводило до повернення цих значень до контрольного рівня. При цьому пули  $\text{NO}_3^-$ , що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, при старінні суттєво зростали у серці та аорті у 6,4 та 5,6 раза відповідно. Стимуляція синтезу сірководню нормалізувала вміст цих пулів. Це може свідчити про те, що надлишок NO, що синтезується ферментом iNOS, іде на спонтанне окиснення молекулами кисню до нітрит-аніонів, а не на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад.

При старінні спостерігається зниження вмісту НМНТ у тканинах серця та аорти у 2,6 та 2,2 раза відповідно щодо контролю. Проте суттєве збільшення цих тіолів, майже вдвічі, відбувається після застосування кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів – П5Ф. Пули НМНТ включають три компоненти: нітрозилювану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником *de novo* синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , нітрозоглутатіон, що містить у своєму складі L-цистеїн і нітрозилюваний сірководень. НМНТ бере участь у транспортуванні і депонуванні NO з вивільненням останнього в процесі декомпозиції. Пули НМНТ характеризують інтенсивність процесів нітрозилювання (включення NO) і декомпозиції (вивільнення NO). Отже, сигнальна молекула сірководню виступає як регулятор системи оксиду азоту, відновлюючи активність sNOS і пригнічуючи процеси нітрозативного стресу, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера у патології серцево-судинної системи.

Оскільки  $\text{H}_2\text{S}$  має сильні відновні властивості, було зроблено припущення, що протекторні ефекти цієї сигнальної молекули

можуть бути пов'язані з захистом тіолових груп білків від окиснення, реакції з активними формами кисню і азоту, пригнічення активності iNOS, що запобігає неспряженому стану sNOS тощо. Це забезпечує регулювання низки функцій клітини, що вказує на важливість цього медіатора для життєздатності клітин. Так, раніше нами показано цитопротекторний ефект сірководню, що проявлявся у запобіганні відкривання неспецифічної кальційіндукованої мітохондріальної пори [11].

Таким чином, за старіння формується дисбаланс обміну сірководню у серці та посилення оксидативно-нітрозативного стресу. Водночас такі порушення обміну  $\text{H}_2\text{S}$  нормалізуються за допомогою застосування модуляторів його синтезу, зокрема кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів П5Ф. Вважасмо, що роль сигнальної молекули сірководню у регуляції редокс-статусу у тканинах серця і судин має велике значення за фізіологічних умов і зростає за старіння, тому стимуляція ендогенного синтезу цього медіатора відкриває нові перспективи у вивченні механізмів кардіопротекції.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що стимуляція  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів кофактором П5Ф призводить до відновлення вмісту сірководню у тканинах серця та аорти при старінні.

2. Застосування П5Ф сприяло зниженню продукції активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу), а також відновленню конститутивного синтезу NO в тканинах серця та аорти при старінні.

3. Наявність вираженого антиоксидантного ефекту та модулювального (регуляторного) впливу сірководню на редокс-статус тканин серця і судин при старінні свідчить про кардіопротекторні властивості досліджуваної речовини та перспективність подальших досліджень та розробок препаратів на основі П5Ф у клінічну практику.

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

## **ПИРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТ ВОССТАНАВЛИВАЕТ СИНТЕЗ СЕРОВОДОРОДА И РЕДОКС-СТАТУС ТКАНЕЙ СЕРДЦА И СОСУДОВ СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ**

Показано нарушения обмена сероводорода ( $H_2S$ ), а также развитие оксидативного и нитрозативного стресса в сердечно-сосудистой системе при старении. Введение пиридоксаль-5-фосфата, кофактора  $H_2S$ -синтезирующих ферментов, способствовало восстановлению эндогенного содержания  $H_2S$  и редокс-статуса в тканях сердца и аорты. В этих условиях существенно снижались такие показатели оксидативного стресса - скорость генерации супероксидного ( $\bullet O_2^-$ ) в 3 и 2,2 раза и гидроксильного ( $\bullet OH$ ) анион-радикалов в 1,8 и 2,2 раза соответственно в тканях сердца и аорты, по сравнению с существенно повышенным уровнем этих показателей в тканях старых животных. Об ограничении оксидативного стресса при старении в условиях стимуляции эндогенного синтеза  $H_2S$  свидетельствуют также снижение содержания продуктов неферментативного (диеновые конъюгаты - ДК и малонового диальдегида - МДА) и ферментативного (мочевая кислота, пептидолейкотриены  $C_4$  -  $LTC_4$  и тромбоксаны  $B_2$  -  $TxB_2$ ) окисления липидов. Важным следствием стимуляции эндогенного синтеза сероводорода при старении является снижение показателей нитрозативного стресса, а именно активности индуцибельной NO-синтазы и нитратредуктазы, а также восстановление активности конститутивной NO-синтазы, что свидетельствует о важной роли этого газового трансммитера в сердечно-сосудистой системе. Таким образом, стимуляция эндогенного синтеза сероводорода способствовала снижению продукции активных форм кислорода (оксидативного стресса) и азота (нитрозативного стресса) в тканях сердца и аорты при старении. Наличие выраженного антиоксидантного эффекта и модулирующего влияния пиридоксаль-5-фосфата на редокс-статус тканей сердца и сосудов при старении указывает на кардиопротекторные свойства исследуемого вещества и перспективность дальнейших исследований. Ключевые слова: сердце; аорта; сероводород; оксидативно-нитрозативный стресс; старение; крысы.

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

## **PYRIDOXAL-5-PHOSPHATE RESTORES HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS AND REDOX STATE OF HEART AND BLOOD VESSELS TISSUE IN OLD ANIMALS**

It was shown the alterations in hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) metabolism and the development of oxidative and nitroative stress in cardiovascular system by aging. The administration of pyridoxal-5-phosphate as cofactor of  $H_2S$  synthesizing

enzymes restored endogenous  $H_2S$  level and redox state in the heart and aorta tissues. Under these conditions, the following indicators of oxidative stress were significantly decreased in heart and aorta tissues: superoxide generation rate ( $\bullet O_2^-$ ) and hydroxyl ( $\bullet OH$ ) anion radicals, compared with significantly elevated levels of these parameters in old animals. We also found the reduction of non-enzymatic (diene conjugates and malonic dialdehyde) and enzymatic (uric acid,  $LTC_4$  and  $TxB_2$ ) lipid oxidation products levels in old rats under  $H_2S$  synthesis stimulation that confirms the restriction of oxidative stress. An important consequence of endogenous synthesis stimulation of hydrogen sulfide during aging is a decrease of nitroative stress, such as iNOS activity and nitrate reductase, as well as recovery of constitutive NO synthase activity, indicating the importance of this gas transmitter in cardiovascular system. Thus, stimulation of hydrogen sulfide endogenous synthesis contributed to reduced production of reactive oxygen species (oxidative stress) and nitrogen (nitroative stress) in heart and aorta tissues with aging. The presence of a pronounced antioxidant effect and modulating influence of pyridoxal-5-phosphate in the redox state of heart tissue and blood vessels during aging suggests cardioprotective properties of the substance and prospects for future research.

Key words: heart; aorta; hydrogen sulfide; oxidative and nitroative stress; aging; rats.

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

## **REFERENCES**

1. Koltover VK. Free Radical Timer of Aging: from Chemistry of Free Radicals to Systems Theory of Reliability. *Curr Aging Sci.* 2016; 9(4).
2. Schöttker B, Brenner H, Jansen EH, Gardiner J, Peasey A, Kubinová R, Paják A, Topor-Madry R, Tamosiunas A, Saum KU, Holleczeck B, Pikhart H, Bobak M. Evidence for the free radical/oxidative stress theory of ageing from the CHANCES consortium: a meta-analysis of individual participant data. *BMC Med.* 2015;13:300:1-15.
3. Dikalov SI, Dikalova AE. Contribution of mitochondrial oxidative stress to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016;25(2):73-80.
4. Larousserie F, Bsiri L, Dumaine V, Dietrich C, Audebourg A, Radenen-Bussiére B, Anract P, Vacher-Lavenu MC, Devergne O. Frontline Science: Human bone cells as a source of IL-27 under inflammatory conditions: role of TLRs and cytokines. *J Leukoc Biol.* 2016.3HI0616-280R:1-12.
5. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015;14(1):1-7.
6. Barja G. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;127:1-27.
7. Jenkins TA, Nguyen JC, Hart JL. Decreased vascular  $H_2S$  production is associated with vascular oxidative stress in rats fed a high-fat western diet. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2016;389(7):783-90.



8. Kimura H. Hydrogen polysulfide ( $H_2S_n$ ) signaling along with hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) and nitric oxide (NO). J Neural Transm (Vienna). 2016; 123(11):1235-45.
9. Wang R. Physiological implication of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev. 2012; 92(2):791-896.
10. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2015; 91(4):131-59.
11. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide Inhibits  $Ca^{2+}$ -induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Adult and Old Rat Heart. Fiziol Zh. 2011; 57(6):3-13. [Ukrainian].
12. Strutynska N.A., Kotsiuruba A.V., Budko A.Yu., Mys L.A., Sagach V.F. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive NO-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. Fiziol Zh. 2016; 62(2), c. 3-11. [Ukrainian].
13. Jin S, Pu SX, Hou CL, Ma FF, Li N, Li XH, Tan B, Tao BB, Wang MJ, Zhu YC. Cardiac  $H_2S$  Generation Is Reduced in Ageing Diabetic Mice. Oxid Med Cell Longev. 2015; 758358:1-14.
14. Drachuk K.O, Kotsiuruba A.V, Sagach V.F. 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].
15. Zaichko N.V., Yoltukhivskiy M.M., Olhovskiy A.S., Palamarchuk I.V. Propargylglycine and Sodium Hydrogen Sulfide Age-Related Influence on Indices of Rats' Myocardium  $H_2S$  Metabolism. Series problems of the biology and medicine. 2013; 4(2): 105-10. [Ukrainian].
16. Sharipov R.R., Kotsiuruba A.V., Kop'iak B.S., Sahach V.F. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
17. Sharipov R.R., Kotsiuruba A.V., Kop'iak B.S., Sahach V.F. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
18. Strutyns'kyi RB, Kotsiuruba AV, Rovenets' RA, Strutyns'ka NA, Iagupols'kyi IuL, Sagach VF, Moibenko OO. Biochemical mechanisms of the cardioprotective effect of the K(ATP) channels opener flocalin (medicinal form) in ischemia-reperfusion of myocardium. Fiziol Zh. 2013; 59(4):16-27. [Ukrainian].
19. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Amer J Kidney Diseases. 1994; 24:112-29.

*Матеріал надійшов  
до редакції 06.10.2016*

# Вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі

О.О. Лінник<sup>1</sup>, О.О. Гончар<sup>1</sup>, В.І. Носар<sup>1</sup>, Т.І. Древицька<sup>1</sup>, О.М. Ковальов<sup>2</sup>,  
І.М. Маньковська<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології О.О. Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Національний авіаційний університет, Київ; e-mail: newmulo@gmail.com

*Досліджено вплив куркуміну на життєздатність кардіоміоцитів, процеси окисного фосфорилювання в мітохондріях клітин, їх про- та антиоксидантний баланс при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі. Виявлено, що введення доксорубіцину щурам призводило до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) на 21% та перекису водню на 76%, зниження ферментативної активності мітохондріальної марганцевої супероксиддисмутази (Mn-SOD) на 14% і зростання активності каталази на 80% порівняно з контролем. При сумісному застосуванні доксорубіцину і куркуміну вміст ТБК-АП та  $H_2O_2$  підвищувався лише на 14 та 26% відповідно, ферментативна активність каталази та Mn-SOD зростала на 52 і 9%. Після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до підвищення життєздатності клітин на 8%, а кількість некротично змінених зменшувалася на 8% порівняно із застосуванням лише доксорубіцину. При оцінці показників дихання мітохондрій щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину рівень активного дихання ( $V_3$ ) знизився на 43,8%, ступінь спряженості окиснення з фосфорилюванням ( $V_3/V_4^{ATP}$ ) — на 47%, а коефіцієнт ефективності фосфорилювання (АДФ/О) на 31,7% відповідно порівняно з контролем. Після сумісного застосування доксорубіцину і куркуміну показники мітохондріального дихання покращувалися відносно використання доксорубіцину:  $V_3$  підвищився на 25%,  $V_3/V_4^{ATP}$  на 18%, а АДФ/О на 12%.*

*Ключові слова:* мітохондрії; оксидативний стрес; доксорубіцин; куркумін.

## ВСТУП

Розвиток оксидативного стресу є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрацикліновими антибіотиками, які широко вживаються при поліхіміотерапії в онкологічній практиці. Їх токсичний вплив на серце зумовлений пригніченням синтезу нуклеїнових кислот і, як наслідок, — блокадою поділу клітин [1]. Ушкодження нуклеїнових кислот і одноланцюгові розриви ДНК можуть бути спричинені активними формами кисню (АФК), що утворюються під впливом антрациклінів [2]. Останніми роками інтенсивно вивчаються процеси ПОЛ як

© О.О. Лінник, О.О. Гончар, В.І. Носар, Т.І. Древицька, О.М. Ковальов, І.М. Маньковська

найімовірніший механізм кардіотоксичної дії останніх. Показано, що новоутворені вільні радикали негативно впливають на функцію мембран кардіоміоцитів [3,4]. Підтверджено порушення структури мітохондрій кардіоміоцитів як складової частини ушкодження серця антрацикліновими антибіотиками. Під їх впливом пригнічується дихальний ланцюг мітохондрій клітин міокарда і знижується концентрація в них макроергічних фосфорних сполук [5]. Відзначено, що найбільш чутливою до ушкоджувальної дії цитостатиків є внутрішня мембрана мітохондрій, що, можливо, є наслідком їх спорідненості з

кардіоліпіном. Її руйнування призводить до різкого збільшення проникності до відновленого нікотинамідаденінуклеотиду (НАДН) та  $\text{Ca}^{2+}$ , а також зростання поглинання кисню і подальшої генерації АФК. Це супроводжується інактивацією ключових ензимів дихального ланцюга і порушенням процесів окисного фосфорилування в мітохондріях кардіоміоцитів [6,7]. Таким чином, є природним, що в останні роки відбуваються інтенсивні пошуки речовин–протекторів мітохондрій від впливу антрациклінів. Серед таких сполук значне місце займає куркумін – поліфенольний антиоксидант рослинного походження. Це жовтий пігмент, отриманий з коренів рослини *Curcuma longa*, який використовується як біологічно активна добавка в терапії атеросклерозу, цукрового діабету, при алергічних захворюваннях. Він має протективний ефект при пошкодженнях міокарда [8], впливає на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із гіпоксією [9], а також зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце, печінку та нирки за рахунок його антиоксидантних властивостей [10–12]. Водночас комплексне вивчення протективного ефекту куркуміну на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів при застосуванні антрациклінів досі не проводилося.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі *in vitro* (в культурі клітин) та *in vivo*.

## МЕТОДИКА

В експериментах використовували 12 самиць щурів Fisher масою тіла 180–200 г та 5 дводенних щурів для отримання культури неонатальних кардіоміоцитів. Доксорубіцин (4 мг/кг) і куркумін (50 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно за схемою: премедикація куркуміном тричі на тиждень, а потім введення куркуміну і доксорубіцину разом

із паузою в 6–8 год за тією самою схемою. Через 24 год після останньої ін'єкції тварини були декапітовані відповідно до прийнятих біоетичних норм. Мітохондрії із міокарда виділяли загальноприйнятим методом диференційного центрифугування за умови зберігання нативності ізольованих органел при 4°C [13]. Процеси дихання та окисного фосфорилування досліджували полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка і приладу Оксиграф («Standard Oxygraph System» «Hansatech» Великобританія). Середовище виділення містило (ммоль/л): манітолу-D – 210, сахарози – 70, EDTA – 2, бичачого сироваткового альбуміну – 1 мг/кг, HEPES – 10 (pH 7,4). Функціональний стан мітохондрій досліджували методом Chance, Williams [14] в середовищі інкубації зі складом (ммоль/л): KCl–120,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ –5, HEPES–10; pH 7,4. Як субстрат окиснення використовували 5 ммоль/л сукцинату Na. Інгібітором мітохондріального ферментного комплексу I слугував ротенон (2 мкмоль/л). Дихання стимулювали внесенням у полярографічну комірку 200 мкмоль АДФ. Сукцинат Na додавали в середовище окремо перед внесенням мітохондрій. Використовуючи одержані хроно-амперографічні криві, обчислювали показники дихання мітохондрій (за Чансом): в стані активного дихання при додаванні АДФ ( $V_3$ ), контрольованого дихання ( $V_4^{\text{АДФ}}$ ), дихальний контроль ( $V_3/V_4^{\text{АДФ}}$ ), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) [15]. Концентрацію білка визначали методом Lowry [16]. Виділення і культивування неонатальних кардіоміоцитів здійснювали відповідно до модифікованої методики Surova [17]. За допомогою цервікальної дислокації щурів знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітки виймали серце та відокремлювали шлуночки з подальшим їх відмиванням (буферний розчин: HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 ммоль/л) та подрібненням. Ферментативне розщеплення проводилось у

середовищі виділення, яке на основі вищезазначеного буфера містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Ресуспендували клітини у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин - 100 мкг/мл, гентаміцин - 0,05 мг/мл, пеніцилін - 100 ОД/мл). Виділені клітини підраховували з використанням світлової мікроскопії після фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Культивування проводили протягом 1 доби у вищезазначеному живильному середовищі при 37°C з газовим складом 5%  $\text{CO}_2$  та 95% атмосферного повітря. Після 24 год інкубації в культуру додавали 0,5 мкмоль доксорубіцину гідрохлориду («Sigma Aldrich», США) чи доксорубіцин у вказаній дозі разом з куркуміном («Sigma Aldrich», США) в дозі 20 мкмоль. Для підрахунку кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин у культурі неонатальних кардіоміоцитів використовували методи забарвлення біс-бензимідом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом у концентрації 8,75 мкмоль/л та флуоресцентної

мікроскопії (NikonEclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330-380 та 510-560 нм для Hoechst та пропідіум йодиду відповідно). Ступінь оксидативного стресу кардіоміоцитів оцінювали біохімічними методами за вмістом у мітохондріях активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [18] та перекису водню [19], антиоксидантний захист - за активністю мітохондріальної Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) [20] та каталази [21].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми оцінювали ступінь оксидативного стресу в клітинах міокарда щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину та куркуміну (сумісно) й доксорубіцину окремо (рис.1). Вплив доксорубіцину призвів до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту ТБК-АП на 21% та перекису водню на 76% порівняно з контролем ( $P<0,05$ ), що свідчить про інтенсифікацію вільнорадикального окиснення. Ступінь деструктивно-метаболічних порушень у кардіоміоцитах за цих умов залежить від стану ферментних і неферментних антиоксидантних систем, узгоджена дія яких тримає під контролем як

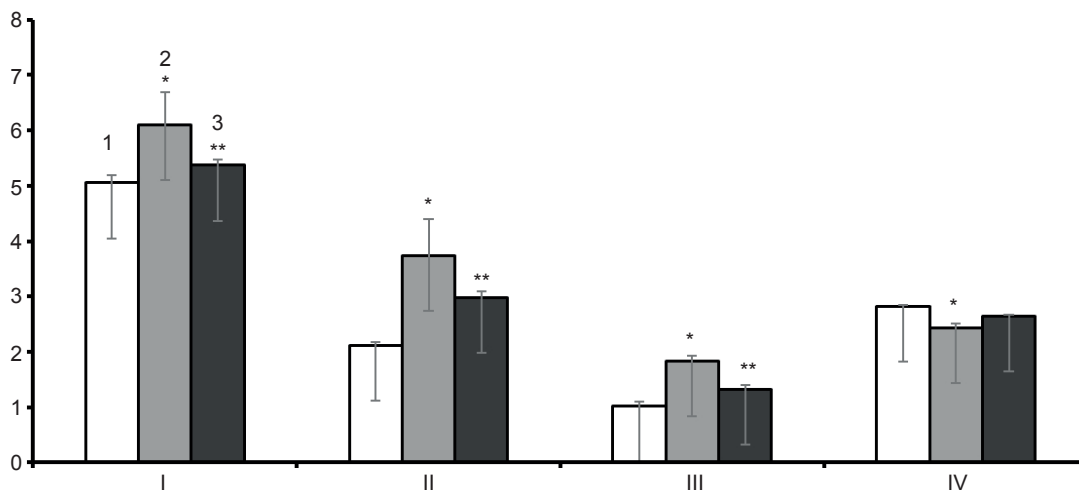


Рис.1. Вплив куркуміну на про- та антиоксидантний баланс мітохондрій кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі; 1-контроль, 2-доксорубіцин, 3-доксорубіцин і куркумін; I-активні продукти тіобарбітурової кислоти, нмоль/мг; II-  $\text{H}_2\text{O}_2$ , мкмоль/мг; III-каталаза, мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>; IV-марганцева супероксиддисмутаза, од/мг.

\* $P<0,05$  порівняно з контролем, \*\*  $P<0,05$  порівняно з введенням доксорубіцину

утворення, так і інактивацію АФК. Вважається, що мітохондріальна Мп-СОД відіграє найбільш суттєву роль в антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний вміст супероксид-аніона, а активація експресії СОД захищає клітини від оксидативного стресу різного генезу [22]. У нашій роботі тривале введення доксорубіцину знижувало ферментативну активність Мп-СОД на 14%, при цьому активність каталази зростала на 80% порівняно з контролем. Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції  $H_2O_2$ , який, як відомо, виступає субстратом для антиперекисних ферментів [23]. Сумісне застосування доксорубіцину та куркуміну призводило до значного зниження рівня вільнорадикальних процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину. Зменшення вмісту ТБК-АП та  $H_2O_2$  (на 14 та 26% відповідно) при зниженні гіперактивації каталази (на 28%) та зростанні активності Мп-СОД (на 9%) свідчить про тенденцію до відновлення про- та антиоксидантної рівноваги в мітохондріях кардіоміоцитів. Таким чином, результати дослідження розвитку доксорубіциніндукованого оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів свід-

чать про його гальмування при застосуванні куркуміну як у модельних експериментах [24], так і при введенні тваринам.

Надалі ми дослідили, як таке гальмування може відбиватися на життєздатності кардіоміоцитів та функціональній активності їх мітохондрій. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем (рис. 2). Після інкубації з куркуміном у дозі 20 мкмоль, кількість живих клітин зменшилася на 19,7%, а некротичні зросли на 19,7% відносно контролю, що може пояснюватися проапоптотичним впливом куркуміну на культуру неонатальних кардіоміоцитів при його безпосередньому застосуванні [21]. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до підвищення життєздатності клітин на 8%, а кількість некротично змінених зменшувалася на 8% порівняно із застосуванням лише доксорубіцину. Отримані результати свідчать про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів за умов оксидативного пошкодження.

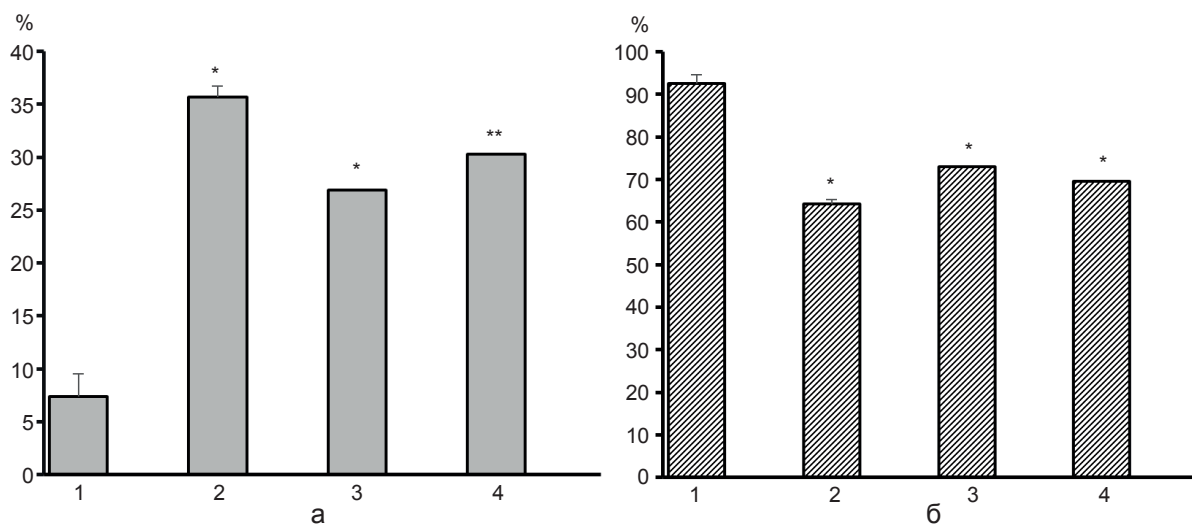


Рис.2. Частка некротичних (а) та живих (б) клітин при використанні флуоресцентної мікроскопії: 1- контроль, 2-доксорубіцин, 3-куркумін, 4-доксорубіцин і куркумін. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з введенням доксорубіцину



Показники дихання мітохондрій міокарда щурів ( $M \pm m$ ;  $n = 12$ )

Показники	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин і куркумін
Рівень активного дихання ( $V_3$ ) нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ мг <sup>-1</sup> білка	63,7 $\pm$ 3,44	35,8 $\pm$ 2,77*	44,7 $\pm$ 2,13**, *
Рівень активності фосфорилування ( $V_4^{ATP}$ ) нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ мг <sup>-1</sup> білка	22,1 $\pm$ 2,23	23,5 $\pm$ 2,11	24,9 $\pm$ 2,18
Ступінь спряженості окиснення з фосфорилуванням ( $V_3/V_4^{ATP}$ )	2,88 $\pm$ 0,19	1,52 $\pm$ 0,09*	1,8 $\pm$ 0,11**, *
Коефіцієнт ефективності фосфори- лування (АДФ/О)	1,67 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,05*	1,29 $\pm$ 0,04**, *

\* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з введенням доксорубіцину.

При оцінці параметрів дихання мітохондрій кардіоміоцитів щурів (за Чансом) виявлено: в мітохондріях щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину,  $V_3$  знизився на 43,8%,  $V_3/V_4^{ATP}$  – на 47%, а коефіцієнт ефективності фосфорилування також зменшився на 31,7% порівняно з контролем. Ці результати свідчать про зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання  $O_2$ , порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зменшення спряження дихання і фосфорилування, що є показниками доксорубіцин-індукованого порушення процесів окисного фосфорилування в мітохондріях. Водночас після сумісного застосування доксорубіцину та куркуміну показники мітохондріального дихання покращувалися порівняно із такими при використанні лише доксорубіцину:  $V_3$  підвищився на 25%,  $V_3/V_4^{ATP}$  на 18%, а АДФ/О на 12% (таблиця). Отже, можна зробити висновок про здатність куркуміну покращувати електронно-транспортну функцію мітохондрій, посилювати спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування для запобігання пошкодження клітин при оксидативному стресі.

Таким чином, результати досліджень свідчать про позитивний вплив куркуміну на життєздатність кардіоміоцитів, процеси окисного фосфорилування в мітохондріях кардіоміоцитів, їх про- та антиоксидантний баланс при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі. Це дає можливість

із впевненістю говорити про доцільність застосування куркуміну для протекції мітохондріальної функції кардіоміоцитів від оксидативних пошкоджень при застосуванні антрациклінових антибіотиків та для реабілітації хворих після поліхіміотерапії.

## ВИСНОВКИ

1. Вплив доксорубіцину призводив до розвитку оксидативного стресу, а саме до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту ТБК-АП на 21% та перекису водню на 76%, активність мітохондріальної Мп-СОД знижувалася на 14%, при цьому активність каталази зростала на 80% відносно контрольної групи. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до значного зниження ступеня оксидативних проявів процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину.

2. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем. При сумісному застосуванні доксорубіцину і куркуміну життєздатність клітин підвищилася порівняно із застосуванням лише доксорубіцину.

3. При оцінці показників дихання мітохондрій щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину,  $V_3$  знизився на 43,8%,  $V_3/V_4^{ATP}$



$V_4^{ATP}$  на 47%, а АДФ/О на 31,7% відповідно порівняно з контролем. Після сумісного застосування доксорубіцину і куркуміну вони покращувалися порівняно із використанням лише доксорубіцину:  $V_3$  підвищився на 25%,  $V_3/V_4^{ATP}$  на 18%, а АДФ/О на 12%.

**О.А. Линник, О.А. Гончар, В.И. Носарь, Т.И. Древицкая, А.М. Ковалев, И.Н. Маньковская**

### **ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ДОКСОРУБИЦИНИНДУЦИРОВАННОМ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ**

Исследовано влияние куркумина на жизнеспособность кардиомиоцитов, процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов, их про- и антиоксидантный баланс при доксорубицининдуцированном оксидативном стрессе. Обнаружено, что введение доксорубицина крысам приводило к повышению в митохондриях кардиомиоцитов содержания активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) на 21% и перекиси водорода на 76%, снижение ферментативной активности митохондриальной марганцевой супероксиддисмутазы (Mn-SOD) на 14% и рост активности каталазы на 80% по сравнению с контролем. При совместном применении доксорубицина и куркумина содержание ТБК-АП и  $H_2O_2$  повышалось только на 14 и 26% соответственно, ферментативная активность каталазы снижалась на 28%, а активность Mn-SOD на 9%. После инкубации культуры неонатальных кардиомиоцитов с доксорубицином количество живых клеток уменьшилось на 30,4%, а некротически измененных выросло на 30,4% по сравнению с контролем. Совместное применение доксорубицина и куркумина приводило к повышению жизнеспособности клеток на 8%, а количество некротически измененных уменьшалось на 8% по сравнению с применением только доксорубицина. При оценке показателей дыхания митохондрий крыс, получавших инъекции доксорубицина, уровень активного дыхания ( $V_3$ ) снизился на 43,8%, показатель степени сопряженности окисления с фосфорилированием ( $V_3/V_4^{ATP}$ ) на 47%, а коэффициент эффективности фосфорилирования (АДФ/О) на 31,7% соответственно по сравнению с контролем. После совместного применения доксорубицина и куркумина показатели митохондриального дыхания улучшались по сравнению с использованием только доксорубицина:  $V_3$  повысился на 25%,  $V_3/V_4^{ATP}$  на 18%, а АДФ/О на 12% соответственно.

Ключевые слова: митохондрии; оксидативный стресс; доксорубин; куркумин.

**O. Linnik<sup>1</sup>, O. Gonchar<sup>1</sup>, V. Nosar<sup>1</sup>, T. Drevytska<sup>1</sup>, O. Kovalyov<sup>2</sup>, I. Mankovska<sup>1</sup>**

### **EFFECT OF CURCUMIN ON MITOCHONDRIAL FUNCTION OF CARDIOMYOCYTES WITH DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS**

We studied the effect of curcumin on the cardiomyocytes viability, processes of oxidative phosphorylation in the mitochondria of cardiomyocytes, their pro- and antioxidant balance in doxorubicin-induced oxidative stress. It has been revealed that administration of doxorubicin to rats led to a significant increase in the secondary products of lipid peroxidation (TBARS) in mitochondria by 21 and  $H_2O_2$  by 76%, reduction of the enzymatic activity of mitochondrial Mn-SOD by 14% and intensified catalase activity by 80% compared with the control. After combined use of doxorubicin and curcumin the content of TBARS and  $H_2O_2$  increased by 14 and 26%, respectively, the enzymatic activity of catalase decreased by 28%, and mitochondrial Mn-SOD activity intensified by 9%. During the incubation with doxorubicin, the number of live cells decreased by 30.4% and the number of necrotic cells increased by 30.4% relative to control. Coadministration of doxorubicin and curcumin led to augmented cell viability by 8%, while the number of necrotic cells reduced by 8% compared with the use of doxorubicin only. In assessing the parameters of mitochondrial respiration in rats that received injections of doxorubicin active breathing index ( $V_3$ ) fell by 43.8%, the oxidation rate of the contingency of phosphorylation ( $V_3/V_4^{ATP}$ ) decreased by 47% and phosphorylation efficiency index (ADP/O) also declined by 31.7% respectively compared with the control. The combined use of doxorubicin and curcumin improved the indicators of mitochondrial respiration compared to using only doxorubicin:  $V_3$  raised by 25%,  $V_3/V_4^{ATP}$  by 18% and ADP/O by 12% respectively.

Key words: mitochondria; oxidative stress; doxorubicin; curcumin.

<sup>1</sup>*O.O. Bogomolez Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;*

<sup>2</sup>*National Aviation University, Kyiv.*

### **REFERENCES**

1. Valvere V, Inhvatsabaya L, Nu Chau de G. Comparing score of anticancer antibiotics adriamycin and farmorubicin cardiotoxicity. *Cardiology*.1989; 29 (9): 64-6. [Russian]
2. Kovalenko V, Kalinkin N, Vatutin N. *Cytostatics heart injuri*. Donetsk: UkrNTEK. 2002; 350. [Russian]
3. 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.

4. Baraboi V, Sutkovoy D. The oxidation-antioxidant homeostasis in normal and pathological conditions. Ed. Acad. Ukrainian Academy of Medical Sciences Y Zozulya. K.: Chernobylinterinform. 1997; 420. [Russian]
5. 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.
6. Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23:775-82.
7. 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.
8. Srivastav G and Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 14:22-7.
9. Ströfer M, Jelkmann W, Depping R. Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells: the role of HIF. *Strahlenther Onkol.* 2011 Jul; 187(7):393-400.
10. Swamy AV, Gullaiya S, Thippeswamy A, et al. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2012; 44:73-7.
11. Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Zekry ZK et al. The role of Curcuma longa against doxorubicin (adriamycin)-induced toxicity in rats. *J Med Food.* 2009; 12:394-402.
12. Perrone D, Ardito F, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *ExpTherMed.* 2015 Nov; 10(5):1615-23.
13. Kondrashova MN, Fedotcheva NI, Saakyan IR et al. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. *Mitochondrion.* 2001 Oct; 1(3):249-67.
14. Chance B, Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *AdvEnzymol.* 1956; 17:65-134.
15. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 1967; 10:41-7.
16. Lowry O, Rosebrough N, Fazz A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *JBiolChem.* 1951; 193(1):265-75.
17. 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. *ExpClinCardiol.* 2009; 14(2):57-61.
18. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method of determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern Methods in Biochem.* 1977; 66-8. [Russian].
19. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system. *EurJBiochem.* 1984; 141: 69-74.
20. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *JBiolChem.* 1972; 247(10):3170-5.
21. Koroljuk M, Ivanov L, Mayorov I, Tokarev V. Method for determination of catalase activity. *LabBusiness.* 1988; 1:16-9. [Russian].
22. Wang J, Ma J, Giffard R. Overexpression of copper/zinc superoxidedismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.* 2005;38(8):1112-8.
23. Menshchikova E, Zenkov N. Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes. *Adv. Mod. Biol.* 1993; 113(4):442-53.
24. 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. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 05.09.2016*

# Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity

T.M. Falalyeyeva<sup>1</sup>, I.V. Leschenko<sup>1</sup>, T.V. Beregova<sup>1</sup>, L.M. Lazarenko<sup>1,2</sup>, O.M. Savchuk<sup>1</sup>, L.M. Sichel<sup>2</sup>, O.I. Tsyryuk<sup>1</sup>, T.B. Vovk<sup>1</sup>, M.Ya. Spivak<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine;

<sup>2</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;

<sup>3</sup>LCL «Diaprof», Kyiv, Ukraine, e-mail: LazarenkoLM@yandex.ua

*The aim of this study was to investigate the effect of probiotic strains of Lactobacillus casei IMV B-7280, Bifidobacterium animalis VKL, B. animalis VKB on the pro- and anti-inflammatory cytokines production in Wistar male rats with monosodium glutamate (MSG)-induced obesity. It was established that neonatal administration of MSG to rats leads to increasing levels of the interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-12, and to decreasing of the IL-4, IL-10 and tumor growth factor (TGF)- $\beta$  levels in the blood serum. After administration of the B. animalis VKL - B. animalis VKB - L. casei IMV B-7280 composition to obese rats the level of the IL-1 $\beta$  in blood serum wasn't differ from that in the obese rats, that didn't receive of the probiotic bacteria. But there was no statistically significant difference comparing with intact rats. The level of the IL-12B p40 in blood serum was decreased under influence of the B. animalis VKL - B. animalis VKB - L. casei IMV B-7280 composition (18.9 %,  $p < 0.05$ ) and B. animalis VKL (10.5 %,  $p < 0.05$ ) compared with obese rats, not receiving probiotic bacteria, but remained higher than in intact animals. After administration to obese rats of the B. animalis VKL - B. animalis VKB - L. casei IMV B-7280 composition the levels of the IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  increased in blood serum comparing with obese rats, not receiving probiotic bacteria. The level of the IL-10 also increased under influence of the B. animalis VKB, and IL-4 – under influence of the L. casei IMV B-7280. Our results suggest that these probiotic bacteria and probiotic composition are able to down-regulation the inflammation in rats with MSG-induced obesity but the strongest anti-inflammatory effects have probiotic composition. The ability of lactobacilli and bifidobacteria to alter the pro- and anti-inflammatory cytokines production, opens perspectives to create new treatments for obesity and metabolic syndrome based on probiotics.*

Key words: obesity; monosodium glutamate; Lactobacilli; Bifidobacteria; cytokines; rats.

## INTRODUCTION

World Health Organization considers obesity as a global epidemic today. The onset of obesity is a complex process that involves genetic and environmental factors. It is often associated with metabolic syndromes (hyperglycemia, hypertriglyceridemia, dyslipidemia and hypertension) and development of several chronic complications such as cardiovascular diseases, type II diabetes, premature death, diseases of musculoskeletal system, hepatobiliary disease, and various tumor sites, including lung cancer,

breast cancer, uterine and ovarian cancer etc. [1, 2].

Obesity is a pathological state in neuroimmunomodulation. Thus, in the case of obesity, we can observe both systemic and vascular chronic low-grade inflammation in fat tissue, liver, and intestines, which is accompanied with the production of pro-inflammatory cytokines and other inflammatory markers in response to changes in metabolic homeostasis associated with metabolic overload of cell nutrients [3].

Additionally, monosodium glutamate (MSG)

© T.M. Falalyeyeva, I.V. Leschenko, T.V. Beregova, L.M. Lazarenko, O.M. Savchuk, L.M. Sichel, O.I. Tsyryuk, T.B. Vovk, M.Ya. Spivak

induces the dysfunction of specific hypothalamic neurons and the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis that lead to violating of anorexigenic and thermogenic signals generated by such hormones as leptin and insulin, as well as rising of the corticosterone levels [4, 5]. This, in turn, may lead to abnormal regulation of body weight and obesity [4], that can also enhance the expression of inflammatory cytokines [6].

In the case of obesity, adipocytes secrete less amount of anti-inflammatory adiponectin. And we observed the increased expression of genes encoding cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators through the activation of transcription factors (nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), protein activator-1 (AP-1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3), and others) [7, 8]. Under such conditions, the pro-inflammatory tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukine-6 (IL-6), macrophage chemoattractants (MCP-1 and NAMPT), and leptin are produced to induce the pro-inflammatory response of immune cells. The immune cells (macrophages, neutrophils, and T-lymphocytes) secrete cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and interferon- $\gamma$ ) in fat tissue. This can alter lipid storing in adipocytes, lipolysis, insulin response, glucose metabolism and adipokine production, and lead to ectopic fat deposition and systemic inflammation. Leptin plays a role in the activation of the immune system in obesity, therefore, may be one of the mediators, responsible for the low-grade systemic inflammation. It should be noted that leptin stimulates CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes to produce the interferon- $\gamma$ , which induces the adipocyte MHC II expression [2, 9]. However, some anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and receptor antagonist IL-1 (IL-1RA) decrease [10].

Most studies established the imbalance of gut microbiota both in humans and in mice with obesity [11]. In the case of obesity the increased Firmicutes: Bacteroidetes ratio was found, and increased intestinal permeability was observed. After translocation of gut bacteria to other organs such as liver or adipose tissue, the bacterial

lipopolysaccharides (LPS) in the bloodstream and organs activate pro-inflammatory cytokines production through activation of the Toll-like receptor 4 [2].

Increasing of the pro-inflammatory cytokines production together with rising of the corticosterone level in case of obesity is associated with obesity-related complications such as insulin resistance, hyperlipidemia, atherosclerosis [12, 13]. Therefore, the influence on the pro-inflammatory cytokine production is an important strategy for the integrated personalized treatment of patients with obesity.

Certain probiotic bacteria were recently tested for their ability to affect obesity and metabolic syndrome. It was shown that probiotic strains are able to improve some biomarkers of obesity, including an imbalance in gut microbiota, hyperlipidemia, hyperglycemia, oxidative stress and inflammation. The use of probiotics is justified by the fact that in the case of obesity, the number of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in the intestines reduces dramatically and gut microbiota have an important role in the regulation of the energy homeostasis and fat storing. In the same time, such altered gut microbial ecosystems are associated with increased prevalence of metabolic and immune disorders in animals and humans [14, 2, 11]. These results suggest the potential using of probiotics in order to alleviate the occurrence of metabolic diseases by less radical approach comparing with drugs or hormone therapy. We showed that preliminary selected and characterized probiotic strains of *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *B. animalis* VKB and their various compositions have high ability to balance immune response to infectious diseases [15] and are able to effectively prevent MSG-obesity in rats [16].

Thus, the aim of this study was to investigate the influence of probiotic strains of *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB (separately) and the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280



composition on the pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with MSG-induced obesity.

## METHODS

In our experiment, we used newborn rats (Wistar) (n = 60). We administered monosodium glutamate (MSG) to the animals in a dose of 4 mg/g of body weight subcutaneously on the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day of life. Within 4 months after birth, rats with visceral obesity were on a standard diet.

In our study we used probiotic strains of *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL and *B. animalis* VKB that were previously isolated from the intestines of healthy people and the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 (1:1:2) composition. *L. casei* IMV B-7280 is stored at the Depositary of the microorganisms at the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Administration of probiotic strains in a dose of  $5 \times 10^9$  CFU/kg (50 mg/kg) intragastrically (i.g.) into obese rats was started at the age of 4 weeks just after weaning and lasted 3 months, wherein 2 weeks of introduction were alternated with 2-week break. The experiment lasted 4 months. Rats were split into 6 groups of 10 animals. Wistar rats were split into 6 experimental groups (10 rats in each): 1) intact rats (control), 2) rats which received MSG (the MSG-group), 3) rats which received the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 (1:1:2) composition (the MSG-group + probiotic composition), 4) rats which received MSG and *B. animalis* VKL (the MSG-group + *B. animalis* VKL), 5) rats which received MSG and *B. animalis* VKB (the MSG-group + *B. animalis* VKB), and 6) rats which received MSG and *L. casei* IMV B-7280 (the MSG-group + *L. casei* IMV B-7280).

Serum cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-12Bp40, IL-4, IL-10, interferon- $\gamma$  and tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )) were quantified by ELISA immune

assays with primary and secondary antibodies from Santa Cruz Biotechnology (USA).

All received digital data was processed through analysis of variance by using the Epi Info software (version 8.0) and "Statistica, 8.0". Obtained results were tested for normality of distribution using F Shapiro-Wilk test. If the data did not meet the normal distribution law, the comparison of two unrelated samples was performed by Mann-Whitney test. In the normal distribution, comparison of the difference between control and experimental measurements was performed using Student t-test for independent samples. The critical level of statistical significance for all tests was  $P < 0.05$ . Data is represented as mean value (M) and the average standard error (m) [17].

Ministry of Education and Science of Ukraine supported this study (Project No. F64/32-2016 (16DF036-03), 12.04.2016).

## RESULTS AND DISCUSSION

In our study, administration of MSG to newborn rats was accompanied with the increasing production of IL-1 $\beta$  and IL-12Br40 pro-inflammatory cytokines (Table 1). We observed increased levels of the IL-1 $\beta$  (22.4 %,  $P < 0.05$ ) and IL-12 (61.2 %,  $P < 0.05$ ) in blood serum of obese rats that indicates strengthening of the inflammatory processes in the case of MSG-induced obesity. On the other hand, the interferon- $\gamma$  production was not changed.

The probiotic strains of *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB and *L. casei* IMV B-7280 did not affect the level of the IL-1 $\beta$  in blood serum of obese rats comparing with the MSG-group. The level of the IL-1 $\beta$  in blood serum of these rats was 17.2 % ( $P < 0.05$ ), 23.6 % ( $P < 0.05$ ) and 20.6 % ( $P < 0.05$ ) higher vs intact rats.

However, after administration of the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition to obese rats the level of the IL-1 $\beta$  did not differ from that in the MSG-group, but in the probiotic composition-group, there were no significant differences comparing

**Table 1. Concentration of the pro-inflammatory cytokines in the serum of the obese rats (M+m, n = 10)**

Groups of the rats	Level of the cytokines in serum, pg/ml		
	IL-1 $\beta$	IL-12B p40	interferon- $\gamma$
Intact rats	0.472 $\pm$ 0.014	0.808 $\pm$ 0.025	0.299 $\pm$ 0.013
MSG-group	0.578 $\pm$ 0.032*	1.302 $\pm$ 0.046*	0.317 $\pm$ 0.019
MSG-group + probiotic composition	0.510 $\pm$ 0.022	1.057 $\pm$ 0.041*/**	0.304 $\pm$ 0.018
MSG-group + <i>B. animalis</i> VKL	0.553 $\pm$ 0.022*	1.166 $\pm$ 0.040*	0.300 $\pm$ 0.011
MSG-group + <i>B. animalis</i> VKB	0.583 $\pm$ 0.019*	1.183 $\pm$ 0.077*	0.306 $\pm$ 0.008
MSG-group + <i>L. casei</i> IMV B-7280	0.569 $\pm$ 0.022*	1.178 $\pm$ 0.101*	0.299 $\pm$ 0.008

\*P < 0.05 compared with intact rats, \*\* P < 0.05 compared with MSG-group

with intact rats. That may indicate decreasing the expression of this pro-inflammatory cytokine in the case of treating with the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition.

The level of the IL-12B p40 in blood serum was decreased after administration of the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition (18.9 %, P < 0.05) and *B. animalis* VKL (10.5 %, P < 0.05) vs the MSG-group. However, the level of the IL-12B p40 in blood serum of these rats remained higher than in intact animals. *B. animalis* VKB and *L. casei* IMV B-7280 did not affect the level of this pro-inflammatory cytokine in blood serum of obese rats, which exceeded these indicators in intact rats. As shown in Table 1, the interferon- $\gamma$  production was not changed after the administration of the probiotic strains and probiotic composition to obese rats. Therefore, the interferon- $\gamma$  level remained on the level of this cytokine in blood serum of the MSG-group and the control group.

In the case of MSG-induced obesity, the level of anti-inflammatory cytokines such

as IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  in blood serum significantly reduced (30.6 %; 28.5 % and 14.9 %, respectively, P < 0.05) comparing with intact rats (Table 2). This data indicates a weakening of the body's ability to resist inflammation under this pathology.

The IL-4 level in blood serum increased under the influence of *B. animalis* VKL (on 21.7 %, P < 0.05), *B. animalis* VKB and *L. casei* IMV B-7280 (18.0 %, P < 0.05) (separately) and the probiotic composition (27.2 %, P < 0.05) comparing with the MSG-group. After administration of the probiotic composition to obese rats, the IL-4 level increased to the level of this cytokine in blood serum of intact animals. However, while using *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB or *L. casei* IMV B-7280 separately the level of this anti-inflammatory cytokine was lower than in intact animals.

Studying the IL-10 production in animals with MSG-induced obesity, we found a similar tendency. Thus, the level of this anti-inflammatory cytokine in blood serum increased under the influence of *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB and the probiotic composition comparing with the MSG-

**Table 2. Concentration of the anti-inflammatory cytokines in the serum of the obese rats (M+m, n = 10)**

Groups of the rats	Level of the cytokines in serum, pg/ml		
	IL-4	IL-10	TGF- $\beta$
Intact rats	0.446 $\pm$ 0.026	0.311 $\pm$ 0.014	0.374 $\pm$ 0.019
MSG-group	0.309 $\pm$ 0.017*	0.222 $\pm$ 0.013*	0.318 $\pm$ 0.020*
MSG-group + probiotic composition	0.393 $\pm$ 0.018 **	0.334 $\pm$ 0.020 **	0.399 $\pm$ 0.026 **
MSG-group + <i>B. animalis</i> VKL	0.376 $\pm$ 0.018 */**	0.280 $\pm$ 0.008 */**	0.381 $\pm$ 0.018 **
MSG-group + <i>B. animalis</i> VKB	0.331 $\pm$ 0.014*	0.284 $\pm$ 0.018 **	0.324 $\pm$ 0.011 *
MSG-group + <i>L. casei</i> IMV B-7280	0.365 $\pm$ 0.014 */**	0.260 $\pm$ 0.024*	0.359 $\pm$ 0.013

\*P < 0.05 compared with intact rats, \*\* P < 0.05 compared with MSG-group



group (26.0 %; 27.6 % and 50.0 %, respectively,  $P < 0.05$ ). However, *L. casei* IMV B-7280 did not affect the IL-10 production.

The TGF- $\beta$  level was increased in blood serum of obese rats which received the probiotic composition (25.5 %,  $P < 0.05$ ) or *B. animalis* VKL (on 19.8 %,  $P < 0.05$ ) comparing with the MSG-group. *B. animalis* VKB had no significant effect on the level of this anti-inflammatory cytokine, which was lower (13.2 %,  $P < 0.05$ ) than in intact animals. The TGF- $\beta$  production in rats with MSG-induced obesity was not changed under the influence of *L. casei* IMV B-7280. It should be noted that the amount of the IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  increased to the levels in intact rats only after administration of the probiotic compositions to MSG-obese rats, but not probiotic strains separately.

Hence, our results suggest the anti-inflammatory effect of *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB and *L. casei* IMV B-7280 (separately) and the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition in rats with MSG-induced obesity. Nevertheless, the most pronounced effect was obtained after administration of the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition to obese rats, it reduced the level of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-12Br40 comparing with the MSG-group and restored the level of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  to the levels in intact rats. This data indicates the strong anti-inflammatory effect of the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition in the case of administration it to MSG-obese rats.

We had previously shown [16] such biomarkers of MSG-induced visceral obesity in newborn rats: increased body mass index, Lee index, mass of the visceral adipose tissue and decreased body length; abnormalities in the lipid and carbohydrate metabolism as well as decreased adiponectin level in blood serum and increased leptin level in adipose tissue. In this study, we established that neonatal administration of MSG to newborn rats lead to increased

pro-inflammatory cytokines production such as IL-1 $\beta$  and IL-12Br40. In contrast, the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10, and TGF- $\beta$  in rats with MSG-induced obesity decreased. Our results indicated the inflammation development in rats with MSG-induced obesity. It should be noted that in the case of obesity, chronic low-grade inflammation, which comes out in increased levels of acute-phase proteins and pro-inflammatory mediators in blood serum [18], plays a critical role in the development of cardiovascular dysfunction [19], insulin resistance and type II diabetes [7,20].

It was found that the IL-1 $\beta$ , which is primed by high-fat diet (HFD) and is cleaved through the NLRP3 inflammasome complex [21, 22], and which production in fat tissue is associated with the TLR4 receptor and nuclear factor- $\kappa$ B activation [23, 24], directly influences the peripheral insulin resistance and type II diabetes [20, 25, 21, 26, 22]. In our study, glucose and insulin levels in blood serum, and HOMA insulin resistance index [16], as well as IL-1 $\beta$  and IL-12Br40 production were also increased in rats with MSG-induced obesity comparing with intact rats. These parameters of carbohydrate metabolism indicate the development of insulin resistance and type II diabetes in rats with MSG-induced obesity, which is connected with low-grade inflammation development.

As we demonstrated, probiotic strains *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL and *B. animalis* VKB and the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition are able to improve some biomarkers of MSG-induced visceral obesity in Wistar male rats: anthropometric parameters were improved, mass of the visceral adipose tissue was decreased, lipid and carbohydrate metabolism was improved, adiponectin level was increased, and leptin level in adipose tissue was decreased comparing with the MSG-group. The probiotic composition more effectively prevents monosodium glutamate-induced obesity in rats [16].

In this article, we are describing results of the study, which demonstrate that improving

MSG-induced visceral obesity biomarkers in rats under the influence of *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL and *B. animalis* VKB (separately) and their composition is accompanied with changes in pro- (IL-1 $\beta$ , IL-12Br40) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) cytokines production. While using the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition for treatment we observed a tendency towards decreasing of the IL-1 $\beta$  production and significant decreasing of the IL-12Br40 production in the MSG-group comparing with rats with MSG-obesity which did not receive the probiotic composition. However, the level of the IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  production increased (vs the level in intact rats). But the application of *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB (separately) for therapeutic purposes was less effective. These results suggested that the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition is able to restore the inflammation in rats with MSG-induced obesity, but in order to reduce chronic inflammation we need a prolonged use. The anti-inflammatory effect of probiotic bacteria correlated with decreasing of the visceral fat mass as well as a warning to development of the insulin resistance and type II diabetes development in MSG-induced obesity, as well as improved lipid metabolism comparing with rats which were not treated using probiotic bacteria.

Therefore, as we recently established, glucose and insulin levels in blood serum and HOMA insulin resistance index in the MSG-group dropped under the influence of probiotic bacteria, but the insulin level in blood serum and HOMA insulin resistance index did not restore to those levels in intact animals [16]. Under the influence of probiotic strains and probiotic composition total cholesterol, very low-density lipoprotein and high-density lipoprotein levels decreased, and the low-density lipoprotein level increased comparing with those in the MSG-group. However, the total cholesterol level reduced to the control level only after using the probiotic composition for treatment.

The triglycerides level reduced comparing with the MSG-group only under the influence of the probiotic composition and *L. casei* IMV B-7280.

In the case of MSG-obesity the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition has a stronger effect on carbohydrate and lipid metabolism parameters as well as stronger anti-inflammatory effect comparing with probiotic bacteria (separately). We also found [16] decreased leptin concentration in adipose tissue in rats with MSG-induced obesity which received this probiotic composition. But the adiponectin concentration in blood serum of these rats was not changed. In the case of MSG-obesity in rats, the anti-inflammatory effect of the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition and probiotic bacteria (separately) perhaps related to gut microbiota modulating, but further studies are required to depose to this fact.

According to other authors [27], in the case of high fat diet-induced obesity in young male Sprague-Dawley rats, a probiotic, VSL #3 (a multistrain preparation composed of *Streptococcus thermophilus* and several species of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*) has anti-oxidative and anti-inflammatory effects, accompanied with the alteration of the lipid peroxidation and lipid metabolism. *L. sakei* OK67 improves high-fat diet (HFD)-induced obesity in mice and hyperglycemia by reducing inflammation through suppression the HFD-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression and nuclear factor- $\kappa$ B activation in the colon as well as inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B activation in LPS-stimulated peritoneal macrophages [23]. *L. casei* str. Shirota also shows anti-inflammatory effects in young and old obese rats through changes in the IGFBP-3, IL-6, and IL-12 levels [28]. The pro-inflammatory IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  cytokine production decreases and anti-inflammatory IL-10 cytokine secretion increases after administration of *L. plantarum* TN8 to obese rates, which correlates with improving in hepatic and urinary functions of these rats through inducing the decrease in alanine

aminotransferase, gamma glutamyl transferase, plasmatic triglycerides, total cholesterol concentrations, creatinine, urea, and body [29].

Our data confirm multiple mechanisms of therapeutical effects of probiotic strains *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL and *B. animalis* VKB and the *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 composition in rats with MSG-induced obesity. The probiotic composition was more effective than probiotic strains separately. We can explain this by the fact that all markers of obesity that we studied, including pro- and anti-inflammatory cytokine production, effectively improved only after using the probiotic composition in order to treat rats with obesity. These data suggest the feasibility of developing recommendations for inclusion of *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMV B-7280 probiotic composition in the complex scheme for treating obesity. The ability to alter pro- and anti-inflammatory cytokines production opens new perspectives for the development of probiotic-based treatment for obesity and metabolic syndrome. The immunobiotics in the long term can also be used for the treatment of type II diabetes, cardiovascular diseases, musculoskeletal disorders, liver fibrosis, neurodegenerative diseases, atherosclerosis, and cancer.

Т.М. Фалалєєва<sup>1</sup>, І.В. Лещенко<sup>1</sup>, Т.В. Берегова<sup>1</sup>, Л.М. Лазаренко<sup>1,2</sup>, О.М. Савчук<sup>1</sup>, Л.М. Сішел<sup>2</sup>, О.І. Цирюк<sup>1</sup>, Т.В. Вовк<sup>1</sup>, М.Я. Співак<sup>2,3</sup>

## ПРОБИОТИЧНІ ШТАМИ ЛАКТОБАЦИЛ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗМІНЮЮТЬ ПРОДУКЦІЮ ПРО- ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ЩУРІВ З ОЖИРІННЯМ, ІНДУКОВАНИМ ГЛУТАМАТОМ НАТРІЮ

Метою дослідження було визначення впливу пробіотичних штамів *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *B. animalis* VKB (окремо) та композиції *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 на продукцію про- і протизапальних цитокінів у сироватці крові самців щурів лінії Вістар з ожирінням, індукованим глутаматом натрію (ГН). Встановлено, що неонатальне введення ГН щурам призводило до збільшення вмісту інтерлейкіну (ІЛ)-1β і ІЛ-12Вр40, а також до зменшення ІЛ-4, ІЛ-10 і фактора росту пухлини (ФРП)-β. Після ве-

дення щурам з ожирінням композиції *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 вміст ІЛ-1β не відрізнявся від такого у щурів з ожирінням, які не отримували пробіотичні бактерії, але не було статистично значущої різниці порівняно з інтактними тваринами. Вміст ІЛ-12Вр40 зменшувався під впливом композиції *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 (18,9 %;  $P < 0,05$ ) та *B. animalis* VKL (10,5 %;  $P < 0,05$ ) порівняно зі щурами з ожирінням, що не отримували пробіотичні бактерії, але залишався вищим, ніж в інтактних тварин. Після введення щурам з ожирінням композиції *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 та *B. animalis* VKL вміст ІЛ-4, ІЛ-10 та ФРН-β підвищувався порівняно зі щурами з ожирінням, що не отримували пробіотичні бактерії. Вміст ІЛ-10 підвищувався також під впливом *B. animalis* VKB, а ІЛ-4 – під впливом *L. casei* IMB B-7280. Отримані нами результати свідчать про те, що ці пробіотичні бактерії і пробіотична композиція здатні нормалізувати запалення у щурів з ожирінням, індукованим ГН, проте найсильнішу протизапальну дію мала пробіотична композиція. Здатність лактобацил і біфідобактерій впливати на продукцію про- і протизапальних цитокінів відкриває перспективи для створення нових методів лікування ожиріння і метаболічного синдрому на основі пробіотиків. Ключові слова: ожиріння; глутамат натрію; *Lactobacilli*; *Bifidobacteria*; цитокіни; щури.

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка;

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, <sup>3</sup>ТОВ «Діапроф», Київ

Т.М. Фалалєєва<sup>1</sup>, І.В. Лещенко<sup>1</sup>, Т.В. Берегова<sup>1</sup>, Л.Н. Лазаренко<sup>1,2</sup>, А.Н. Савчук<sup>1</sup>, Л.М. Сішел<sup>2</sup>, Е.І. Цирюк<sup>1</sup>, Т.В. Вовк<sup>1</sup>, Н.Я. Співак<sup>2,3</sup>

## ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ ЛАКТОБАЦИЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ ИЗМЕНЯЮТ ПРОДУКЦИЮ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ, ИНДУЦИРОВАННЫМ ГЛУТАМАТОМ НАТРИЯ

Целью исследования было определение влияния пробиотических штаммов *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *B. animalis* VKB (отдельно) и композиции *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у самцов крыс линии Вистар с ожирением, индуцированным глутаматом натрия (ГН). Установлено, что неонатальное введение ГН крысам приводило к увеличению содержания интерлейкина (ИЛ)-1β и ИЛ-12Вр40, а также к уменьшению уровня ИЛ-4, ИЛ-10 и фактора роста опухоли (ФРО)-β. После введения крысам с ожирением композиции *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* IMB B-7280 содержание ИЛ-1β

не отличался от такового у крыс с ожирением, которые не получали пробиотические бактерии, но не было статистически достоверной разницы по сравнению с интактными животными. Уровень ИЛ-12Вр40 уменьшался под влиянием композиции *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* ИМВ В-7280 (18,9 %;  $P < 0,05$ ) или *B. animalis* VKL (10,5 %;  $P < 0,05$ ) по сравнению с крысами с ожирением, не получавшими пробиотические бактерии, но оставался выше, чем у интактных животных. После введения крысам с ожирением композиции *B. animalis* VKL - *B. animalis* VKB - *L. casei* ИМВ В-7280 или *B. animalis* VKL содержание ИЛ-4, ИЛ-10 и ФНО- $\beta$  повышалось по сравнению с крысами с ожирением, не получавших пробиотические бактерии. Уровень ИЛ-10 повышался также под влиянием *B. animalis* VKB, а ИЛ-4 – под влиянием *L. casei* ИМВ В-7280. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что эти пробиотические бактерии и пробиотическая композиция способны нормализовать воспаления у крыс с ожирением, индуцированным ГН, однако более сильное противовоспалительное действие имела пробиотическая композиция. Способность лактобацилл и бифидобактерий влиять на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов открывает перспективы для создания новых методов лечения ожирения и метаболического синдрома на основе пробиотиков.

**Ключевые слова:** ожирение; глутамат натрия; *Lactobacilli*; *Bifidobacteria*; цитокины; крысы.

<sup>1</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка;

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев;

<sup>3</sup>ООО «Диапроф», Киев

## REFERENCES

1. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366 (9491): 1059–62.
2. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med*. 2016; 8 (1): 42. doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.
3. Esposito Emanuela, Anna Iacono, Giuseppe Bianco, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J. Nutr*. 2009; 139 (5): 905–11.
4. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytok Network*. 2006; 17 (1): 4–12.
5. Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15 (3): 189–93.
6. Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. Minireview: glucocorticoids-food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*. 2004; 145 (6): 2633–38.
7. Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, Lin J, Zou J, Liu JZ, et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab*. 2013; 17 (3): 411–22.
8. Glantz Stanton A., *Primer of Biostatistics*. 4th ed., McGraw-Hill Inc., New York; 1997. Lee B-C, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842 (3): 446–62.
9. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabet Res Clinical Pract*. 2014; 105 (2): 141–50.
10. Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, et al. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem*. 2008; 19 (6): 371–75.
11. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabet Care*. 2010; 33 (10): 2277–84.
12. Gomez-Merino D., Drogou C., Guezennec C.Y., Chennaoui M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine*. 2007; 40 (1): 23–9.
13. Guizarro A, Laviano A, Meguid MM. Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog Brain Res*. 2006; 153: 367–405.
14. Aggarwal J, Swami G, Kumar M. Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: An Update. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7(1): 173–77.
15. Lazarenko L, Babenko L, Sichel LS, Pidgorskyi V, Mokrozub V, Voronkova O, et al. Antagonistic action of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in relation to *Staphylococcus aureus* and their influence on the immune response in cases of intravaginal staphylococcosis in mice. *Probiot Antimicrob Proteins*. 2012; 4 (2): 78–89.
16. Lim SM, Jeong JJ, Woo KH, Han MJ, Kim DH. *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. *Nutr Res*. 2016; 36 (4): 337–48.
17. Glantz Stanton A., *Primer of Biostatistics*. 4th ed., McGraw-Hill Inc., New York; 1997.
18. Cao L, Qin X, Peterson MR, Haller SE, Wilson KA, Hu N, et al. CARD9 knockout ameliorates myocardial dysfunction associated with high fat diet-induced obesity. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; 92:185–95.
19. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol*. 2013; 2013:678159. doi: 10.1155/2013/678159. Epub 2013 Apr 17.
20. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tananahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a



- mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 2010; 11 (10): 897–904.
21. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010; 12 (6): 593–605.
  22. Kaya MS, Bayiroglu F, Mis L, Kilinc D, Comba B. In case of obesity, longevity-related mechanisms lead to anti-inflammation. *Age (Dordr).* 2014; 36 (2): 677–87.
  23. Savcheniuk OA, Virchenko OV, Falalyeyeva TM, Babenko LP, Lazarenko LM et al. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. *EPMA J.* 2014; 5:2 doi:10.1186/1878-5085-5-2.
  24. Yang W, Cao M, Mao X, Wei X, Li X, Chen G, et al. Alternate-day fasting protects the livers of mice against high-fat diet-induced inflammation associated with the suppression of Toll-like receptor 4/nuclear factor  $\kappa$ B signaling. *Nutr Res.* 2016; 36 (6): 586–93.
  25. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011; 17 (2): 179–88.
  26. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM, Reynolds CM, Klinger R, Healy NP, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes.* 2015; 64 (6): 2116–28.
  27. Lalitha V, Pal GK, Pal P, Babu MS. Neuroimmunomodulation in obesity. *Internat J Clin Exp Physiol.* 2015; 2(2): 97-102.
  28. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol.* 2011; 12 (5): 408–15.
  29. Salah Ben R, Trabelsi I, Hamden K, Chouayekh H, Bejar S. *Lactobacillus plantarum* TN8 exhibits protective effects on lipid, hepatic and renal profiles in obese rat. *Anaerobe.* 2013; 23: 55-61.

Received 20.10.2016

# Вікові та статеві особливості показників мінеральної щільності кісткової тканини щурів

Н.В. Григор'єва<sup>1</sup>, В.В. Поворознюк<sup>1</sup>, І.В. Гопкалова<sup>2</sup>, Т.В. Орлик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ;

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків; e-mail: crystal\_ng@ukr.net

*Прижиттєва оцінка мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) та її мінеральної насиченості (МНКТ) дає об'єктивну характеристику можливих темпів втрати кісткової тканини з віком і при різних захворюваннях, а також відповіді на лікування засобами, які впливають на метаболізм кісткової тканини. Дослідження проведене на 376 білих щурах обох статей лінії Вістар, розподілених на 12 вікових груп з використанням методики двофотонної рентгенівської денситометрії. Вивчення МЩКТ та МНКТ залежно від віку й статі встановило відсутність «піка» кісткової маси в щурів обох статей. Як у самців, так і в самиць з віком виявлено достовірне збільшення МЩКТ, більшою мірою в самців. Ці відмінності відзначені у всіх вікових групах тварин. Встановлені вікові й статеві особливості МНКТ різних відділів скелета. У самиць вірогідний приріст МЩКТ і МНКТ виявлено у віці з 1,5 до 2 міс (на 33%), з 2 до 3 міс – на 12,5%. У самців приріст МЩКТ встановлено на 1 міс пізніше, крім того він був менш виражений (з 2 до 3 міс – на 27%, з 4 до 5 міс – на 5%). В інших вікові періоди динаміка МЩКТ мала тільки тенденцію до росту, проте достовірних відмінностей між групами не виявлено. Отримані значення МЩКТ і МНКТ та їх вікові й статеві особливості можуть бути використані для проведення подальших досліджень в остеології як референтні при моделюванні експериментального остеопорозу в щурів і вивченні відповіді на антиостеопоротичні засоби. Ключові слова: щури; мінеральна щільність кісткової тканини; мінеральна насиченість кісткової тканини; площа кісткової тканини; вік; стать.*

## ВСТУП

Нині однією з важливих медико-соціальних проблем, особливо в пацієнтів літнього й старечого віку, є системний остеопороз з його грізними ускладненнями – переломами кісток різної локалізації. Завдяки значному прогресу біології в останні роки існує можливість аналізувати дію багатьох чинників, котрі впливають на метаболізм кісткової тканини, як *in vivo*, так і *in vitro*, що призвело до більш активного використання експериментального моделювання на тваринах [1–6]. Проте існуючі сучасні методи оцінки стану й метаболізму кісткової тканини є інвазивними (гістоморфометричне дослідження, визначення біохімічних маркерів кісткового ремоделювання в сироватці крові тощо) і неінвазивними (комп'ютерна томографія, двофотонна

рентгенівська денситометрія – ДРА), що може обмежувати оцінку результатів дослідження в динаміці експерименту [1, 7, 8].

Аналіз показників структурно-функціонального стану кісткової тканини, який можна провести при використанні ДРА, дає об'єктивну характеристику можливих темпів її втрати з віком і при різних захворюваннях, а також відповіді на лікування різними антиостеопоротичними засобами [1]. Проте недостатньо є даних щодо вікових і статевих особливостей показників ДРА в щурів, що пояснюється, зокрема тим, що не в усіх рентгенівських денситометрах є програма для визначення цих показників у різних експериментальних тварин. Щури є однією з найбільш зручних і доступних моделей для відтворення втрати кісткової тканини, зокре-



ма остеопенії та остеопорозу. Вже понад 150 років їх використовують у експериментальних дослідженнях в геронтології, фізіології, фармакології, ортопедії й травматології та інших галузях медицини [1, 9, 10].

Метою нашого дослідження було вивчення вікових і статевих особливостей мінеральної щільності, мінеральної насиченості та площі кісткової тканини у щурів лінії Вістар.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 376 здорових щурах лінії Вістар у весняно-літній (190 самців і 152 самиць) і осінньо-зимовий періоди (34 самиць), які перебували у віварії ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» при природному освітленні й стандартному раціоні харчування при вільному доступі до їжі (стандартний гранульований комбікорм-концентрат) та води. Тварини були розподілені на 12 вікових груп [10]. Експерименти проводили відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до тварин [11].

Прижиттєве визначення показників структурно-функціонального стану кісткової тканини здійснювали за допомогою двофотонного рентгенівського денситометра «Prodigy» (GE Medical systems, LUNAR, model 8743, 2005; USA; програма «Experimental animals»). Ця програма дає змогу вимірювати в дрібних тварин мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ), мінеральну насиченість кісткової тканини (МНКТ) і площу кісткової тканини (ПКТ) як усього скелета, так і окремих його регіонів (хребет, кістки тазу, передні й задні кінцівки). Фіксували тварини за допомогою спеціального пристрою під ефірним наркозом.

Похибка вимірювання МЩКТ при використанні ДРА становила  $\pm 0,01$  г/см<sup>2</sup>. Згідно з існуючими уявленнями МЩКТ є інтегральним показником міцності кісткової тканини й відображає співвідношення МНКТ і ПКТ. Динамічне вивчення МНКТ дає змогу оці-

нити ступінь зміни мінералізації кісткової тканини залежно від статі й віку тварини, а ПКТ є відображенням ростових процесів у кістковій тканині щурів.

Статистичний аналіз проводили з використанням пакетів програми «Statistica 6.0» Copyright © StatSoft, Inc. 1984-2001, Serial number 31415926535897. Використовували наступні методи статистичного аналізу: перевірка нормальності розподілу кількісних ознак за критерієм Колмогорова-Смірнова, порівняння середніх показників за критерієм t Стюдента. Результати представлені у вигляді  $M \pm m$ . Критичним рівнем значущості при перевірці статистичних гіпотез вважали  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати демонструють, що основні антропометричні показники щурів, зокрема, маса тіла й зріст, мають свої вікові й статеві особливості, що підтверджує дані літературних джерел, згідно до яких, маса тіла самиць щурів збільшується досить швидко до 12 міс. Згодом це збільшення є більш повільним до 27 міс, а потім до 33 міс їх маса тіла знову зменшується. У самиць щурів маса тіла досягає піку до 300-320 г, у самців вона збільшується до 400 г до 12 міс, а потім залишається стабільною [10]. Крім того, нами продемонстровано, що у самців маса тіла більша, ніж у самиць, однак достовірним цей показник стає тільки з 5-місячного віку. Ці результати щодо вікової динаміки маси тіла щурів (табл. 1) також підтверджують існуючі дані літератури щодо співвідношення маси тіла самиць і самців у різних вікових групах.

При аналізі показників структурно-функціонального стану кісткової тканини встановлено, що вірогідні відмінності між показниками самців і самиць реєструються вже в 1,5 міс (табл. 2). У цей період МЩКТ у щурів самців був достовірно вищим, ніж відповідний у самиць, зокрема, за рахунок більш високого рівня її мінералізації при однаковому значен-

Таблиця 1. Маса тіла (г) щурів лінії Вістар в різні вікові періоди (М ± m)

Період життя, вік, міс	Самці		Самиці	
	n	М ± m	n	М ± m
Препубертатний				
1,5 міс	31	88 ± 4	18	76 ± 4*
2 міс	20	100 ± 4	20	95 ± 3
Пубертатний				
3 міс	10	170 ± 6	10	173 ± 7
4 міс	10	189 ± 8	5	176 ± 10
Репродуктивний				
5 міс	15	213 ± 7	15	176 ± 6*
6 міс	5	255 ± 9	10	200 ± 6*
7 міс	20	231 ± 6	40	187 ± 4*
Дорослий				
8 міс	5	276 ± 15	-	-
Зрілий ранній				
12 міс	28	268 ± 8	-	-
Зрілий пізній				
20 міс	18	291 ± 8	15	240 ± 8*
Старий				
24 міс	18	292 ± 6	14	227 ± 12*
25 міс	10	311 ± 8	5	248 ± 9*

\*P < 0,05 щодо значень у самців відповідної вікової групи.

нях ПКТ. До 2 міс достовірних відмінностей параметрів МЩКТ у самців і самиць нами не виявлено, тоді як з 3 по 5 міс МЩКТ у самців був достовірно вищим, ніж у самиць (3 міс – P = 0,004, 4 міс – P = 0,04, 5 міс – P = 0,03). У період виражених старечих змін організму щурів параметри МЩКТ у самиць і самців мають однакові значення, оскільки в цей час у самців збільшення показників МНКТ значно відстає від росту параметрів ПКТ (табл. 2).

Згідно до результатів нашого дослідження МНКТ з 5-місячного віку була достовірно вищою в самців, ніж у самиць, а ПКТ з 6 міс аналогічна закономірність була виявлена і при аналізі результатів ПКТ.

Аналіз вікових особливостей МЩКТ встановив їх приріст у самиць щурів з 1,5 до 2 міс (на 33%, P < 0,0001) і з 2 до 3 міс (на 12,5%, P = 0,009). У самців достовірний приріст МЩКТ виявляли на один місяць пізніше і він був менш вираженим (у період

з 2 до 3 міс – на 27% (P < 0,0001) і з 4 до 5 міс – на 5% (P = 0,04)). В інші вікові періоди динаміка МЩКТ також мала тенденцію до росту, проте достовірних відмінностей між різними групами не виявлено.

З віком МНКТ як у самиць, так і у самців збільшувалась. У останніх вона підвищувалась у період з 1,5 до 2 міс (на 23%, P < 0,0001), з 2 до 3 міс – на 57% (P < 0,0001), з 3 до 4 міс – на 17% (P < 0,02), з 5 до 6 міс – на 20% (P < 0,0001). У самиць достовірні зміни МНКТ встановлено в період з 1,5 до 2 міс – на 51% (P < 0,0001), з 2 до 3 міс – на 51% (P < 0,0001) і з 5 до 6 міс – на 14% (P = 0,006) (див. табл. 2).

Динаміка ПКТ мала ту саму тенденцію, що й МНКТ, тільки менш виражену. У самців щурів у період з 1,5 до 2 міс МНКТ збільшилась на 17% (P < 0,0001), з 2 до 3 міс – на 29% (P < 0,0001), з 3 до 4 міс – на 10% (P = 0,009) і з 5 до 6 міс – на 14% (P = 0,02). У самиць ПКТ

**Таблиця 2. Показники мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ), мінеральної насиченості кісткової тканини (МНКТ) та її площі (ПКТ) у щурів лінії Вістар у різні вікові періоди ( $M \pm m$ )**

Період життя, вік, міс	Самці			Самиці		
	МНКТ, г	МПКТ, г/см <sup>2</sup>	ПКТ, см <sup>2</sup>	МНКТ, г	МПКТ, г/см <sup>2</sup>	ПКТ, см <sup>2</sup>
<b>Препубертатний</b>						
1,5 міс	4,55 ± 0,20	0,078 ± 0,002	57,67 ± 1,23	3,77 ± 0,13*	0,06 ± 0,001*	57,62 ± 1,13
2 міс	5,61 ± 0,20	0,080 ± 0,002	67,23 ± 1,48	5,72 ± 0,24	0,08 ± 0,002	68,20 ± 1,68
<b>Пубертатний</b>						
3 міс	8,86 ± 0,33	0,102 ± 0,002	86,81 ± 1,80	8,64 ± 0,35	0,09 ± 0,003*	87,49 ± 2,04
4 міс	10,36 ± 0,46	0,108 ± 0,002	95,99 ± 2,59	9,74 ± 0,58	0,10 ± 0,003*	92,58 ± 3,91
<b>Репродуктивний</b>						
5 міс	10,46 ± 0,27	0,113 ± 0,006	93,71 ± 2,74	8,92 ± 0,29*	0,098 ± 0,002*	90,45 ± 1,56
6 міс	12,58 ± 0,18	0,118 ± 0,003	107,23 ± 3,29	10,23 ± 0,31*	0,11 ± 0,003	90,75 ± 1,23*
7 міс	11,99 ± 0,45	0,118 ± 0,003	100,76 ± 1,67	10,35 ± 0,32*	0,116 ± 0,002	89,07 ± 1,78*
<b>Дорослий</b>						
8 міс	13,56 ± 1,04	0,125 ± 0,009	108,89 ± 2,63	-	-	-
<b>Зрілий ранній</b>						
12 міс	14,08 ± 0,39	0,126 ± 0,002	111,71 ± 1,98	-	-	-
<b>Зрілий пізній</b>						
20 міс	14,60 ± 0,63	0,128 ± 0,003	113,96 ± 2,87	12,66 ± 0,48*	0,12 ± 0,004	107,55 ± 2,43
<b>Старий</b>						
24 міс	15,37 ± 0,63	0,130 ± 0,003	117,82 ± 2,69	13,64 ± 0,50*	0,13 ± 0,004	104,68 ± 2,11*
25 міс	15,41 ± 0,53	0,125 ± 0,003	122,83 ± 2,55	13,10 ± 0,41*	0,12 ± 0,002	108,78 ± 2,69*

\*P &lt; 0,05 щодо значень у самців відповідної вікової групи.

вірогідно збільшувалася лише в двох вікових періодах: з 1,5 до 2 міс – на 18% і з 2 до 3 міс – на 28%. Надалі спостерігався подібний плавний, але не достовірний приріст ПКТ у всіх вікових групах.

Аналіз МЩКТ різних регіонів скелета виявив ту саму спрямованість змін, що й МЩКТ скелета в цілому (табл. 3). Однак, слід зазначити, що МЩКТ хребта була достовірно вищою, ніж відповідний показник для задніх кінцівок у всіх вивчених вікових групах як у самиць, так і в самців. Мінеральна щільність кісток тазу також була вірогідно нижчою, ніж відповідний показник на рівні хребта, проте ці відмінності були менш виражені. Встановлено, що при старінні щурів (після 20 міс) МЩКТ хребта достовірно зменшувалась як у самців, так і у самиць, а кісток тазу – тільки у самців, а МЩКТ задніх кінцівок у щурів цієї вікової групи не змінювався.

Результати нашого дослідження підтвердили, що порівняно з людиною, для якої характерно формування «піка» кісткової маси до 23-25 років, деякі кістки щурів ростуть протягом усього життя, при чому у ширину цей процес триває, в основному, до 10 міс і відбувається за допомогою періостальних на шарувань. Наші результати підтверджують літературні дані про те, що більшість епіфізарних зон, що забезпечують ріст кісток у довжину, у щурів залишаються відкритими й після 30 міс, а зони росту в тілах поперекових хребців залишаються відкритими тільки до 21 міс [7, 9, 10].

При проведенні дослідження на 34 інтактних самицях у зимовий період були виявлені більш низькі значення МЩКТ порівняно з літнім періодом у тварин одного й того самого віку (табл. 4). Так, МЩКТ у 6-місячних тварин була на 11,1% нижчою (P = 0,006), а у 7-місячних – на 12,6% (P = 0,008). Зменшення

**Таблиця 3. Мінеральна щільність кісткової тканини (МЩКТ, г/см<sup>2</sup>) різних регіонів скелета у щурів у різні вікові періоди (М ± m)**

Період життя, вік, міс	Самці			Самиці		
	Задні кінцівки	Таз	Хребет	Задні кінцівки	Таз	Хребет
<b>Препубертатний</b>						
1,5 міс	0,059 ± 0,001	0,088 ± 0,003*	0,101 ± 0,003***	0,051 ± 0,001	0,077 ± 0,003*	0,087 ± 0,003***
2 міс	0,065 ± 0,001	0,085 ± 0,002*	0,094 ± 0,003***	0,065 ± 0,001	0,084 ± 0,002*	0,100 ± 0,002***
<b>Пубертатний</b>						
3 міс	0,079 ± 0,003	0,119 ± 0,003*	0,127 ± 0,003*	0,083 ± 0,003	0,104 ± 0,004*	0,120 ± 0,004***
4 міс	0,093 ± 0,007	0,119 ± 0,003*	0,128 ± 0,003***	0,085 ± 0,002	0,110 ± 0,003*	0,135 ± 0,004***
<b>Репродуктивний</b>						
5 міс	0,088 ± 0,002	0,120 ± 0,003*	0,131 ± 0,002***	0,083 ± 0,001	0,104 ± 0,003*	0,121 ± 0,003***
6 міс	0,094 ± 0,002	0,135 ± 0,006*	0,146 ± 0,004*	0,097 ± 0,005	0,123 ± 0,004*	0,134 ± 0,004***
7 міс	0,094 ± 0,002	0,130 ± 0,005*	0,155 ± 0,007***	0,094 ± 0,002	0,122 ± 0,003*	0,154 ± 0,004***
<b>Дорослий</b>						
8 міс	0,099 ± 0,003	0,146 ± 0,012*	0,186 ± 0,016***	-	-	-
<b>Зрілий ранній</b>						
12 міс	0,102 ± 0,002	0,144 ± 0,003*	0,155 ± 0,003***	-	-	-
<b>Зрілий пізній</b>						
20 міс	0,104 ± 0,002	0,162 ± 0,006*	0,181 ± 0,007***	0,100 ± 0,004	0,136 ± 0,004*	0,170 ± 0,006***
<b>Старий</b>						
24 міс	0,106 ± 0,002	0,143 ± 0,002*	0,162 ± 0,004***	0,103 ± 0,003	0,133 ± 0,005*	0,143 ± 0,004*
25 міс	0,106 ± 0,004	0,144 ± 0,005*	0,156 ± 0,005*	0,104 ± 0,005	0,127 ± 0,005*	0,137 ± 0,006*

\*P < 0,05 щодо значень МЩКТ задніх кінцівок відповідної вікової та статеві групи. \*\*P < 0,05 щодо значень МЩКТ таза відповідної вікової та статеві групи.

МЩКТ було пов'язано зі збільшенням ПКТ, яке у 7-місячних самиць було достовірним.

Динамічне вивчення показників МЩКТ, МНКТ і ПКТ у групі самиць, досліджених з листопада по січень, виявило достовірне зниження МЩКТ в 1,9 раза в кінці січня за рахунок різкого й вірогідного збільшення ПКТ на тлі менш вираженого, хоча й достовірного підвищення МНКТ – в 1,56 раза (табл. 5). Виявлені нами зміни повинні, очевидно, врахо-

уватися при плануванні експериментальних досліджень на щурах у зимовий період часу.

Таким чином, вивчення вікових і статевих особливостей МЩКТ у щурів лінії Вістар виявило відсутність «піка» кісткової маси в загальноприйнятому сенсі при наявності чотирьох періодів зміни цього показника. Періоди швидкого приросту МЩКТ: перший – в препубертаті (1-2 міс) і в пубертаті (3-4 міс), другий – на початку репродуктивного віку (5

**Таблиця 4. Мінеральна щільність кісткової тканини (МЩКТ), мінеральна насиченість кісткової тканини (МНКТ) і її площа (ПКТ) у самиць лінії Вістар в різні сезони (М ± m)**

Вік, міс	Зима				Літо			
		МЩКТ, г/см <sup>2</sup>	МНКТ, г	ПКТ, см <sup>2</sup>	n	МЩКТ, г/см <sup>2</sup>	МНКТ, г	ПКТ, см <sup>2</sup>
6	26	0,099 ± 0,002	9,29 ± 0,29	93,50 ± 1,68	10	0,11 ± 0,003*	10,23 ± 0,31	90,75 ± 1,23
7	8	0,103 ± 0,003	10,20 ± 0,604	98,56 ± 3,18	40	0,116 ± 0,002*	10,35 ± 0,32	89,07 ± 1,78*

\*P < 0,05 щодо значень щурів у зимовий період відповідної вікової групи.

**Таблиця 5. Динаміка маси тіла, мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ), мінеральної насиченості кісткової тканини (МНКТ) та площі кісткової тканини (ПКТ) у самиць щурів лінії Вістар в осінньо-зимовий період ( $M \pm m$ )**

Вік, міс	Дата дослідження	Маса тіла, г	МПКТ, г/см <sup>2</sup>	МНКТ, г	ПКТ, см <sup>2</sup>
6 (n=10)	21.11.06	181 $\pm$ 9	0,098 $\pm$ 0,002	9,43 $\pm$ 0,50	95,29 $\pm$ 3,25
7 (n=8)	21.12.06	187 $\pm$ 10	0,103 $\pm$ 0,003	10,20 $\pm$ 0,60	98,56 $\pm$ 3,18
8 (n=7)	22.01.07	171 $\pm$ 11	0,084 $\pm$ 0,002*	15,98 $\pm$ 0,64*	189,35 $\pm$ 4,17*

\*P < 0,05 щодо значень 6- і 7-місячних щурів.

міс), третій – період повільного приросту в репродуктивному та зрілому віці, четвертий – період повільного зниження цього показника у старих тварин.

Протягом періодів швидкого збільшення МЩКТ відзначаються високі темпи росту показників як МНКТ так і ПКТ, однак при цьому процеси мінералізації кісткової тканини значно переважають над збільшенням площі кістки. Третій період характеризується низькою швидкістю приросту і МНКТ, і ПКТ, при цьому збільшення площі кісткової тканини та її мінеральної насиченості відбувається в еквівалентному співвідношенні. Під час четвертого періоду в старих тварин спостерігається незначна втрата МЩКТ на тлі подальшого повільного зростання ПКТ і тенденції до зниження МНКТ. Достовірне зниження МЩКТ у цей період виявляється тільки в кістках з переважанням губчастої кісткової тканини (кістки тазу, хребет).

Крім того, нами встановлено, що у самців МНКТ і ПКТ є вищими, ніж відповідні показники в самиць у репродуктивному й старечому віці. Значення МЩКТ вище у самців, ніж у самиць лише у віці з 3 до 5 міс, у більш пізньому віці статистично достовірних відмінностей не виявлено, оскільки в ці вікові періоди зростання ПКТ та МНКТ відбувається в еквівалентному співвідношенні.

Таким чином, отримані нами результати щодо вікових і статевих особливостей показників структурно-функціонального стану кісткової тканини щурів можуть бути референтними при визначенні МЩКТ, МНКТ і ПКТ у щурів лінії Вістар. Ці відомості важливі в експериментальній біології та ме-

дицині для розуміння вікових особливостей реакції кісткової тканини на різні агенти і перебіг патологічних процесів.

**Н.В. Григор'єва<sup>1</sup>, В.В. Поворознюк<sup>1</sup>,  
І.В. Гопкалова<sup>2</sup>, Т.В. Орлик<sup>1</sup>**

### **ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС**

Прижизненная оценка минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и минеральной насыщенности костной ткани (МНКТ) дает объективную характеристику возможных темпов ее потери с возрастом и при разных заболеваниях, а также ответа на лечение различными средствами, влияющими на метаболизм костной ткани. Исследование проведено на 376 белых крысах обоих полов линии Вистар, распределенных на 12 возрастных групп с использованием методики двухфотонной рентгеновской денситометрии. Изучение МПКТ и МНКТ в зависимости от возраста и пола установило отсутствие «пика» костной массы у крыс обоих полов. Как у самцов, так и у самок с возрастом выявлено увеличение МПКТ, более выраженное у самцов. Данные различия отмечены во всех возрастных группах животных. Установлены возрастные и половые особенности показателей МНКТ различных отделов скелета. У самок достоверный прирост показателей МПКТ и МНКТ выявлялся в возрасте с 1,5 до 2 мес (на 33 %), с 2 до 3 мес — на 12,5 %. У самцов прирост МПКТ установлен на 1 мес. позже и он был менее выражен (с 2 до 3 мес — на 27 %, с 4 до 5 мес — на 5 %). В остальные возрастные периоды динамика МПКТ имела только тенденцию к росту, однако достоверных отличий показателей между группами выявлено не было. Определенные в данной работе МПКТ и МНКТ и их возрастные и половые особенности могут быть использованы для проведения дальнейших исследований в остеологии в качестве референтных при моделировании экспериментального остеопороза у крыс и изучения ответа на применение различных антиостеопоротических средств.

Ключевые слова: крысы; минеральная плотность костной ткани; минеральная насыщенность костной ткани; площадь костной ткани; возраст; пол.



**N.V. Grygorieva<sup>1</sup>, V.V. Povoroznyuk<sup>1</sup>,  
I.V. Gopkalova<sup>2</sup>, T.V. Orlyk<sup>1</sup>**

# **AGE AND SEX FEATURES OF BONE MINERAL DENSITY IN RATS**

In vivo assessment of bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) indices gives an objective description of the possible rates of bone loss during aging and various diseases, as well as response to treatment by various drugs, affecting bone metabolism. This study was conducted on 376 Wistar rats of both genders, divided into 12 age groups using the method of dual-energy X-ray absorptiometry. Studying the parameters of BMD and BMC depending on age and sex has found no bone mass «peak» in rats of both sexes. Bone mineral density indices were increased in both male and female rats during growing, more pronounced in males. These differences are noted in all age groups of animals. Moreover, we have established age and gender particularities of BMC indices in different parts of the skeleton. In female rats, a significant increase of BMD and BMC parameters have been detected in age from 1.5 to 2 months (33 %), from 2 to 3 months – by 12.5 %. In males, the increase of BMD indices was found to happen 1 month later and it was less pronounced (from 2 to 3 months – 27 %, from 4 to 5 months – 5 %). In other age periods, the dynamics of BMD indices had only an upward trend, but significant differences different groups were not established. Our results of BMD and BMC indices and their age and gender features can be used for further research in osteology as reference data for modeling of experimental osteoporosis in rats and study of response to the use of different antiosteoporotic drugs.

Key words: rat bone mineral density; bone mineral content; bone area; age; sex.

<sup>1</sup>State Institution «D. F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine», Kyiv;

<sup>2</sup>State Institution «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems NAMS Ukraine», Kharkiv

## **REFERENCES**

1. Povoroznyuk VV, Deduh NV, Grygorieva NV, Gopkalova IV. Experimental osteoporosis. Kyiv: Express; 2012. [Russian].

2. Aydoğan NH, Özel İ, İltar S, Kara T, Özmeriç A, Alemdaroğlu KB. The effect of vitamin D and bisphosphonate on fracture healing: An experimental study. J Clin Orthop Trauma. 2016;7(2):90-4.
3. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. - Clin Oral Implants Res. 2016;8. doi: 10.1111/clr.12936. [Epub ahead of print]
4. Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Huerter B, Dürselen L, Faulenbach M, Heiss C. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. Int J Exp Pathol. 2013;94(6):387-98.
5. Munshi R, Patil T, Garuda C, Kothari D. An experimental study to evaluate the antiosteoporotic effect of Panchatikta Ghrita in a steroid-induced osteoporosis rat model. - Indian J Pharmacol. 2016;48(3):298-303.
6. Oku Y, Tanabe R, Nakaoka K, Yamada A, Noda S, Hoshino A, Haraikawa M, Goseki-Sone M. Influences of dietary vitamin D restriction on bone strength, body composition and muscle in rats fed a high-fat diet: involvement of mRNA expression of MyoD in skeletal muscle. J Nutr Biochem. 2016;32: 85-90.
7. Nenda MM, Lewicki M, Mandalunis PM. Histomorphometry of the tibia and mandible of healthy female Wistar rats at different stages of growth. Exp Anim. 2016;65(2):109-16.
8. Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. -Bone. 2006;38(1):136-44.
9. Burdan F, Błaszczak-Szalak M, Różyło-Kalinowska I, Klepacz R, Dworzański W, Różyło TK, Dudka J, Szumilo J. Early postnatal development of the lumbar vertebrae in male Wistar rats: double staining and digital radiological studies. Folia Morphol (Warsz). 2015 Oct 5. doi: 10.5603/FM.a2015.0068. [Epub ahead of print]
10. Zapadnyuk VI. Geriatric pharmacology. Kyiv: Zdorovia, 1977. [Russian].
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe, 1986.- Strasbourg, 1986.- 52 p.

*Матеріал надійшов  
до редакції 14.09.1016*



# Аналіз зв'язку поліморфізму *rs2592551* гена $\gamma$ -глутамілкарбоксилази з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту

Є.І. Дубовик, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, О.В. Атаман

Сумський державний університет; e-mail: v.harbuzzova@ukr.net

*Представлені результати визначення поліморфізму *rs2592551* гена  $\gamma$ -глутамілкарбоксилази у 170 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт та 124 осіб без гострої цереброваскулярної патології (контрольна група). Встановлено, що існує асоціація між цих захворюванням і наведеним поліморфним варіантом. Ризик розвитку інсульту в осіб з генотипом T/T був вищий, ніж у носіїв основного С-алеля (відношення шансів (OR) = 3,117; 95% довірчий інтервал (CI) = 1,016-9,566; P = 0,047). Після поділу пацієнтів груп порівняння на підгрупи, сформовані за наявності деяких факторів ризику атеросклерозу, подібний зв'язок був виявлений в осіб жіночої статі та без звички куріння. Водночас гетерозиготний генотип (C/T) у жінок мав вірогідний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту, якщо порівнювати з генотипами C/C і T/T (OR = 0,460; 95% CI = 0,213-0,994; P = 0,048). Достовірність цих результатів зберігалася навіть після поправки на вік, індекс маси тіла, куріння та артеріальну гіпертензію.*

*Ключові слова:*  $\gamma$ -глутамілкарбоксилаза; поліморфізм генів; ішемічний інсульт.

## ВСТУП

Процеси ектопічної кальцифікації та розлади системи гемостазу відіграють важливу роль у розвитку гострих порушень мозкового кровообігу. Одним із найнебезпечніших різновидів судинного ураження головного мозку, з огляду на поширеність та високу смертність, є ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) [1]. Показано, що відкладення солей кальцію в атероматозній бляшці належить до основних причин її дестабілізації та розриву [2-4]. При цьому порушення балансу між активністю про- та антикоагулянтних білків стає причиною посиленого тромбоутворення [5-7]. Серед імовірних чинників розвитку вказаних змін все більшої уваги приділяється вітамін-К-залежним білкам (VKDPs; від англ. vitamin K-dependent proteins). Нині до гетерогенної групи VKDPs належать фактори згортання крові (II, VII, IX, X), білки антикоагулянтної

© Є.І. Дубовик, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, О.В. Атаман

системи (протеїн S, C і Z), білки, що причетні до мінералізації кісток та м'яких тканин (матриксний Gla-протеїн – MGP, Gla-Rich протеїн, остеокальцин – OC) [2,8], а також білок, що бере участь в реакціях формування тромбоцитарного тромбу та диференціюванні гладенько-м'язових клітин судин (growth arrest-specific 6) [9].

Важливою умовою активації VKDPs є посттрансляційна модифікація у вигляді заміни залишків глутамінової кислоти в пептидних послідовностях білків на  $\gamma$ -карбоксиглутаматні залишки ( $\gamma$ -карбоксилювання). Біохімічна система, що відповідає за реалізацію такого перетворення, має назву цикл вітаміну К [10]. Одним з ключових ферментів у цій системі, що безпосередню каталізує реакцію  $\gamma$ -карбоксилювання, є  $\gamma$ -глутамілкарбоксилаза (GGCX). Дані нещодавніх досліджень продемонстрували, що у пацієнтів з мутаціями в гені *GGCX* поряд з розладами системи гемостазу спосте-

рігається передчасний остеопороз, ураження слухового нерва, вади клапанів серця, стеноз легеневої артерії та мінералізація еластичних волокон [11]. Зазначений фенотип корелює як зі збільшенням вмісту некарбоксильованих вітамін-К-залежних факторів згортання крові, так і зі зростанням кількості некарбоксильованого MGP та ОС. Це дає змогу припустити, що порушення процесів  $\gamma$ -карбоксильовання внаслідок генетичного поліморфізму *GGCX* може стати причиною дисфункції всієї групи VKDPs, що в кінцевому рахунку призведе до прискореного росту атероматозної бляшки, її мінералізації, розриву та тромбозу.

Метою нашої роботи був пошук зв'язку між поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* та розвитком ІАТІ серед представників північно-східного регіону України з урахуванням деяких відомих факторів ризику гострих порушень мозкового кровообігу (збільшений індекс маси тіла – ІМТ, куріння, артеріальна гіпертензія – АГ, стать, порушення системи коагуляції та ліпопротеїнового – ЛП – складу плазми крові).

## МЕТОДИКА

Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих на ІАТІ (42,4% жінок і 57,6% чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік  $64,7 \pm 9,5$  роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювали за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [12]. Пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом та ішемічним інсультом нез'ясованої етіології виключалися з дослідної групи. Клінічна характеристика хворих на ІАТІ була представлена загальноприйнятими показниками, що відображають фактори ризику

атеросклеротичного процесу та гострих розладів мозкового кровообігу: ІМТ, АГ, склад ЛП плазми крові та деякі показники коагулограми.

Групу контролю складали 124 особи, у яких відсутність гострої серцево-судинної патології підтверджували збиранням анамнестичних даних, зняттям електрокардіограми, вимірюванням артеріального тиску (АТ) та проведенням загальноприйнятого неврологічного огляду. Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації та схвалено Комісією з біоетики медичного інституту Сумського державного університету. Перед включенням у дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

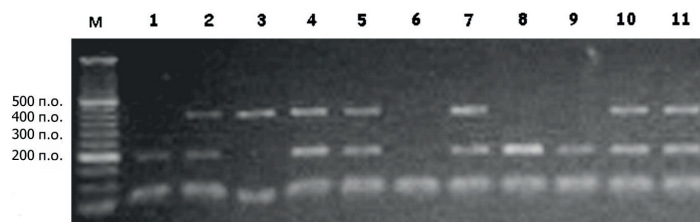
Для встановлення впливу факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ в осіб з різними генотипами за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* представників обох груп було поділено на підгрупи за статтю, ІМТ ( $\text{ІМТ} < 25 \text{ кг/м}^2$  та  $\geq 25 \text{ кг/м}^2$ ) та звичкою куріння. Оскільки кількість осіб з АГ у групі пацієнтів з ІАТІ істотно відрізнялася від відповідного показника в контрольній групі ( $P = 0,006$ ), представників обох груп за наявністю чи відсутністю АГ не розподіляли.

Визначення поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Венозну кров для генотипування набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із додаванням калієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти ( $11,7 \text{ ммоль/л}$ ) як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина). Кров заморожували та зберігали при  $-20^\circ\text{C}$ . ДНК з неї виділяли із використанням наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт поліморфізму *rs2592551*, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого

– 5'- GGACTTAGAAAGGAACGGATGA-3', зворотного – 5'- CTTGAGAAAAGGCAAAG CAGAC-3'. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація ділянки, що містила фрагмент 9-го екзона гена *GGCX*, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 61,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 20 год з 5 ОД рестриктази *MbiI* у буфері Tango такого складу: 33 ммоль/л тріс-ацетату (рН 7,9), 10 ммоль/л ацетату магнію, 66 ммоль/л ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 8527-й позиції гена *GGCX* містився цитозин, ампліфікат, який складався з 381 пари основ (п.о.), розщеплювався рестриктазою *MbiI* на два фрагменти – 189 і 192 п.о. У разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для *MbiI* втрачався, а в гелі візуалізувався один фрагмент завдовжки 381 п.о. (рисунок).

Ампліфікати вивченого фрагмента гена *GGCX* після рестрикції розділяли в 1,5 %-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140В) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).



Результати рестрикційного аналізу поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX*. М – маркер молекулярної маси (п.о. – пари нуклеїнових основ); доріжки 1,8,9 відповідають С/С-генотипу; доріжки 2,4,5,7,10,11 – С/Т-генотипу; доріжка 3 – Т/Т-генотипу; доріжка 6 – проба без ДНК пацієнта

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах а також відповідності цього розподілу рівновазі Харді – Вайнберга застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах з різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступною поправкою Бонфероні. Для встановлення ризику розвитку ІАТІ розраховували відношення шансів (OR) та 95% довірчий інтервал (CI) для домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної моделей успадкування. Їх релевантність оцінювали за допомогою інформаційного критерію Акайке. Такі фактори ризику ІАТІ, як вік, стать, ІМТ, куріння та АГ були застосовані як коваріати під час мультиваріабельного логістичного регресійного аналізу. Всі тести були двобічними, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клінічна характеристика 170 пацієнтів з ІАТІ та 124 осіб контрольної групи представлена у табл. 1. Не знайдено статистичної значимої різниці між групами порівняння під час аналізу за співвідношенням осіб різної статі ( $P = 0,294$ ), кількістю курців ( $P = 0,403$ ) та середніми значеннями ІМТ ( $P = 0,279$ ). Водночас середні значення систолічного і діастолічного АТ та концентрації глюкози крові у хворих на ІАТІ були істотно вищими,

Таблиця 1. Клінічна характеристика хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт

Показник	Контроль (n = 124)	Хворі на інсульт (n = 170)	P
Вік, роки	76,7 ± 10,2	64,7 ± 9,5	<0,001
Стать, жінки/чоловіки	45/79	72/98	0,294
Курці, n (%)	31 (25,0)	50 (29,4)	0,403
Індекс маси тіла, кг/м <sup>2</sup>	27,6 ± 5,0	28,2 ± 4,3	0,279
Артеріальний тиск, мм рт.ст.			
сistolічний	152,6 ± 23,4	167 ± 29,2	<0,001
діастолічний	86,3 ± 12,4	95,4 ± 15,6	<0,001
Вміст глюкози натще, ммоль/л	5,29 ± 0,7	5,92 ± 1,5	<0,001

Примітка: категоріальні змінні порівнювали за допомогою  $\chi^2$ -тесту, кількісні – за допомогою t-тесту

ніж у групі контролю ( $P < 0,001$ ). При цьому середній вік представників контролю (76,7 ± 10,2 роки) був вищим, ніж у пацієнтів з інсультом ( $P < 0,001$ ). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ в осіб контрольної групи в майбутньому. Розподіл генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* у дослідній групі (частота мінорного алеля 0,294) та в контролі (частота мінорного алеля 0,231) відповідав рівновазі Харді – Вайнберга ( $P > 0,05$ ).

У табл. 2 наведені частоти, з якими зустрічались окремі варіанти за досліджуванним поліморфізмом гена *GGCX* у пацієнтів з ІАТІ та осіб контрольної групи, а також показані результати порівняння їх між групами загалом та за наявністю чи відсутністю деяких факторів ризику атеросклерозу. Встановлено, що різниця в розподілі різних алельних варіантів (C/C, C/T і T/T) між дослідною та контрольною групою не була статистично значущою ( $P = 0,113$ ). При цьому аналіз відповідного розподілу в підгрупах за гендерною ознакою виявив достовірну різницю в осіб жіночої статі ( $P = 0,016$ ) та її відсутність серед чоловіків ( $P = 0,307$ ). Дослідження частоти генотипів за вивченим поліморфізмом у групах порівняння не показало істотних відмінностей після розподілу на підгрупи з нормальним і

підвищеним ІМТ ( $P = 0,361$  та  $P = 0,202$  відповідно). І нарешті, порівняння частоти різних генотипів за поліморфізмом локусу *rs2592551* серед некурців продемонструвало близьку до рівня статистичної значущості відмінність між пацієнтами з ІАТІ та особами контрольної групи ( $P = 0,056$ ). Різницю в розподілі генотипів між групами порівняння серед осіб, які курять, не встановлено ( $P = 0,572$ ).

Результати аналізу асоціації генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* з ризиком настання ІАТІ в рамках чотирьох моделей успадкування представлені в табл. 3. Статистично значущий зв'язок у загальній групі був встановлений для рецесивної ( $P_{\text{спост.}} = 0,047$ ) та адитивної ( $P_{\text{спост.}} = 0,046$ ) моделей. Ризик розвитку ІАТІ в осіб з генотипом T/T був у 3,1 (95% довірчий інтервал (CI) = 1,016-9,566) рази вищий, ніж у носіїв основного алеля (C/C і C/T) (відповідно до рецесивної моделі) та у 3,2 (95% CI = 1,018-9,946) рази вищий, ніж у носіїв C/C-генотипу (відповідно до адитивної моделі). Проте статистична значущість цих показників зникла після поправки на вік, стать, звичку куріння, ІМТ та АГ.

Відсутність серед жінок контрольної групи носіїв T/T-генотипу завадила провести розрахунок ризику розвитку ІАТІ для носіїв цього алельного варіанта в рамках рецесивної та адитивної моделей успадкування. Проте

Таблиця 2. Розподіл генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* у пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом

Група	n	Генотип						P
		C/C (%) (95% CI)		C/T (%) (95% CI)		T/T (%) (95% CI)		
Загалом								
Контроль	124	70 (56,5)	(47,7-65,2)	50 (40,3)	(31,7-49,0)	4 (3,2)	(0,1-6,3)	0,113
Інсульт	170	88 (51,8)	(44,3-59,3)	66 (38,8)	(31,5-46,2)	16 (9,4)	(5,0-13,8)	
Стать								
Жінки								
Контроль	45	23 (51,1)	(36,5-65,7)	22 (48,9)	(34,3-63,5)	0 (0)	(–)	0,016
Інсульт	72	41 (56,9)	(45,5-68,4)	22 (30,6)	(19,9-41,2)	9 (12,5)	(4,9-20,1)	
Чоловіки								
Контроль	79	47 (59,5)	(48,7-70,3)	28 (35,4)	(24,9-46,0)	4 (5,1)	(0,2-9,9)	0,307
Інсульт	98	47 (48,0)	(38,1-57,9)	44 (44,9)	(35,1-54,8)	7 (7,1)	(2,0-12,2)	
Індекс маси тіла (ІМТ)								
ІМТ<25 кг/м <sup>2</sup>								
Контроль	38	19 (50,0)	(31,1-65,9)	17 (44,7)	(28,9-60,6)	2 (5,3)	(0-12,4)	0,361
Інсульт	41	20 (48,8)	(33,5-64,1)	15 (36,6)	(21,8-51,3)	6 (14,6)	(3,8-25,5)	
ІМТ ≥25 кг/м <sup>2</sup>								
Контроль	85	51 (60,0)	(49,6-70,4)	32 (37,6)	(27,4-48,0)	2 (2,4)	(0-5,6)	0,202
Інсульт	129	68 (52,7)	(44,1-61,3)	51 (39,5)	(31,1-48,0)	10 (7,8)	(3,1-12,4)	
Куріння								
Некурці								
Контроль	93	52 (55,9)	(45,8-66,0)	40 (43,0)	(33,0-53,1)	1 (1,1)	(0-3,17)	0,056
Інсульт	120	65 (54,2)	(45,3-63,1)	45 (37,5)	(28,8-46,2)	10 (8,3)	(3,4-13,3)	
Курці								
Контроль	31	18 (58,0)	(40,7-75,4)	10 (32,3)	(15,8-48,7)	3 (9,7)	(0-20,1)	0,572
Інсульт	50	23 (46,0)	(32,2-59,8)	21 (42,0)	(28,3-55,7)	6 (12,0)	(2,3-21,0)	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм; 95% CI – 95% довірчий інтервал

було встановлено, що в осіб жіночої статі з гетерозиготним генотипом (C/T) ризик розвитку ІАТІ був достовірно нижчим, ніж в осіб цієї статі з генотипами C/C і T/T ( $P_{\text{спост.}} = 0,048$ ; відношення шансів (OR) $_{\text{спост.}} = 0,460$ ; 95% CI = 0,213-0,994) (відповідно до наддомінантної моделі). Слід відзначити, що достовірність результатів зберігалася навіть після долучення до аналізу таких факторів ризику, як вік, ІМТ, куріння та АГ ( $P_{\text{попр.}} = 0,046$ ; OR $_{\text{попр.}} = 0,474$ ; 95% CI = 0,257-0,971).

Аналіз зв'язку різних варіантів гена *GGCX* за локусом *rs2592551* з урахуванням звички куріння показало, що генотип T/T у некурців збільшував ризик інсульту в 8,4 раза (95% CI = 1,051-66,559;  $P_{\text{спост.}} = 0,045$ ), якщо порівнювати з носіями основного алеля (відповідно до рецесивної моделі). Проте статистична значимість OR втрачалася після поправки на вік, стать, ІМТ та АГ. Зв'язок різних генотипів за досліджуваним поліморфізмом з розвитком ІАТІ в осіб чоловічої статі, курців



**Таблиця 3. Аналіз зв'язку поліморфізму rs2592551 гена GGCX з ішемічним атеротромботичним інсультом з урахуванням чотирьох моделей успадкування**

Модель	P <sub>спост.</sub>	OR <sub>спост.</sub> (95% CI)	P <sub>попр.</sub>	OR <sub>попр.</sub> (95% CI)	ІКА
<b>Загалом</b>					
Домінантна	0,426	1,208 (0,758-1,924)	0,860	0,949 (0,533-1,692)	21,86
Рецесивна	0,047	3,117 (1,016-9,566)	0,103	3,121 (0,794-12,274)	17,78
Наддомінантна	0,795	0,939 (0,585-1,508)	0,337	0,750 (0,416-1,350)	22,42
Аддитивна*	0,843	1,050 (0,648-1,702)	0,526	0,823 (0,452-1,501)	19,74
	0,046	3,182 (1,018-9,946)	0,138	2,874 (0,713-11,593)	
<b>Стать</b>					
<b>Жінки:</b>					
Домінантна	0,538	0,790 (0,374-1,670)	0,183	0,534 (0,212-1,345)	23,27
Рецесивна	0,014	—	—	—	—
Наддомінантна	0,048	0,460 (0,213-0,994)	0,046	0,474 (0,257-0,971)	20,16
Аддитивна*	0,147	0,561 (0,251-1,225)	0,095	0,450 (0,176-1,150)	14,78
	—	—	—	—	
<b>Чоловіки:</b>					
Домінантна	0,127	1,594 (0,876-2,901)	0,304	1,503 (0,691-3,268)	16,53
Рецесивна	0,571	1,442 (0,407-5,115)	0,210	2,751 (0,566-13,373)	18,55
Наддомінантна	0,204	1,484 (0,807-2,729)	0,693	1,171 (0,536-2,558)	17,25
Аддитивна*	0,155	1,571 (0,843-2,930)	0,478	1,340 (0,597-3,010)	18,51
	0,396	1,750 (0,480-6,378)	0,167	3,142 (0,619-15,934)	
<b>Індекс маси тіла (ІМТ)</b>					
<b>ІМТ &lt; 25 кг/м<sup>2</sup></b>					
Домінантна	0,914	1,050 (0,434-2,539)	0,766	0,845 (0,278-2,567)	16,51
Рецесивна	0,185	3,086 (0,583-16,336)	0,397	2,741 (0,265-28,317)	14,53
Наддомінантна	0,461	0,713 (0,289-1,756)	0,457	0,647 (0,205-2,037)	15,98
Аддитивна*	0,712	0,838 (0,329-2,138)	0,561	0,706 (0,219-2,279)	16,39
	0,232	2,850 (0,511-15,901)	0,473	2,395 (0,220-26,024)	
<b>ІМТ ≥ 25 кг/м<sup>2</sup></b>					
Домінантна	0,294	1,346 (0,773-2,343)	0,981	0,992 (0,503-1,955)	18,90
Рецесивна	0,113	3,487 (0,745-16,330)	0,132	3,964 (0,661-23,789)	16,85
Наддомінантна	0,782	1,083 (0,617-1,902)	0,477	0,778 (0,389-1,553)	19,93
Аддитивна*	0,541	1,195 (0,675-2,118)	0,666	0,857 (0,424-1,731)	18,47
	0,097	3,750 (0,787-17,863)	0,156	3,722 (0,605-22,882)	
<b>Куріння</b>					
<b>Некурці</b>					
Домінантна	0,799	1,073 (0,623-1,850)	0,330	0,715 (0,365-1,403)	22,80
Рецесивна	0,045	8,364 (1,051-66,559)	0,244	4,013 (0,388-41,537)	16,14
Наддомінантна	0,416	0,795 (0,458-1,381)	0,154	0,609 (0,308-1,204)	22,20
Аддитивна*	0,713	0,900 (0,514-1,577)	0,211	0,645 (0,324-1,283)	18,01
	0,051	8,000 (0,992-64,532)	0,316	3,354 (0,314-35,788)	
<b>Курці</b>					
Домінантна	0,293	1,625 (0,658-4,016)	0,121	2,712 (0,768-9,574)	14,53
Рецесивна	0,747	1,273 (0,294-5,506)	0,174	3,685 (0,562-24,173)	15,54
Наддомінантна	0,382	1,521 (0,594-3,891)	0,514	1,502 (0,442-5,101)	14,87
Аддитивна*	0,317	1,643 (0,621-4,350)	0,244	2,215 (0,580-8,453)	16,53
	0,563	1,565 (0,343-7,135)	0,100	5,479 (0,722-41,608)	

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; P<sub>спост.</sub> – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR<sub>спост.</sub> – спостережуване відношення шансів; P<sub>попр.</sub> – значення P після поправки на вік, стать, звичку курити, ІМТ та АГ у загальній групі; поправки на вік, звичку курити, ІМТ та АГ у підгрупах за статтю; поправки на навік, стать, звичку курити та АГ у підгрупах за ІМТ; поправки на вік, стать, ІМТ та АГ – у підгрупах за звичкою курити; OR<sub>попр.</sub> – відношення шансів після поправки на коваріати.

\* Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом, другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом

та окремо в осіб з нормальним та підвищеним ІМТ встановлений не був. Щодо визначення найкращої моделі успадкування ознаки, то в основній групі та більшості підгруп такою була рецесивна модель.

Останнім етапом нашого дослідження був аналіз впливу різних генотипів за *rs2592551* поліморфізмом на ІМТ, АТ, вміст глюкози крові натще, ЛП плазми крові та деякі показники коагулограми в пацієнтів з ішемічним інсультом. Однофакторний дисперсійний аналіз виявив залежність концентрації глюкози крові від генотипів за досліджуваним поліморфізмом ( $P = 0,040$ ; табл. 4). Застосування поправки Бонфероні показало, що нижчі значення у пацієнтів з С/Т-генотипом були близькими до рівня статистичної значущості, якщо порівнювати з генотипом С/С ( $P = 0,053$ ), і достовірно не відрізнялись від відповідного показника в носіїв варіанту Т/Т ( $P = 0,303$ ). Зв'язок різних

генотипів з усіма іншими досліджуваними показниками встановлений не був.

## ОБГОВОРЕННЯ

Одержані в представленому дослідженні результати вказують на те, що існують вірогідні відмінності в розподілі генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* між хворими на ІАТІ та особами контрольної групи. Ці відмінності є характерними для осіб жіночої статі та без звички куріння. Також є підстави припускати, що цей поліморфний сайт може впливати на концентрацію глюкози крові у хворих з ішемічним інсультом.

Ген *GGCX* у людини розташований на короткому плечі 2-ї хромосоми (2p12) і має довжину 16815 нуклеотидів [13]. Він складається з регуляторної частини, 14 інтронів та 15 екзонів, в яких закодують 758 амінокислотних залишків інтегрального

**Таблиця 4. Клінічна характеристика пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом з урахуванням генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX*, (М ± SD)**

Показник	С/С	С/Т	Т/Т	Загалом	Р
Кількість осіб	88	66	16	170	—
Індекс маси тіла	28,5 ± 4,6	27,8 ± 3,7	28,2 ± 5,4	28,2 ± 4,3	0,586
Артеріальний тиск, мм рт. ст.					
систолічний	164,3 ± 30,0	170,7 ± 29,9	166,6 ± 20,2	170,0 ± 29,2	0,403
діастолічний	94,8 ± 15,9	95,6 ± 15,7	97,2 ± 13,4	95,4 ± 15,6	0,846
Загальний холестерин*, ммоль/л	5,11 ± 1,5	4,93 ± 1,5	5,14 ± 1,9	5,05 ± 1,5	0,758
Ліпопротеїни, ммоль/л					
високої густини*	1,03 ± 0,3	1,00 ± 0,3	1,08 ± 0,3	1,02 ± 0,3	0,630
низької густини*, ммоль/л	3,28 ± 1,4	3,21 ± 1,4	3,25 ± 1,8	3,26 ± 1,4	0,966
Тригліцериди*, ммоль/л	1,78 ± 0,8	1,58 ± 0,8	1,78 ± 0,7	1,70 ± 0,8	0,295
Протромбіновий час, с	9,42 ± 2,1	9,59 ± 1,9	9,29 ± 2,1	9,48 ± 2,0	0,798
Тромбіновий час, с	16,46 ± 3,6	16,70 ± 3,4	16,29 ± 4,2	16,54 ± 3,6	0,878
Фібриноген, г/л	3,93 ± 1,3	3,86 ± 1,1	4,23 ± 1,0	3,93 ± 1,2	0,553
Вміст глюкози натще, ммоль/л	6,14 ± 1,7	5,55 ± 1,2	6,24 ± 1,8	5,92 ± 1,5	0,040**

Примітка: \* n = 83 особи з С/С-генотипом, 59 осіб з С/Т-генотипом та 15 осіб з Т/Т-генотипом.

\*\* P = 0,053 при порівнянні С/С- та С/Т-генотипів; P = 0,303 при порівнянні С/Т- і Т/Т-генотипів; P = 0,999 при порівнянні С/С- та Т/Т-генотипів (за результатами поправки Бонфероні)

трансмембранного глікопротеїну [14].

Однонуклеотидний поліморфізм *rs2592551* розташований у 9-му екзоні гена *GGCX* та являє собою заміну цитозину на тимін, що однак не призводить до заміни амінокислоти у 406-й позиції поліпептидного ланцюга зрілого білка (інша назва цього локусу – Arg406Arg). За останні роки опублікована низка праць, в яких чітко продемонстровано вплив цього поліморфного локусу на дозування варфарину в японській [15], північно-американській популяціях [16] та серед китайських пацієнтів з миготливою аритмією [17]. Механізм, що лежить в основі такого впливу, наразі не з'ясований. Пропонується, що заміна цитозину на тимін, яка призводить до зміни триплету CGC на CGT, хоча і не викликає зміни структури протеїну, проте може впливати на швидкість його трансляції, а отже, і змінювати сумарну активність *GGCX* у клітині. Також не відкидається можливість того, що цей генетичний локус може знаходитись в нерівноважному зчепленні з іншими поліморфними сайтами гена *GGCX*.

З моменту відкриття гена *GGCX* [18] дослідження його однонуклеотидних поліморфізмів ведуться у декількох напрямках. Найбільша увага прикута до вивчення їх ролі у дозуванні оральних антикоагулянтів, зокрема варфарину [19-21]. Нещодавній широкомасштабний мета-аналіз продемонстрував, що поліморфний локус *rs11676382* гена *GGCX* є достовірним предиктором дози варфарину [22], натомість дані іншого подібного мета-аналізу не виявили такої залежності для сайтів *rs699664* та *rs12714145* [23].

З іншого боку, в останні роки з'явилася незначна кількість праць, присвячених вивченню ролі генетичного поліморфізму *GGCX* у розвитку серцево-судинних патологій. Результати широкогеномного аналізу, виконаного в 2016 р. у Тайвані на виборці із 8566 осіб, показали достовірний зв'язок поліморфного локусу *rs6738645* гена *GGCX* з розвитком ішемічної хвороби серця [24].

При цьому дослідження, проведені в нідерландській та японській популяціях, не виявило асоціації різних гаплотипів генів *VKORC1* та *GGCX* з розвитком венозного тромбозу [25,26]. Зв'язок цих гаплотипів із вмістом вітамін-К-залежних факторів згортання крові знайдений також не був.

У 2010 р. Shyu та співавт. вивчали зв'язок поліморфізму генів *GGCX* (*rs699664*), *VKORC1* (*rs9923231*) та *NQO1* (*rs1800566*) з розвитком ІАТІ. Дослідники виявили протективний ефект зазначених поліморфізмів відносно ризику розвитку ішемічного інсульту. Синергізм досліджуваних локусів був більш вираженим у пацієнтів, які не були курцями та не вживали спиртних напоїв [27]. Подібний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту також був знайдений нами в представленому дослідженні у жінок з гетерозиготним генотипом за поліморфним локусом 9-го екзона гена *GGCX*. Натомість, у попередній нашій праці зв'язок поліморфізму *rs699664* з розвитком ІАТІ в цій самій виборці виявлений не був [28].

Щодо знайденого нами впливу поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* на концентрацію глюкози крові у пацієнтів з ІАТІ, то дана обставина може бути пояснена причетністю *GGCX* до регуляції функціонування ОС. Останній, як сьогодні відомо, поряд зі своїми класичними функціями посилює секрецію інсуліну β-клітинами підшлункової залози та сприяє утилізації глюкози периферичними тканинами [29]. Дослідження останніх років продемонстрували, що *GGCX* через γ-карбоксилування пригнічує ендокринну функцію ОС [30], опосередковано впливаючи таким чином і на вміст глюкози плазми крові, і на концентрацію інсуліну. Певна річ, що припущення щодо зв'язку поліморфного локусу *rs2592551* з концентрацією глюкози крові потребує як експериментальних, так і клінічних доказів, а тому зумовлює необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

Підсумовуючи, можна сказати, що представлене дослідження є першим повідом-

ленням про аналіз асоціації поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* з ішемічним інсультом. Одержані результати показали, що у представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфізмом *rs2592551* і розвитком ІАТІ. Ці відмінності зокрема є характерними для осіб жіночої статі та без звички куріння. Показано, що пацієнти з генотипом Т/Т мали більшу ймовірність розвитку ІАТІ, ніж носії основного С-алеля. Водночас гетерозиготний генотип (С/Т) в осіб жіночої статі мав достовірний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту.

*Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Зв'язок алейного поліморфізму “генів ектопічної кальцифікації” з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень», № держреєстрації 0115U000688.*

**Е.И. Дубовик, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, А.В. Атаман**

## АНАЛІЗ СВЯЗИ

### ПОЛИМОРФИЗМА *rs2592551* ГЕНА $\gamma$ -ГЛУТАМИЛКАРБОКСИЛАЗЫ С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Представлены результаты определения полиморфизма *rs2592551* гена  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазы у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом и 124 лиц без острой цереброваскулярной патологии (контрольная группа). Установлено, что существует связь между этим заболеванием и указанным полиморфным вариантом. Риск развития инсульта у лиц с генотипом Т/Т был выше, чем у носителей основного С-аллеля (отношение шансов (OR) = 3,117; 95% доверительный интервал (CI) = 1,016-9,566; P = 0,047). После разделения пациентов групп сравнения на подгруппы, сформированные по наличию некоторых факторов риска атеросклероза, подобная связь была выявлена у лиц женского пола и без привычки курения. В то же время гетерозиготный генотип (С/Т) у женщин имел достоверный протективный эффект в отношении развития ишемического инсульта, если сравнивать с генотипами С/С и Т/Т (OR = 0,460; 95% CI = 0,213-0,994; P = 0,048). Достоверность этих результатов сохранялась даже после поправки на возраст, индекс массы тела, курение и артериальную гипертензию.

Ключевые слова:  $\gamma$ -глутамилкарбоксилаза; полиморфизм генотипов; ишемический инсульт.

**Ye.I. Dubovyk, V.Yu. Harbuzova, O.A. Obukhova, A.V. Ataman**

### ANALYSIS OF $\gamma$ -GLUTAMYL CARBOXYLASE GENE *rs2592551* POLYMORPHISM ASSOCIATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE

The results of  $\gamma$ -glutamyl carboxylase gene *rs2592551* polymorphism determining in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke and 124 subjects without acute cerebrovascular disease (control group) have been evaluated. Obtained results revealed that *rs2592551* polymorphism was related to ischemic stroke in Ukrainian population. The risk for this disease in patients with T/T genotype was higher than in major C-allele carriers (odds ratio (OR) = 3.117; 95% confidence interval (CI) = 1.016-9.566; P = 0.047). After dividing patients into subgroups, formed by the presence of certain risk factors for atherosclerosis, similar association has been established for women and non-smokers. At the same time, the heterozygous genotype (C/T) in females had significantly protective effect against ischemic stroke development when compared to C/C and T/T genotypes (OR = 0.460; 95 % CI = 0.213-0.994; P = 0.048). Statistical significance of these results persisted even after adjustment for age, body mass index, smoking and hypertension.

Key words:  $\gamma$ -glutamyl carboxylase; gene polymorphism; ischemic stroke.

*Sumy State University, Ukraine*

## REFERENCES

1. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6(3):138-49. doi: 10.2174/157340310791658785
2. Margueritta S, Asmar E, Naoum J, Arbid E. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review. *Oman Med J.* 2014;29(3):172-7. doi: 10.5001/omj.2014.44
3. Pugliese G, Iacobini C, Fantauzzi CB, Menini S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis.* 2015;238:220-30.
4. Stanford W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease. *Radiographics.* 1999;19:1409-19.
5. Cortellaro M, Baldassarre D, Cofrancesco E, Tremoli E, Colombo A, Boschetti C, Paoletti R. Relation between hemostatic variables and increase of common carotid intima media thickness in patients with peripheral arterial disease. *Stroke.* 1996;27:450-4. doi: 10.1161/01.STR.27.3.450
6. He M, Wen Z, He X, Xiong S, Liu F, Xu J, Li J, Xie Q, Jian Z, Chen F, Xiao B, Pu X, He S. Observation on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases. *Thromb Res.* 2002;107(5):223-8.



7. Jood K, Ladenvall P, Tjärnlund-Wolf A, Ladenvall C, Andersson M, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke*. 2005;36:2077-81. DOI: 10.1161/01.STR.0000183617.54752.69
8. Viegas C, Rafael M, Enriquez J, Teixeira A, Vitorino R, Luis I, Costa R, Santos S, Cavaco S, Neves J, Macedo A, Willems B, Vermeer C, Simes D. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):399-408. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304823
9. Laurance S, Lemarié C, Blostein M. Growth Arrest-Specific Gene 6 (gas6) and Vascular Hemostasis. *Adv Nutr*. 2012;3:196-203. doi: 10.3945/an.111.001826
10. Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M. The Vitamin K Cycle. *Vitam Horm*. 2008;78:35-62. doi: 10.1016/S0083-6729(07)00003-9.
11. Watzka M, Geisen C, Scheer M, Wieland R, Wiegering V, Dörner T, Laws H, Gümrük F, Hanalioglu S, Ünal S, Albayrak D, Oldenburg J. Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations. *Thromb Res*. 2014;134:856-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.07.004>
12. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.
13. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE.  $\gamma$ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tag SNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2227-34. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02744.x
14. Tie JK, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*. 2016;14:236-47. doi: 10.1111/jth.13217.
15. Cha P, Mushirola T, Takahashi A, Saito S, Shimomura H, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y. High-resolution SNP and haplotype maps of the human gamma-glutamyl carboxylase gene (GGCX) and association study between polymorphisms in GGCX and the warfarin maintenance dose requirement of the Japanese population. *Hum Genet*. 2007;52:856-64. DOI 10.1007/s10038-007-0183-9
16. Schelleman H, Brensinger C, Chen J, Finkelman B, Rieder M, Kimmel S. New genetic variant that might improve warfarin dose prediction in African Americans. *Br J Clin Pharm*. 2010;70(3):393-9. DOI:10.1111/j.1365-2125.2010.03709.x
17. Kamali X, Wulasihan M, Yang Y, Lu W, Liu Z, He P. Association of GGCX gene polymorphism with warfarin dose in atrial fibrillation population in Xinjiang. *Lipids Health Dis*. 2013;2(149):1-5. doi:10.1186/1476-511X-12-149
18. Wu S, Cheung W, Frazier D, Stafford D. Cloning and Expression of the cDNA for Human  $\gamma$ -Glutamyl Carboxylase. *Science*. 1991;254:1634-6.
19. Cavallari L, Perera M, Wadelius M, Deloukas P, Taube G, Patel S, Aquino-Michaels K, Viana A, Shapiro N, Nutescu E. Association of the GGCX (CAA)16/17 repeat polymorphism with higher warfarin dose requirements in African Americans. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(2):152-8.
20. King C, Deych E, Milligan P, Eby C, Lenzini P, Grice G, Porche-Sorbet R, Ridker P, Gage B. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. *Thromb Haemost*. 2010;104(4):750-4. doi:10.1160/TH09-11-0763.
21. Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: A potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. *Thromb Res*. 2010;134:604-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.06.022>
22. Sun Y, Wub Z, Li S, Qin X, Li T, Xie L, Deng Y, Chen J. Impact of gamma-glutamyl carboxylase gene polymorphisms on warfarin dose requirement: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2015;135:739-47.
23. Tian L, Zhang J, Xiao S, Huang J, Zhang Y, Shen J. Impact of polymorphisms of the GGCX gene on maintenance warfarin dose in Chinese populations: Systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*. 2015;5:43-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.05.003>
24. Assimes T, Lee I, Juang J, Guo X, Wang T, Kim E, Lee W, Absher D, Chiu Y, Hsu C, Chuang L, Quertermous L, Hsiung C, Rotter J, Sheu W, Chen Y, Taylor K. Genetics of Coronary Artery Disease in Taiwan: A Cardiometabochip Study by the Taichi Consortium. *PLoS One*. 2016;11(3):472-9. doi:10.1371/journal.pone.0138014
25. Ikejiri M, Wada H, Sakamoto Y, Ito N, Nishioka J, Nakatani K, Tsuji A, Yamada N, Nakamura N, Ito M, Nobori T. The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol*. 2010;92:302-5. DOI 10.1007/s12185-010-0671-0
26. Visser M, Roshani S, Rutten J, Vlieg A, Vos H, Rosendaal F, Reitsma P. Haplotypes of VKORC1, NQO1 and GGCX, their effect on activity levels of vitamin K-dependent coagulation factors, and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2011;106:563-5. doi:10.1160/TH11-05-0339
27. Shyu HY, Fong CS, Fu YP, Shieh JC, Yin JH, Chang CY, Wang HW, Cheng CW. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta*. 2010;411:840-5. doi:10.1016/j.cca.2010.02.071
28. Garbuzova VY, Stroy DA, Dosenko VE, Dubovyk YI, Borodenko AO, Shimko KA, Obukhova OA, Ataman OV. Association of allelic polymorphisms of genes matrix Gla-protein system with ischemic atherothrombotic stroke. *Fiziol Zh*. 2015;61(1):19-27. [Ukrainian].
29. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:137-46.
30. Ferron M, Lacombe J, Germain A, Oury F, Karsenty G. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. *J Cell Biol*. 2015;208(6):761-76. doi:10.1083/jcb.201409111

*Матеріал надійшов до редакції 13.09.2015*



# Вплив інгібітора полі (АДФ-рибозо) полімерази 4-гідроксиквіназоліну на загибель імунокомпетентних клітин за умов імунокомплексної патології у мишей

Н.Г. Грушка

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: grunay@i.ua

*Досліджували вплив інгібітора полі (АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) на ступінь ушкодження ДНК та шляхи загибелі клітин лімфовузлів і тимуса мишей при моделюванні імунокомплексної патології для визначення його можливої цитопротективної дії. Встановлено, що за умов гіперімунокомплексної, викликаній довготривалою імунізацією мишей лінії СВА бичачим сироватковим альбуміном (БСА), індекс ДНК-комет імунокомпетентних клітин збільшувався в 4 рази. Вірогідно збільшилася кількість клітин з сильним пошкодженням ДНК у препаратах тимуса з 1,5 до 77% і лімфовузлів з 0 до 80%. Введення 4-ГК на тлі імунізації БСА послаблювало генотоксичний стрес, зменшуючи кількість лімфоцитів з сильним ушкодженням ДНК, що сприяло зростанню відсотка клітин з інтактною ДНК. Застосування інгібітора ПАРП мало виражений цитопротективний ефект: призводило до збільшення життєздатності імуноцитів переважно за рахунок зменшення їх некротичної загибелі, спричиненої імунізацією БСА. Отже, наші результати свідчать, що ПАРП може брати участь у розвитку ушкодження клітин тимуса та лімфовузлів за умов гіперімунокомплексної, а також вказують на перспективність розробки препаратів на основі інгібіторів цього ферменту з профілактичною та лікувальною метою при імунокомплексній патології. Ключові слова: полі(АДФ-рибозо) полімераза; імунокомплексна патологія; лімфоцити; ушкодження ДНК; клітинна загибель.*

## ВСТУП

Полі(АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) – родина із 18 ферментів. ПАРП-1, найбільш розповсюджена ізоформа, відіграє значну фізіологічну роль, здійснюючи посттрансляційну модифікацію білків. Фермент активується при розривах ДНК, синтезує ланцюги полімера АДФ-рибози та приєднує їх до гістонів, білків репарації ДНК, транскрипційних факторів тощо. Така модифікація білків залучена в широкий спектр клітинних процесів: репарацію ДНК, ремоделювання структури хроматину, транскрипцію генів, проліферацію, диференціацію і загибель клітин. Встановлена участь ПАРП-1 у підтримці стабільності геному та епігенетичних механізмах регуляції генної експресії [1-3]. Однак за умов надмірної активації він задіяний у

патогенезі багатьох захворювань. Це може бути опосередковано тим, що ПАРП-1 діє як коактиватор прозапальних транскрипційних факторів (зокрема, NF- $\kappa$ B та AP-1, що сприяє посиленому утворенню медіаторів запалення), а також впливом на життєздатність та шляхи загибелі клітин. Сильна активація ферменту при значному ушкодженні ДНК спричиняє виснаження клітинних ресурсів НАД<sup>+</sup> та АТФ, що може призводити до некрозу або переключати шлях загибелі з апоптотичного (який потребує значного енергетичного забезпечення) на некротичний. Встановлено, що ПАРП залучена в пошкодження тканин при низці хвороб, в тому числі аутоімунних, і є ключовим медіатором клітинної загибелі за умов оксидативного та нітрозативного стресу, у разі ішемії та ушкодження ДНК.

© Н.Г. Грушка

Підвищення активності ПАРП-1 було виявлено при таких захворюваннях людини з імунним компонентом у патогенезі, як множинний склероз, хронічне обструктивне ушкодження дихальних шляхів, аутоімунний нефрит, септичний шок тощо, причому рівень активації ферменту корелював із ступенем ураження [1, 3-5]. Інгібування ПАРП запобігало та послаблювало запальний процес в експериментальних моделях аутоімунних і запальних захворювань (при хворобі Паркінсона, аутоімунному нефриті, хронічному запаленні кишечника, експериментальному алергічному енцефаломієліті, аутоімунному гепатиті, експериментальному ураженні легень, за умов контактної гіперчутливості, на моделях септичного і геморагічного шоку та ін. [5-10]. Хоча розвиток різних імунопатологічних процесів супроводжується й опосередковується формуванням і відкладанням імунних комплексів (ІК) у тканинах, однак роль ПАРП у патогенезі імунокомплексних хвороб вивчено недостатньо.

Метою нашої роботи було на моделі системного імунокомплексного пошкодження, відтвореного довготривалою імунізацією мишей чужорідним білком БСА, з'ясувати участь ПАРП в ушкодженні клітин тимуса та лімфовузлів, а також вивчити можливу захисну дію інгібітора цього ферменту 4-гідроксиквіназоліну (ГК).

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА. Всі тварини на початку експерименту (2–2,5 міс) мали масу 16–18 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986). Модель системного хронічного патологічного процесу імунокомплексного генезу відтворювали за допомогою введення мишам БСА, розчиненого в фізіологічному розчині («Sigma», США), раз на тиждень за такою схемою: 1-й тиждень

- введення 150 мг БСА/кг; 2-й - 175 мг/кг; 3-й - 200 мг/кг; 4-й - 225 мг/кг; 5-й - 250 мг/кг; 6-й - 275 мг/кг. Блокатор ПАРП, 4-ГК («Sigma», США; 100 мг/кг) вводили двічі на тиждень, у разі збігання з імунізацією – за 1 год до застосування БСА. Контрольними були миші, яким робили ін'єкції фізіологічного розчину замість БСА та 4-ГК у відповідному об'ємі за цією самою схемою. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу, забирали кров, тимус й лімфовузли для подальших досліджень.

Клітини тимуса та лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням, центрифугуванням у забуференому фосфатами фізіологічному розчині (ЗФР). Відсоток живих та ушкоджених клітин в отриманих суспензіях встановлювали рутинним методом виключення барвника – трипанового синього. Шляхи клітинної загибелі вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флюоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (йодидом пропідіуму і Хехст 33342), як описано раніше [11]. Використовували відеосистему передачі зображення з люмінесцентного мікроскопа «Люам І-1» (водно-імерсійний об'єктив х 85) на комп'ютер. Визначали відсоток живих, некротичних та апоптотичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса та лімфовузлів визначали методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) [12] з деякими модифікаціями. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв в лужному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі струму 100 мА протягом 30 хв. Аналізували ДНК-комети на електрофореграмах, забарвлених флуоресцентним барвником DAPI (4',6-діамідін-2- феніліндол), візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люам І-1» та відеосистему передачі зображення на

комп'ютер за допомогою водно-імерсійного об'єктива ( $\times 30$ ). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. Їх поділяли за загально визнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у "голові" та "хвості" комети [13]. Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс ДНК-комет ( $I_{\text{ДК}}$ ), який обчислювали за формулою:  $I_{\text{ДК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$ , де  $n_0 - n_4$  – число ДНК-комет кожного типу,  $\Sigma$  – сума підрахованих ДНК-комет [14].

Активацию ПАРП у клітинах тимуса та лімфовузлів оцінювали за імуноцитохімічним виявленням полі-АДФ рибози (ПАР), що утворюється ферментом ПАРП [4]. Мазки клітин, виділених з вилючкової залози і лімфатичних вузлів, фіксували 2 хв у суміші метанол-ацетон (1:1) при кімнатній температурі з наступним промиванням у 3ФР. Далі проводили демаскування антигенних детермінант у 0,1 ммоль/л цитратному буфері (pH 6) 30 хв при 92-95 ° С на киплячій водяній бані. Після відмивання мазків блокували ендогенну пероксидазу впродовж 30 хв (0,3%-й  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 60% метанолу), а потім промивали в 3ФР. Неспецифічне зв'язування блокували 1 год в 1,5%-му розчині БСА на 3ФР, що містить 0,3% Тритон X-100, а потім інкубували з поліклональними кролячими антитілами, специфічними до ПАР («BD Pharmingen» США) впродовж 12 год (1:100, 4° С). Після відмивання в 3ФР (3рази по 10 хв) зразки інкубували з антитілами до імуноглобулінів кроля, кон'югованими з пероксидазою («Sigma», США) 1 год (1: 100, при кімнатній температурі) з подальшим відмиванням (2 рази по 10 хв). Візуалізацію реакції проводили при інкубації препаратів з діамінобензидином за загальноприйнятою методикою. Негативним контролем слугували зразки, які не інкубували з первинними антитілами. Підраховували не менш як 200 клітин у кож-

ному препараті. Результати реакції оцінювали напівкількісно з розрахунком середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) за принципом Астальді за формулою:  $\text{СЦК} = (0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot v + 3 \cdot g + 4 \cdot d) / 100$ , де а – д – відсоток однотипних клітин з певним ступенем забарвлення (а – відсутність, б – слабо позитивна реакція, в – помірно позитивна, г – виражено позитивна, д - різко позитивна реакція).

Перевірку отриманих результатів на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова – Смирнова. За нормального розподілу статистичну обробку при порівнянні трьох груп результатів здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами тестом Ньюмена-Кейлса із використанням програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows ("GraphPad Software", США). Результати виражали як  $M \pm SD$  (середнє  $\pm$  стандартне відхилення).  $P < 0,05$  вважалося статистично вірогідним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами показано, що імунізація призводила до активації клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Це спричиняло зростання вмісту ІК в крові та їх відкладання в тканинах організму. Гістологічні дослідження тканин печінки, селезінки, нирок та аорти імунізованих мишей дали морфологічне підтвердження наявності системних патологічних змін судинної системи і паренхіми органів [11]. В цьому і попередніх дослідженнях на різних моделях імуноопосередкованих патологічних процесів ми показали також, що відбувається активація ПАРП як в імунокомпетентних клітинах (ІКК), так і в клітинах різних органів [8, 11]. Методом імуноцитохімії було встановлено, що введення інгібіторів ПАРП призводило до зменшення активації ферменту. Зокрема, при моделюванні гіперімунокомплексемії СЦК активності ПАРП у клітинах тимуса і лімфовузлів підвищувався в 2,5 та в 3 рази ( $P < 0,001$  порівнянно з контролем),

що узгоджується з даними, отриманими на інших експериментальних моделях аутоімунних хвороб [5, 15, 16]. 4-ГК за умов гіперімунокомплексемії вірогідно зменшував СЦК в 2,3 і 2 рази в клітинах тимуса і лімфовузлів відповідно. Це свідчить, що він у застосованій схемі і дозі введення ефективно інгібував ПАРП.

Відомо, що при імунзапальних процесах посилюється проліферація, диференціація та загибель ІКК. Апоптоз цих клітин є гомеостатичним процесом, націленим на обмеження імунних і запальних реакцій, тоді як їх некротична загибель може бути провідним патогенетичним механізмом. Введення чужорідного білка в нашому експерименті призводило до посилення клітинної загибелі. Кількість живих клітин, виділених з лімфовузлів, зменшувалася з  $93,0 \pm 0,7$  у контролі до  $85,6 \pm 2,2$  ( $P < 0,01$ ) у імунізованих тварин. За умов імунотоксичної патології було встановлено збільшення некрозу клітин лімфовузлів в 4,5 рази в порівняно з контролем ( $P < 0,001$ ). Кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу також підвищувалася, однак статистично вірогідних змін ми не виявили. При моделюванні системного імунотоксичного пошкодження подібно до клітин лімфовузлів, знижується відсоток живих тимоцитів за рахунок некрозу. Кількість некротичних клітин у контролі становила  $1,00 \pm 0,20$  %, за умов імунізації -  $3,55 \pm 0,99$  % ( $P < 0,05$ ). Фармакологічне інгібування ПАРП за допомогою 4-ГК призводило до покращення життєздатності ІКК внаслідок зменшення їх некротичної загибелі. У клітинах лімфовузлів відсоток некрозу був  $1,29 \pm 0,34$  у контролі,  $5,83 \pm 0,46$  за умов імунізації,  $2,5 \pm 0,52$  при введенні 4-ГК імунізованим мишам ( $P < 0,001$  порівняно з імунізацією). Застосування інгібітора ПАРП на тлі гіперімунокомплексемії призводило до зменшення кількості некротичних клітин тимуса з  $3,55 \pm 0,99$  % за умов імунізації до  $1,57 \pm 0,30$  % ( $P < 0,05$  порівняно з імунізацією, контроль становив  $1,00 \pm 0,2$  %). Введення 4-ГК не спричиняло статистично значущих

змін апоптозу. Представлені результати свідчать, що застосування 4-ГК мало подібну за направленістю і вираженістю протективну дію на клітини первинного і вторинного органів імунної системи. Інгібування ПАРП призводило до послаблення прозапальної та імунотоксичної некротичної загибелі і не зменшувало апоптоз лімфоцитів. Це важливо з точки зору терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП, оскільки достатній рівень апоптозу сприяє вилученню активованих лімфоцитів, в тому числі аутореактивних, що є необхідним для обмеження й термінації імунного запалення.

Останнім часом пошкодження ДНК розглядається як один з багатьох чинників апоптозу та клітинного старіння. За умов деяких імунотоксичних захворювань відбувається ушкодження ДНК [3], однак при імунотоксичних процесах такі дані відсутні. Тому досліджуючи пошкодження генетичного апарату ІКК при моделюванні імунотоксичного запалення визначали і роль ПАРП-1 у розвитку генотоксичного стресу клітин за цієї патології за допомогою фармакологічного інгібування ферменту. Для цього був застосований метод ДНК-комет, згідно з яким розміри та інтенсивність світіння хвоста комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [14, 17, 18]. Нами показано, що  $I_{\text{дк}}$  (загальноприйнятий інтегральний показник, який враховує зміни кількості всіх типів комет із різним ступенем ушкодження ДНК) збільшувався за умов імунізації як у клітинах лімфовузлів, так і в клітинах тимуса в 4 рази ( $P < 0,001$  відносно контролю), що свідчить про генотоксичний стрес клітин центрального і периферичного органів імунної системи (рис.1). При застосуванні 4-ГК на тлі імунізації значення  $I_{\text{дк}}$  клітин тимуса та лімфовузлів знижувалося порівняно з імунізованими БСА тваринами ( $P < 0,01$ ). У наших дослідженнях було встановлено, що через 6 тиж після початку імунізації БСА збільшувався відсоток комет, котрі належить до 3-4-го класу, який характеризує

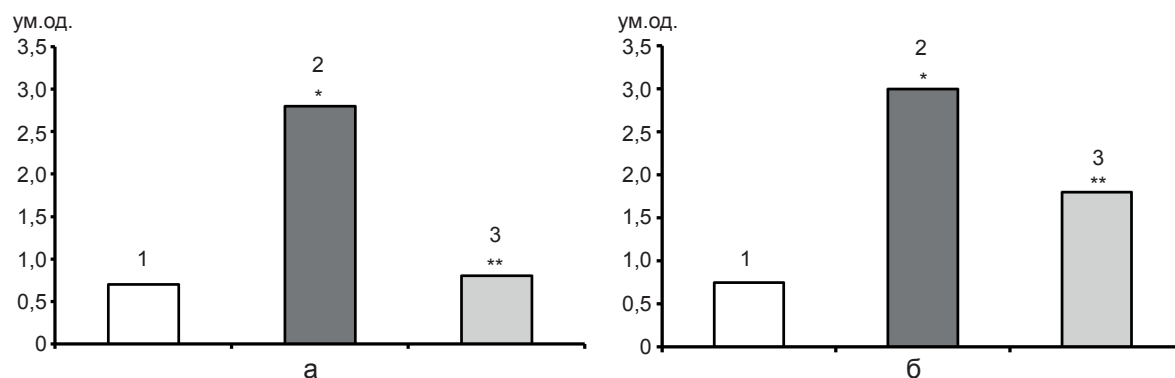


Рис. 1. Індекс ДНК - комет клітин тимуса (а) лімфовузлів (б) за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та введення блокатора ПАРП 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК): 1 - контроль, 2 – імунізація, 3- імунізація і введення 4-ГК. \*  $P < 0,001$  - відносно контролю; \*\*  $P < 0,01$  - відносно імунізованих БСА тварин

сильне пошкодження ДНК (рис. 2,3). Введення імунізованим мишам інгібітора ПАРП-1 4-ГК призводило до зменшення кількості клітин з сильним пошкодження ДНК (рис. 3,4). Таким чином, генералізований імунокомплексний патологічний процес призводить до пошкодження ДНК і загибелі ІКК як центрального (тимуса), так і периферичних органів імунної системи (лімфовузлів), а інгібування ПАРП мало виражену цитопротективну дію. Можна стверджувати, що за умов імунокомплексної патології одним із провідних механізмів ушкодження ДНК і некротичної загибелі є активація клітин вродженого імунітету з посиленою продукцією прозапальних чинників (цитокінів, активних форм кисню тощо), що було показано як у наших попе-

редніх дослідженнях, так і на інших моделях гіперімунокомплексемії [19, 20]. Запалення, індуковане ІКК, призводить також до експресії індукційної NO-синтази та до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [21]. Ці сполуки за умов недостатнього антиоксидантного захисту можуть спричиняти генотоксичний стрес, що було встановлено в нашому теперішньому дослідженні.

Таким чином, з'ясовано, що довготривала імунізація мишей чужорідним білком БСА, яка спричиняє імунокомплексну патологію, призводить до активації ПАРП і генотоксичного стресу ІКК. При цьому знижується життєздатність клітин за рахунок підвищення їх некротичної загибелі. Нині запропоновано один із провідних механізмів

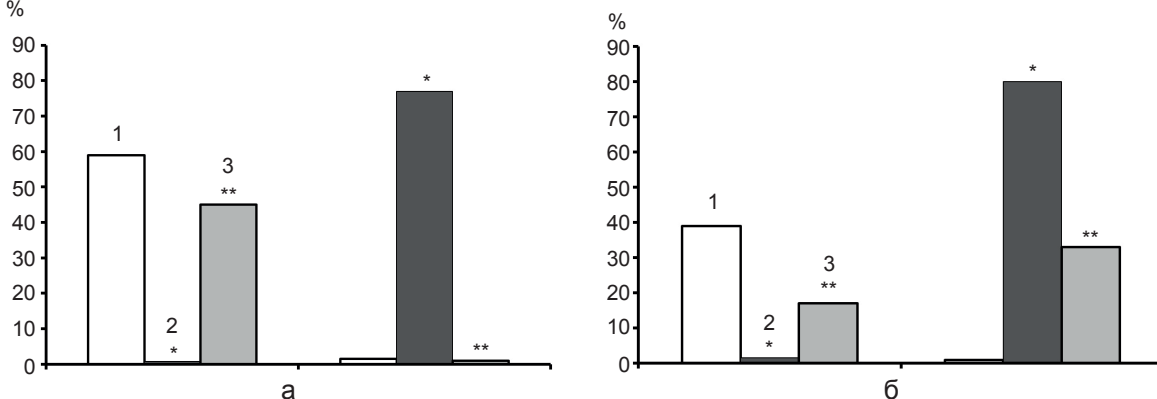


Рис. 2. Зміни кількості ДНК-комет клітин тимуса (а) з інтактною (І) та з сильно ушкодженою ДНК (ІІ) та клітин лімфовузлів (б) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та при дії 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК). 1-контроль, 2- імунізація, 3 – 4-ГК.

\*  $P < 0,01$  - відносно контролю; \*\*  $P < 0,01$  - відносно імунізованих БСА тварин



мів ПАРП-опосередкованого ушкодження із встановленням позитивних зворотних зв'язків самопідсилення [1, 6, 9]: значний генотоксичний стрес спричиняє надмірну активацію ПАРП, призводить до виснаження енергетичних ресурсів і некрозу клітин. Вихід клітинного вмісту назовні, в свою чергу, сильно активує клітини-ефектори запалення зі збільшенням синтезу прозапальних цитокінів, реактивних форм кисню та азоту, що посилює генотоксичний стрес та активацію ПАРП. Відповідно, інгібування ПАРП перериває цей патологічний процес посилення запалення й виявляє протективну дію, в тому числі й при деяких імунотоксичних хворобах [5-10]. Блокатор ПАРП 4-ГК мав виражений цитопротективний ефект за умов імунотоксичної патології: покращувався морфофункціональний стан ІКК, збільшувалась їх життєздатність внаслідок послаблення некрозу, суттєво зменшувалось ушкодження ДНК. Отримані результати свідчать про патогенетичну роль ПАРП у розвитку імунотоксичного ушкодження, а також про перспективність терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП при хворобах, пов'язаних із ІК. Розробка препаратів, які диференційовано впливали б на клітинну загибель за різними шляхами є важливою для лікування аутоімунних уражень: вони повинні зменшувати прозапальну та імунотоксичну некротичну загибель, водночас не пригнічуючи апоптоз. За наведеними вище результатами, такими модуляторами шляхів клітинної загибелі є інгібітори ПАРП, зокрема, застосований нами 4-ГК.

Існує думка, що, з огляду на фізіологічну роль ПАРП-1, досягнення часткового інгібування ферменту буде більш безпечним лікувальним підходом [22, 23]. У зв'язку з цим слід зазначити, що ПАРП-інгібувальні властивості мають численні ендogenous та екзогенні природні фактори, включаючи флавоноїди, активні форми вітаміну Д, похідні кофеїну, поліфеноли червоного вина, тиреоїдні гормони, поліаміни, пурини тощо [2, 22]. Застосування таких натуральних модуляторів

активності ПАРП могло б бути ефективним довготривалим безпечним засобом попередження та послаблення хронічних запальних хвороб через дієтотерапію [24]. Цей підхід до лікування та реабілітації хворих потребує подальших детальних досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Відтворення імунотоксичної патології за допомогою довготривалої імунізації чужорідним білком призводило до зменшення життєздатності клітин тимуса та лімфовузлів, переважно внаслідок значного збільшення їх некрозу, а також до ушкодження ДНК.

2. Застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК на тлі імунізації суттєво послаблювало генотоксичний стрес досліджуваних клітин.

3. Інгібування ПАРП за умов імунотоксичної патології мало виражену цитопротективну дію, посилюючи життєздатність клітин за рахунок зменшення некротичної загибелі без суттєвих змін апоптозу, що важливо для послаблення та обмеження аутоімунних та запальних процесів.

**Н.Г. Грушка**

## **ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ПОЛИ (АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ 4-ГИДРОКСИКВИНАЗОЛИНА НА ГИБЕЛЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИИ У МЫШЕЙ**

Исследовали влияние ингибитора поли (АДФ-рибоза) полимеразы (ПАРП) 4-гидроксиквиназолина (4-ГК) на степень повреждения ДНК и пути гибели клеток лимфоузлов и тимуса мышей при моделировании иммунокомплексной патологии с целью определения его возможного цитопротективного действия. Методом ДНК-комет установлено, что в условиях гипериммунокомплексии, вызванной длительной иммунизацией мышей линии СВА бычьим альбумином (БСА), индекс ДНК-комет иммунокомпетентных клеток увеличивался в 4 раза. Наблюдалось увеличение количества клеток с сильным повреждением ДНК в препаратах тимуса с 1,5 до 77% и лимфоузлов с 0 до 80%. Введение 4-ГК на фоне иммунизации БСА ослабляло генотоксический стресс, уменьшая количество лимфоцитов с сильным повреждением ДНК, что способствовало росту процента клеток с интактной

ДНК. Применение ингибитора ПАРП мало выраженный цитопротективный эффект: приводило к увеличению жизнеспособности иммуноцитов преимущественно за счет уменьшения их некротической гибели, вызванной иммунизацией БСА. Итак, наши данные свидетельствуют, что ПАРП может участвовать в развитии повреждения клеток тимуса и лимфоузлов в условиях гипериммунокомплексемии, а также указывают на перспективность разработки препаратов на основе ингибиторов данного фермента с профилактической и лечебной целью при иммунокомплексных патологии.

Ключевые слова: поли(АДФ-рибоза)полимераза; иммунокомплексная патология; лимфоциты; повреждения ДНК; клеточная гибель.

**N.G. Grushka**

# THE EFFECT OF OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE INHIBITOR 4-HYDROXY-QUINAZOLINE ON DEATH OF IMMUNE CELLS UNDER IMMUNE COMPLEX-MEDIATED INJURY IN MICE

The influence of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 4-hydroxyquinazoline (4-HQ) on the level of DNA damage and on the death of thymic and lymph node cells in mouse model of immune complex injury was investigated to reveal its possible cytoprotective effect. As shown by comet assay, DNA damage index of immune cells was increased 4,0 times in mice with immune complex-mediated pathology induced by a long-term immunization of CBA mice with bovine serum albumin (BSA),  $P < 0,001$ . The percentage of thymic cells with strong DNA damage was increased to 77 % under immunization (compared to 1,5 % in control mice) and the percentage of such cells from lymph nodes was increased to 80 % (compared to 0 % in control), in both cases  $P < 0,001$ . Genotoxic stress was reduced by treatment of immunized mice with 4-HQ: the percentage of lymphocytes with strong DNA damage was significantly decreased that promoted increase in the amount of cells having intact DNA. PARP inhibition exerted a strong cytoprotective effect: viability of thymus and lymph node cells was increased mainly due to reduced level of necrosis. So, our results suggest that PARP may be involved in thymic and lymph node cell damage in immune complex mediated pathology and give evidence that inhibition of this enzyme may constitute a perspective target in immune complex diseases prevention and therapy.

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

## REFERENCES

1. Makogon NV, Alexeyeva IM. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): physiological and pathological roles. *Fiziol Zh.* 2012; 58 (3): 95-112.[Ukrainian].
2. Drel VR, Sybirna NO. Nephroprotective effect of grape wine in the rat with experimental diabetes mellitus. *Stud Biol.* 2009; 3 (3): 59– 68.
3. Bao Z, Xiong J, Li W, Chen Z, Shen H, Ying S. Genomic instability in chronic airway inflammatory diseases. *Biomed J.* 2015; 38(2):117-24.
4. Toth-Zsomboki E, Horvath E, Vargova K et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med.* 2006;12(9-10):221-8.
5. Jog NR, Dinnall JA, Gallucci S, Madaio MP, Caricchio R. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the progression of autoimmune nephritis in males by inducing necrotic cell death and modulating inflammation. *J Immunol.* 2009; 182(11):7297-306.
6. Bai P. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Lett.* 2012; 586 (21): 3771–7.
7. Gonzalez-Rey E, Martínez-Romero R, O'Valle F, Aguilar-Quesada R, Conde C, Delgado M, Oliver FJ. Therapeutic effect of a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response. *PLoS ONE.* 2007; 2 (10): e1071.
8. Grushka N, Makogon N, Pavlovych S, Bryzgina T, Martynova T, Sukhina V, Yanchiy R. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect against concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Health Sci.* 2014;3(11): 463-8.
9. Wang Y, Dawson VL, Dawson TH. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 2009; 218 (2):193–202.
10. Fuerst M. More than a handful of PARP inhibitors in development to treat hereditary breast cancer. *Oncol Tim.* 2014; 36 (2): 50-1.
11. Lytvynenko AP, Pavlovych SI, Makogon NV, Yanchiy RI. Effects of inhibitor of poly (ADP-ribose)polymerase on the deposition of immune complexes and uterine contractility under systemic immune complex disorders in mice. *Med Hydrol Rehabil.* 2014; 12 (1/4): 15-21.
12. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments . *Electrophoresis.* 2010; 31: 512-19.
13. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-61.
14. Sorochinska J, Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Oncology.* 2008; 10 (3): 303-8.
15. Kamboj A, Lu P, Cossoy MB. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 contributes to neuroinflammation and neurological dysfunction in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflam.* 2013; 10: 49–58.
16. Ahmad SF, Zoheir KM, Bakheet SA, Ashour AE, Attia SM. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor modulates T regulatory and IL-17 cells in the prevention of adjuvant induced arthritis in mice model. *Cytokine.* 2014; 68(2): 76–85.

17. Heaton PR, Ransley R, Charlton CJ, Mann SJ, Stevenson J, Smith BH, Rawlings JM, Harper EJ. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. J Nutr. 2002;132(6 Suppl 2):1598-603.
18. Kaminsky VO, Lutsik MD, Stoika RS. Comet assay of dna fragmentation: modification of silver staining for obtaining permanent preparations. Ukr Biochem. 2005; 77(6): 105-7.
19. Chopyak V, Valchuk IV, Hayduchok IG. Hiperimuno-kompleksnyy syndrome in experiment and clinic. Bull Sci Res. 2007; 1: 5-8.
20. Pavlovych SI, Lytvynenko AP, Makogon NV, Martynova TV, Bryzgina TM, Yanchiy RI, Cukhina VS, Shepel OA, Voznesenska TYu, Blashkiv TV, Getmanets AV. Immunomorphological characterization of mouse model of a systemic immune complexes mediated pathology. Rep Morphol. 2014; 8 (2):496-500.
21. Jancar S, Sánchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. Trends Immunol. 2005;26(1):48-55.
22. Kirkland J. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health. Exp Biol Med. 2010; 235 (5):561 –68.
23. Besson V.C. Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose) polymerase pathway modulation. Br J Pharmacol. 2009; 157: 696-704.
24. Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1. Mol Neurobiol. 2012; 46 (1): 55-63.

*Матеріал надійшов  
до редакції 04.07.2016*

# Зміни реографічних показників гомілки у спортсменів різних видів спорту

О.П. Хапіцька, А.О. Іваниця, І.С. Стефаненко, Л.А. Сарафинюк, В.М. Мороз

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова; e-mail: lsarafinyuk@mail.ru

*Визначали зміни часових, амплітудних і похідних від них показників реовазограми гомілки у спортсменів високого рівня майстерності юнацького віку, які займаються волейболом, легкою атлетикою і боротьбою зі спортивним стажем не менше ніж 3 роки. Встановлені вірогідні відмінності часових, амплітудних і похідних від них показників реовазограми гомілки залежно від впливу інтенсивних фізичних навантажень. У волейболістів порівняно з юнаками, які не займаються спортом, визначені більші значення загального тону артерій (на 11,2 %), артерій великого діаметра (на 8,2 %), середнього та малого діаметра (на 13,5 %), часу висхідної частини реовазограми (на 2 %) і повільного кровонаповнення (5,9 %) та менші дикротичний індекс (на 17 %), тривалість реографічної хвилі (на 3,7 %), час низхідної частини реовазограми (10 %). Особи контрольної групи мали більші значення базового імпедансу порівняно з борцями (на 9,9 %) і легкоатлетами (на 13,7 %) та всі амплітудні показники реограми гомілки порівняно з легкоатлетами (в середньому на 12-15 %) і борцями (на 22-23 %). Розмір та об'єм кровотоку артерій кінцівок адаптовані до метаболічних потреб відповідної мускулатури. У волейболістів порівняно з легкоатлетами менші тривалість реографічної хвилі (на 10 %), час низхідної частини реограми (на 12,7 %), базовий імпеданс (на 17,2 %), амплітуди систолічної хвилі (на 17 %) та швидкого кровонаповнення (на 21 %), всі тонічні показники (на 12,2-16,9 %) та більші значення часу висхідної частини реограми (на 3,5 %) і повільного кровонаповнення (на 5,9 %). Борці порівняно з легкоатлетами мали меншу тривалість реографічної хвилі (на 6,1 %), час низхідної частини реограми (на 6,1 %), амплітуду систолічної хвилі (на 9,3 %); порівняно з волейболістами у них менші значення середньої швидкості швидкого кровонаповнення (на 15,6 %), тону артерій різного діаметра (на 15-16,5 %), всіх амплітудних показників (на 20-28 %), часу повільного кровонаповнення (на 9,7 %), висхідної частини реограми (на 10,3 %). Отже, рівень фізичної активності та особливості м'язової діяльності суттєво позначаються на показниках регіонарного кровотоку.*

*Ключові слова:* регіонарний кровотік; реовазограма гомілки; волейболісти; легкоатлети; борці.

## ВСТУП

Функціонування серцево-судинної системи визначає фізичну працездатність, а отже і підкорення високих спортивних планок. Увага вчених зосереджена на роботі серця, хоча, на нашу думку, не можна нехтувати роллю периферичного кровообігу, адже саме він забезпечує кровопостачання працюючих м'язів [1]. Вивчення фізіологічних механізмів адаптації кровопостачання м'язів при певних видах рухової діяльності має велике значення як для експериментальної і клінічної практики, так і в спорті при формуванні науково-методичних рекомендацій з контролю та

© О.П. Хапіцька, А.О. Іваниця, І.С. Стефаненко, Л.А. Сарафинюк, В.М. Мороз

оптимізації системного кровообігу в умовах тренувальної та змагальної діяльності [2].

Відомо, що маса м'язів становить приблизно 40 % від маси тіла. Найбільший діапазон змін кровопостачання є характерною особливістю кровообігу саме скелетних м'язів. У стані спокою до них надходить 18-20 % загального об'єму спожитого кисню, що становить 50-60 мл·хв<sup>-1</sup> [3]. Під час фізичного навантаження кровопостачання скелетних м'язів може збільшуватись у 10-20 разів порівняно зі станом спокою, отже, збільшується і частка кисню, яка надходить до активних м'язів до 2,8-3,3 л·хв<sup>-1</sup> [4]. Зважаючи на

зазначені вище факти, очевидно, що система периферичних судин відіграє важливу роль у розвитку пристосувальних реакцій до тренувальних і змагальних навантажень [5].

Реовазографія, що ґрунтується на графічній реєстрації коливань значень електричного опору живих тканин, органів та ділянок тіла при пропусканні через них змінного електричного струму [6], є надзвичайно важливою під час здійснення діагностики захворювань периферичних артерій і вен, що супроводжуються частковим звуженням або повною обтурацією судин при атеросклерозі, синдромі Рейно, облітеруючому ендартеріїті, діабетичній полінейропатії тощо [7-9]. Саме тому у США, Японії та більшості європейських країн реовазографія входить до рекомендацій щодо скринінгового обстеження професійних спортсменів з приводу серцево-судинних захворювань [10].

Метою нашого дослідження було визначити особливості регіонарного кровотоку нижніх кінцівок у представників різних видів спорту.

## МЕТОДИКА

Комісією з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (протокол № 2 від 4 лютого 2016 р.) встановлено, що проведені дослідження не суперечують основним біоетичним нормам Гельсінської декларації прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації про права людини, Міжнародному кодексу медичної етики та законам України і можуть бути використані в науковій роботі. У дослідженні взяли участь 283 особи чоловічої статі юнацького віку (від 17 до 21 року). Контрольну групу склали 74 юнаки, які не займалися спортом і на момент обстеження були практично здоровими. Висновок було зроблено після проведеного їм детального клініко-лабораторного дослідження (ультразвукової діагностика серця, магістральних судин,

щитоподібної залози, паренхіматозних органів черевної порожнини, нирок, сечового міхура; рентгенографії грудної клітки; спірографії; тетраполярної реокардіографії; стоматологічного обстеження; визначення основних біохімічних показників крові; оцінки вмісту гормонів щитоподібної залози). Нами також проведено комплексне обстеження спортсменів різних видів спорту високого рівня спортивної майстерності (від першого дорослого розряду до майстрів спорту), які були розподілені на 3 групи: волейболісти (60 осіб), легкоатлети (88 осіб) та борці (61 особа). У групу легкоатлетів увійшли спортсмени бігового спрямування з максимальною (біг на 100, 200, 110 м з бар'єрами) і субмаксимальною (біг на 400 м) інтенсивністю роботи. Борці були легкої та середньої вагових категорій. Всі спортсмени мали спортивний стаж не менше як 3 роки та на момент обстеження знаходилися на підготовчому періоді тренувального циклу. Діагностику проводили не менше ніж через добу після тренувального навантаження. Таким чином, групи спортсменів склали теж практично здорові особи. Вибір саме цих видів спорту зумовлено різною м'язовою діяльністю спортсменів під час тренувань і змагань [11, 12].

Реовазографічні показники визначали за допомогою комп'ютерного діагностичного комплексу, що забезпечує одночасну реєстрацію електрокардіограми, фонокардіограми, основної та диференціальної тетраполярної реограми та вимірювання артеріального тиску. Їх оцінка проведена за часовими, амплітудними показниками та похідними від них за методикою Ронкіна та Іванова [13]. Статистичну обробку отриманих результатів було проведено з використанням пакета Statistica 5.5 (ліцензійний № AXXR910A374605FA). Визначали характер розподілів для кожного з отриманих варіаційних рядів за Шапіро-Уїлком, середні та стандартне квадратичне відхилення для кожної ознаки. Оскільки у переважній



більшості випадків розподіл ознак, які вивчалися, відрізнявся від нормальних, ми використовували непараметричні методи статистичного аналізу, вірогідність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Мана-Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У спортсменів з різною м'язовою діяльністю більшість часових показників реограми гомілки мали вірогідні відмінності (табл. 1), за винятком часу швидкого кровонаповнення, який, у першу чергу, визначається тонусом судинного русла на рівні великих артерій

регіону [13]. Нами встановлено, що тривалість реографічної хвилі на гомілці, найбільша у легкоатлетів, найменша у волейболістів. Легкоатлети мали цей часовий показник більший, ніж волейболісти ( $P < 0,001$ ) та борці ( $P < 0,01$ ); у юнаків, які не займаються спортом, час розповсюдження пульсової хвилі був більший, ніж у волейболістів ( $P < 0,01$ ). У борців і юнаків контрольної групи тривалість реографічної хвилі знаходилася на одному рівні.

Час висхідної частини реовазограми, який не залежить від частоти серцевих скорочень, а відображає період повного розкриття судини та дає чітку інформацію про стан судинної стінки [13], у волейболістів, навпаки,

Таблиця 1. Особливості часових показників (с) реограми гомілки

Показник, група обстеження	M±SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
Тривалість реографічної хвилі				
Контроль	0,995±0,163	<0,01	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,921±0,128	-	<0,001	>0,05
Легкоатлети	1,014±0,152	<0,001	-	<0,05
Борці	0,955±0,130	>0,05	<0,05	-
Час висхідної частини реограми				
Контроль	0,147±0,039	<0,01	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,150±0,024	-	<0,05	<0,001
Легкоатлети	0,145±0,026	<0,05	-	>0,05
Борці	0,136±0,020	<0,001	>0,05	-
Час низхідної частини реограми				
Контроль	0,848±0,151	<0,001	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,771±0,122	-	<0,001	<0,05
Легкоатлети	0,869±0,149	<0,001	-	<0,05
Борці	0,819±0,125	<0,05	<0,05	-
Час швидкого кровонаповнення				
Контроль	0,062±0,037	>0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,060±0,023	-	>0,05	>0,05
Легкоатлети	0,059±0,026	>0,05	-	>0,05
Борці	0,055±0,019	>0,05	>0,05	-
Час повільного кровонаповнення				
Контроль	0,085±0,011	<0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,090±0,013	-	<0,05	<0,001
Легкоатлети	0,085±0,011	<0,05	-	>0,05
Борці	0,082±0,012	<0,001	>0,05	-

Примітка. Тут і в табл. 2, 3 P<sub>1</sub> – вірогідність різниці показників реограми гомілки у волейболістів; P<sub>2</sub> – вірогідність різниці показників реограми гомілки у легкоатлетів; P<sub>3</sub> – вірогідність різниці показників реограми гомілки у борців.

більший, ніж у легкоатлетів ( $P<0,05$ ), борців ( $P<0,001$ ) та юнаків контрольної групи ( $P<0,01$ ), найменшим він був у борців. Встановлено, що чим менший цей показник, тим вища швидкість кровотоку [14], тому що він відображає здатність судини до розтягування і дає змогу побічно судити про швидкість кровонаповнення судини і залежить від тону судин опору (артеріол і капілярів) [15].

Час низхідної частини реовазограми, який характеризує здатність судинної стінки скорочуватися і повертатися до вихідного стану і відображає її еластичність [16], у волейболістів статистично значуще менший, ніж у легкоатлетів (у яких він є найбільшим серед усіх груп порівняння), борців та неспортсменів. У борців менший час низхідної частини реограми ( $P<0,05$ ), ніж у легкоатлетів.

Час повільного кровонаповнення у волей-

болістів вірогідно більший, ніж у юнаків інших груп. Слід відмітити майже однакові його середні значення у контрольній групі у легкоатлетів і борців (див. табл. 1).

Базовий імпеданс, який відображає опір тканин при проходженні через них слабого електричного струму високої частоти, у волейболістів був найвищим (табл. 2), вірогідність встановлена між ними та легкоатлетами і борцями ( $P<0,001$ ). Юнаки контрольної групи теж мали достатньо високі значення базового імпедансу, який у них статистично значуще більший, ніж у легкоатлетів і борців. Оскільки, базовий імпеданс зумовлений загальним кровонаповненням тканин і їх опором та має зворотну залежність від кровонаповнення певної ділянки тіла [15], його високі значення у волейболістів свідчать про знижене кровонаповнення тканин гомілки.

**Таблиця 2. Особливості амплітудних показників (Ом) реограми гомілки**

Показник, група обстеження	M±SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
Базовий імпеданс				
Контроль	66,97±10,62	>0,05	<0,001	<0,01
Волейболісти	69,03±9,903	-	<0,001	<0,001
Легкоатлети	58,88±9,947	<0,001	-	>0,05
Борці	60,90±11,56	<0,001	>0,05	-
Амплітуда систолічної хвилі				
Контроль	0,053±0,015	>0,05	<0,05	<0,001
Волейболісти	0,055±0,015	-	<0,01	<0,001
Легкоатлети	0,047±0,013	<0,01	-	<0,05
Борці	0,043±0,010	<0,001	<0,05	-
Амплітуда інцизури				
Контроль	0,020±0,011	>0,05	<0,01	<0,001
Волейболісти	0,018±0,007	-	>0,05	<0,05
Легкоатлети	0,016±0,008	>0,05	-	>0,05
Борці	0,015±0,007	<0,05	>0,05	-
Амплітуда діастолічної хвилі				
Контроль	0,023±0,009	>0,05	<0,05	<0,001
Волейболісти	0,021±0,006	-	>0,05	<0,01
Легкоатлети	0,019±0,006	>0,05	-	>0,05
Борці	0,017±0,006	<0,01	>0,05	-
Амплітуда швидкого кровонаповнення				
Контроль	0,022±0,006	>0,05	<0,05	<0,01
Волейболісти	0,023±0,006	-	<0,001	<0,001
Легкоатлети	0,019±0,006	<0,001	-	>0,05
Борці	0,018±0,005	<0,001	>0,05	-

Найменша амплітуда систолічної хвилі виявлена у борців, достовірна різниця встановлена при порівнянні з групами легкоатлетів ( $P < 0,05$ ), волейболістів і неспортсменів ( $P < 0,001$ ). У волейболістів значення цього показника статистично значуще більше, ніж у спортсменів інших груп, але не має суттєвої різниці при порівнянні з юнаками, які не займаються спортом. Легкоатлети, як і борці, мали невисоку амплітуду систолічної хвилі, достовірна різниця встановлена при порівнянні з групами неспортсменів і волейболістів. Юнаки, які не займаються спортом, порівняно з легкоатлетами та борцями мали вірогідно більші значення амплітуд інцизури та діастолічної хвилі, у них ці реовазографічні показники найбільші, у борців – найменші. Амплітуда швидкого кровонаповнення найбільша у волейболістів ( $P < 0,001$ ); у юнаків контрольної групи більша, ніж у легкоатлетів ( $P < 0,05$ ) і борців ( $P < 0,01$ ; див. табл. 2).

Середні значення дикротичного індексу практично не відрізняються у спортсменів різних видів спорту, найбільші значення виявлено у юнаків, які не займаються спортом (табл. 3). Оскільки цей показник відображає переважно тонус артеріол [17] і залежить від стану периферичного судинного опору на рівні пре- і посткапілярів [18], його зменшення ми можемо розглядати як приклад нераціональної адаптації серцево-судинної системи у волейболістів до систематичних фізичних навантажень. Кудря і співавт. [18] встановили, що у спортсменів з перевагою навантажень динамічного характеру, збільшується судинний тонус на рівні прекапілярів, а тонус венозних судин на рівні посткапілярів, відтік крові з артерій у вени підвищений у представників силових видів спорту.

Значення діастолічного індексу не мало достовірних відмінностей при порівнянні груп спортсменів та юнаків, які не займаються спортом. Середня швидкість швидкого кровонаповнення найбільша у волейболістів, найменша – у борців, між цими групами

порівняння встановлено вірогідні відмінності. Юнаки контрольної групи мали найвищу середню швидкість повільного кровонаповнення, яка більша, ніж у легкоатлетів ( $P < 0,05$ ) і борців ( $P < 0,001$ ). У групі борців зафіксовано найменші значення цього показника, але вірогідність була лише при порівнянні з волейболістами ( $P < 0,05$ ).

Нами виявлено, що волейболісти мали найвищі значення тонусу всіх артерій ( $P < 0,001$ ). Між легкоатлетами, борцями та неспортсменами цей показник суттєво не відрізнявся (див. табл. 3). Тонус артерій великого діаметра у волейболістів статистично значуще більший, ніж у юнаків інших груп порівняння. Найменші значення були у борців. За тонусом артерій середнього і малого діаметра волейболісти суттєво випереджали спортсменів інших груп та юнаків контрольної групи ( $P < 0,001$ ). Найменші середні значення були у легкоатлетів. Слід зазначити, що всі реовазографічні показники тонусу судин, які вивчалися, не мали достовірних відмінностей при порівнянні у групах легкоатлетів, борців та неспортсменів (див. табл. 3). Таким чином, у волейболістів визначено вірогідно більші значення тонусу всіх артерій та тонусу артерій великого, середнього і малого діаметра. Співвідношення тонусів артерій у спортсменів з різною м'язовою діяльністю та осіб контрольної групи не мали статистично значущої різниці (див. табл. 3).

У роботі нами вперше проведено порівняльний аналіз регіонарного кровотоку нижніх кінцівок у волейболістів, борців та легкоатлетів, які мають значні відмінності за специфікою тренувальної та змагальної діяльності. Крім того, вперше вивчені показники периферичної гемодинаміки на контингенті практично здорових осіб юнацького віку, які склали контрольну групу, та спортсменів різних видів спорту. Але незважаючи на це, були виявлені значні відмінності реовазографічних показників при порівнянні груп юнаків, які не займаються спортом, і спортсменів, тому що рівень фізичної активності та особливості

м'язової діяльності суттєво позначаються на структурно-функціональних особливостях судин периферичної ланки кровообігу.

Найсуттєвіші зміни показників периферичної гемодинаміки зафіксовані у волейболістів. Порівняно з юнаками контрольної

**Таблиця 3. Особливості інтегральних показників реограми гомілки**

Показник, група обстеження	M±SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
Дикротичний індекс, %				
Контроль	37,85±17,06	<0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	32,34±13,36	-	>0,05	>0,05
Легкоатлети	33,28±12,07	>0,05	-	>0,05
Борці	33,25±12,26	>0,05	>0,05	-
Діастолічний індекс, %				
Контроль	42,66±11,28	>0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	38,43±8,351	-	>0,05	>0,05
Легкоатлети	40,66±8,189	>0,05	-	>0,05
Борці	39,98±10,10	>0,05	>0,05	-
Середня швидкість швидкого кровонаповнення, Ом/с				
Контроль	0,414±0,149	>0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	0,416±0,129	-	>0,05	<0,05
Легкоатлети	0,374±0,135	>0,05	-	>0,05
Борці	0,360±0,099	<0,05	>0,05	-
Середня швидкість повільного кровонаповнення, Ом/с				
Контроль	0,375±0,119	>0,05	<0,05	<0,001
Волейболісти	0,348±0,097	-	>0,05	<0,05
Легкоатлети	0,323±0,096	>0,05	-	>0,05
Борці	0,304±0,074	<0,05	>0,05	-
Тонус всіх артерій, %				
Контроль	14,45±3,404	<0,001	>0,05	>0,05
Волейболісти	16,07±2,880	-	<0,001	<0,001
Легкоатлети	14,04±3,015	<0,001	-	>0,05
Борці	13,97±2,415	<0,001	>0,05	-
Тонус артерій великого діаметра, %				
Контроль	5,669±2,766	<0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	6,136±2,491	-	<0,05	<0,05
Легкоатлети	5,470±2,576	<0,05	-	>0,05
Борці	5,268±1,947	<0,05	>0,05	-
Тонус артерій середнього і малого діаметра, %				
Контроль	8,324±2,060	<0,001	>0,05	>0,05
Волейболісти	9,449±1,613	-	<0,001	<0,001
Легкоатлети	8,077±1,557	<0,001	-	>0,05
Борці	8,223±1,640	<0,001	>0,05	-
Співвідношення тонусів артерій, %				
Контроль	74,91±45,39	>0,05	>0,05	>0,05
Волейболісти	69,08±30,93	-	>0,05	>0,05
Легкоатлети	71,84±36,91	>0,05	-	>0,05
Борці	69,54±28,46	>0,05	>0,05	-

групи у них зареєстровано достовірно більші значення загального тону артерій (на 11,2 %), артерій великого (на 8,2 %), середнього та малого діаметрів (на 13,5 %), часу висхідної частини реовазограми (на 2 %) і повільного кровонаповнення (5,9 %) та достовірно менші дикротичний індекс (на 17 %), тривалість реографічної хвилі (на 3,7 %), час низхідної частини реовазограми (10 %). Виражені зміни регіонарного кровообігу носять негативний характер, тому що можуть бути ознакою флебопатії – стану, який характеризується наявністю симптомів венозного застою у людей без виявлення виражених клінічних та інструментальних ознак органічної патології венозної системи [19-22]. Цей стан, як вважає Савельєв [23], є преморбідним щодо варикозної хвороби нижніх кінцівок. За даними Брауна [24] найвищий відсоток донозологічних станів патологій венозного кровообігу спостерігається у спортсменів ациклічних видів спорту, спеціалізації – спортивні ігри. Він вважає, що проблемою є те, що у тренерів відсутня інформація про особливості виникнення, перебігу і прояви варикозного розширення вен нижніх кінцівок у спортсменів, а, отже, тренувальний процес здійснюється без урахування цих особливостей, що і посилює патологічний процес.

Крім того, нами виявлено, що юнаки, які не займаються спортом, мали більші значення базового імпедансу, ніж борці (на 9,9 %) і легкоатлети (на 13,7 %) та всі амплітудні показники реограми гомілки, ніж легкоатлети (в середньому на 12-15 %) і борці (на 22-23 %). Виявлені зміни показників периферичного кровообігу у легкоатлетів (у м'язовій діяльності яких переважали динамічні навантаження) і борців (представників ациклічних видів спорту з великою часткою статичних навантажень) можемо розглядати як приклад раціональної адаптації до фізичних навантажень. Попова і співавт. [25] також зазначають, що для легкоатлетів характерно нормальне, не порушене кровонаповнення судин, знижений тонус великих і середніх артерій, пе-

реважуючий тонус артеріол і капілярів, а в цілому тотожний інтегральний тонус судин артеріального русла при відсутності достовірних відмінностей модуля пружності.

Розмір та об'єм кровотоку артерій кінцівок адаптовані до метаболічних потреб відповідної мускулатури, про що свідчать достовірні відмінності реовазографічних показників гомілки при порівнянні груп волейболістів, легкоатлетів і борців. У волейболістів порівняно з легкоатлетами вірогідно менші тривалість реографічної хвилі (на 10 %), час низхідної частини реограми (на 12,7 %), базовий імпеданс (на 17,2 %), амплітуди систолічної хвилі (на 17 %) та швидкого кровонаповнення (на 21 %), всі показники тону артерій (на 12,2-16,9 %) та статистично значуще більший час висхідної частини реограми (на 3,5 %) та повільного кровонаповнення (на 5,9 %). Борці порівняно з легкоатлетами мають достовірно меншу тривалість реографічної хвилі (на 6,1 %), час низхідної частини реограми (на 6,1 %), амплітуду систолічної хвилі (на 9,3 %); порівняно з волейболістами у них менші значення середньої швидкості швидкого кровонаповнення (на 15,6 %), тону артерій різного діаметра (на 15-16,5 %), всіх амплітудних показників (на 20-28 %), часу повільного кровонаповнення (на 9,7 %), висхідної частини реограми (на 10,3 %).

## ВИСНОВКИ

1. Виявлені відмінності у часових, амплітудних і похідних від них показників реовазограми гомілки у осіб чоловічої статі юнацького віку залежно від впливу інтенсивних фізичних навантажень.

2. У волейболістів порівняно з юнаками, які не займаються спортом, спостерігалися більші значення загального тону артерій та артерій різного діаметра, часу висхідної частини реовазограми і повільного кровонаповнення та менші дикротичний індекс, тривалість реографічної хвилі, час низхідної частини реовазограми. У легкоатлетів і борців встановлені



менші значення базового імпедансу та всіх амплітудних показників реовазограми гомілки, ніж у осіб контрольної групи.

3. Спортивна спеціалізація, яка зумовлює особливості м'язової діяльності, призводить до достовірних відмінностей реовазографічних показників гомілки при порівнянні груп волейболістів, легкоатлетів і борців.

4. У волейболістів порівняно з легкоатлетами менші тривалість реографічної хвилі, час низхідної частини реограми, базовий імпеданс, амплітуди систолічної хвилі та швидкого кровонаповнення, всі значення тонуся артерій та більший час висхідної частини реограми та повільного кровонаповнення. Борці порівняно з легкоатлетами мали меншу тривалість реографічної хвилі, час низхідної частини реограми, амплітуду систолічної хвилі, порівняно з волейболістами – менші значення середньої швидкості швидкого кровонаповнення, тонуся артерій різного діаметра, всіх амплітудних показників, часу повільного кровонаповнення, висхідної частини реограми.

**О.П. Хапицкая, А.А. Иваница,  
И.С. Стефаненко, Л.А. Сарафинюк, В.М. Мороз**

#### **ИЗМЕНЕНИЯ РЕОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГОЛЕНИ У СПОРТСМЕНОВ РАЗНЫХ ВИДОВ СПОРТА**

Определяли изменения временных, амплитудных и производных от них показателей реовазограммы голени у спортсменов высокого уровня мастерства юношеского возраста, занимающихся волейболом, легкой атлетикой и борьбой со спортивным стажем не менее 3 лет. Установлены достоверные различия временных, амплитудных и производных от них показателей реовазограммы голени в зависимости от влияния интенсивных физических нагрузок. У волейболистов по сравнению с незанимающимися спортом юношами определены большие значения общего тонуся артерий (на 11,2 %), большого диаметра (на 8,2 %), среднего и малого диаметров (на 13,5 %), времени восходящей части реовазограммы (на 2 %) и медленного кровенаполнения (5,9 %) и меньше дициротический индекс (на 17 %), продолжительность реографической волны (на 3,7 %), время нисходящей части реовазограммы (10 %). Лица контрольной группы имеют большие значения базового импеданса, чем борцы (на 9,9 %) и легкоатлеты (на

13,7 %) и все амплитудные показатели реограммы голени, чем легкоатлеты (в среднем на 12-15 %) и борцы (на 22-23 %). Размер и объем кровотока артерий конечностей адаптированы к метаболическим потребностям соответствующей мускулатуры. У волейболистов по сравнению с легкоатлетами меньше продолжительность реографической волны (на 10 %), время нисходящей части реограммы (на 12,7 %), базовый импеданс (на 17,2 %), амплитуды систолической волны (на 17 %) и быстрого кровенаполнения (на 21 %), все показатели тонуся артерий (на 12,2-16,9 %) и большие значения времени восходящей части реограммы (на 3,5 %) и медленного кровенаполнения (на 5,9 %). Борцы по сравнению с легкоатлетами имели меньшую продолжительность реографической волны (на 6,1 %), время нисходящей части реограммы (на 6,1 %), амплитуду систолической волны (на 9,3 %); по сравнению с волейболистами у них определены меньшие значения средней скорости быстрого кровенаполнения (на 15,6 %), тонуся артерий различного диаметра (на 15-16,5 %), всех амплитудных показателей (на 20-28 %), времени медленного кровенаполнения (на 9,7 %), восходящей части реограммы (на 10,3 %). Таким образом, уровень физической активности и особенности мышечной деятельности существенно влияют на показатели регионарного кровотока.

Ключевые слова: регионарный кровоток; реовазограмма голени; волейболисты; легкоатлеты; борцы.

**O.P. Khapitska, A.A. Ivanytsya, I.S. Stefanenko,  
L.A. Sarafinyuk, V.M. Moroz**

#### **CHANGES IN RHEOGRAPHIC INDICATORS OF SHIN IN ATHLETES OF DIFFERENT KINDS OF SPORTS**

We determined the changes of time, amplitude and derivatives of these indicators of rheovasograms of shin in sportsmen of youth age and high level of skills engaged in volleyball, athletics and wrestling with sports experience at least 3 years. We determined significant differences in the value of time, amplitude and derivatives of these indicators of rheovasograms of shin in males youth age, depending on the impact of intense exercise. The volleyball players compared to youth who do not exercise, reliably large values of the overall tone of the arteries (11,2 %), arteries of large diameter (8,2 %), arteries of medium and small diameters (13,5 %), time ascending part of rheovasograms (2 %) and a slow passage (5,9 %) and less dirototics index (17 %), duration of rheographic wave (3,7 %), time descending part of rheovasograms (10 %). The persons of control group had higher values of baseline impedance than wrestlers (9,9 %) and athletes (13,7 %) and all amplitude indicators rheograms of the shin than athletes (average 12-15 %) and wrestlers (22-23 %). The size and volume of blood flow to the arteries of the extremities adapted to the metabolic needs of the relevant muscles. In volleyball players compared to the athletes, a lower duration of rheographic wave (10 %), time of downlink part of the rheograms (12,7 %), the base impedance

(17,2 %), amplitude of the systolic wave (17 %) and rapid blood filling (21 %), all indicators tone of arteries (12,2-16,9 %) and greater value of time of rising part of rheograms (3,5 %) and slow blood filling (5,9 %). Wrestlers compared to the athletes have a lower duration of rheographic wave (6,1 %), time of downlink part of the rheograms (6,1 %), the amplitude of the systolic wave (9,3 %), compared with volleyball players set lower values of average speed of fast blood filling (15,6 %), tone of arteries with different diameters (15-16,5 %), all amplitude indicators (20-28 %), time slow blood filling (9,7 %), ascending parts rheogram (10,3 %). Thus, the level of physical activity and especially muscle activity has a significant effect on the performance of regional blood flow.

Key words: regional bloodstream; rheovasography of shin; volleyball players; athletes; wrestlers.

*Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University*

## REFERENCES

1. Baranova EA, Kapilevich LV. Effect of muscular work on the parameters of external respiration and hemodynamics of the lower extremities in athletes and untrained individuals. Tomsk St. Univ. Bull. 2012; 364: 140-42. [Russian].
2. Bergtraum DI. The modern idea of typological and individual characteristics of peripheral hemodynamics in athletes of different specializations. Young Sport Sci Ukr. 2012; 3: 19-25. [Ukrainian].
3. Rowell LB. Ideas about control of skeletal and cardiac muscle blood flow: cycles of revision and new vision. J Appl Physiol. 2004; 97 (№ 1): 384-92.
4. Novikov AV, Lavrov MN. Status of regional blood flow of upper limb after a dosed physical load. Hum Physiol. 2002; 28 (3): 69-75. [Ukrainian].
5. Maydanyuk OV, Kolodyazhna LV. State of circulation of muscles in athletes who specialize in cyclic light athletics (running on medium and long distances). Aktual Problem Fizychn Kult Sport. 2007; 13: 38-42. [Ukrainian].
6. Manoylov VF, Mosiychuk VS, Muzhitskaya NV, Nikitchuk TN, Tyimchik GS. Analysis rheograms by the phase plane. Vestn NTUU «KPI». 2013; 52: 111-19. [Ukrainian].
7. Albert N.M. Bioimpedance cardiography measurements of cardiac output and other cardiovascular parameters. Crit Care Nurs Clin North Am. 2006; 18(2): 195-202.
8. Gagnon C, Ménard J, Bourbonnais A, Ardilouze JL, Bailargeon JP, Carpentier A, Langlois MF. Comparison of foot-to-foot and hand-to-foot bioelectrical impedance methods in a population with a wide range of body mass indices. Metab Syndr Relat Disord. 2010; 8(5): 437-41.
9. Hornero G, Díaz D, Casas O. Bioimpedance system for monitoring muscle and cardiovascular activity in the stump of lower-limb amputees. Physiol Meas. 2013; 34: 189-201.
10. Recommendations and considerations related to preparation screening for cardiovascular abnormalities in competitive athletes. 2007 update. Circulation. 2007; 115: 1643-55.
11. Makarov GA. Sports medicine. Moscow: Sovetskiy sport, 2003. [Russian].
12. Solodkov AS, Sologub EB. Human Physiology. General Sport Age. Moscow: Olimpiya Press, 2005. [Russian].
13. Ronkin MA, Ivanov LB. Rheography in clinical practice. Moscow: Nauchno-meditsinskaya firma MBN, 1997. [Russian].
14. Bergtraum DI. Comparative analysis INDICES OF THE PERIPHERAL hemodynamics in blood vessels of the muscles of the lower extremities of athletes-runners. Mat. VI Mizhnar. Nauk-prakt konfer. «Adaptatsiyni mozhlyvosti ditey ta molodi» prysvyachena 190-richchyu ADPU im. K.D. Ushynskoho. 2006; 15-18. [Ukrainian].
15. Dyuzhykov AA, Kaplunova OA, Kondrashev AV, Mozhaeva NN. The anatomic aspects of ultrasound study of vessels. Rostov-on-Don: HOU VPO RostHMURoszdrava, 2010. [Russian].
16. Krupatkyn AY. Clinical neuroangiophysiology of the limbs. Moscow: Nauchnyi mir, 2003. [Russian].
17. Fleishman AN. Slow hemodynamic oscillations. Theory, practical application in clinical medicine and prevention. Novosibirsk: Nauka, 1999. [Russian].
18. Kudrya ON, Kiryanova MA, Kapilevich LV. Features of peripheral hemodynamics of athletes in adapting to loads of different directions. Byull Sibir Med. 2012; 3: 48-53. [Russian].
19. Kalinina IN, Haritonova LG. Methodical aspects of medical control for persons suffering from varicose disease of the lower extremities. Omsk: Izdatelstvo SibGUFGK, 2008. [Russian].
20. Calderwood CJ, Jamieson R, Greer IA. Gestational related changes in the deep venous system of the lower limb on light reflection rheography in pregnancy and the puerperium. Clin Radiol. 2007; 62 (12): 1174-79.
21. Musil D, Kaletova M, Herman J. Age, body mass index and severity of primary chronic venous disease. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155 (4): 367-72.
22. Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG. Relationships among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardio-metabolic risk. Diab Vasc Dis Res. 2011; 8 (2): 109-16.
23. Savelev VS. Modern trends in the surgical treatment of chronic venous insufficiency. Flebolimfologiya. 1996; 1: 5-7. [Russian].
24. Braun HA. The prevalence of venous pathology of the lower extremities among athletes of cyclic and acyclic kinds of sports. Vestn YuUrGU. – Chelyab. 2008, 4: 78-9. [Russian].
25. Popova IE, Germanov GN, Tsukanova EG. Particularities of regional hemodynamics among the middle distance runners. Nauch Teoret Z Uchen Zap. 2010, 2 (60): 104-12. [Russian].

*Матеріал надійшов до редакції 22.09.2016*

# Зміни нормованої спектральної потужності ритмів електроенцефалограми дітей і підлітків із приглухуватістю

А.В. Шкуропат, О.О. Тарасова

Херсонський державний університет; e-mail: [nastyashkuropat@yandex.ru](mailto:nastyashkuropat@yandex.ru)

*У статті наведені результати порівняння параметрів нормованої спектральної потужності основних спектральних характеристик фоновій ЕЕГ приглухуватих дітей та підлітків з їх однолітками. Нами з'ясовано, що дозрівання кіркової ритміки осіб з приглухуватістю підпорядковується тим самим закономірностям, що і фонові ритми осіб, що нормально чують: з віком на фоновій ЕЕГ осіб з приглухуватістю спостерігається поступове збільшення  $\alpha$ -ритму, але все ж нормована спектральна потужність  $\alpha$ -ритму фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю залишається нижче за аналогічні показники підлітків, що нормально чують, а представленість повільних хвиль більшою. З'ясовано, що на фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю спостерігається переміщення фокусу  $\alpha$ -активності потиличних у тім'яні зони кори, чого не спостерігається у приглухуватих дітей. Це може бути пов'язане з підвищенням активності лімбічної системи на фоні зниження тону кори приглухуватих підлітків.*

*Ключові слова:* приглухуваті діти і підлітки; фонові електроенцефалограми; нормована спектральна потужність.

## ВСТУП

Електрична активність головного мозку у стані спокою має залежність від аферентного притоку з сенсорних систем. Рецептори сенсорних систем можуть розглядатися як стимули, що активують ретикулярну формування стовбура мозку. Вона у свою чергу має вплив на тонус кори головного мозку. У науковій літературі представлена думка, що зниження сенсорного потоку призводить до зниження тону кори внаслідок недостатніх аферентних впливів [1–4]. Вивчення впливів зниження сенсорного потоку на стан головного мозку стосувалося обмеження зорової інформації. Досліджень, які стосуються вивчення функціонального стану головного мозку в умовах обмеження потоку слухової інформації досить обмежена кількість. Вони доводять [3, 5–7], що особи зі зниженим слухом мають певні відмінності у функціо-

нальному стані головного мозку порівняно з чуючими однолітками. В літературі майже не висвітлений віковий аспект змін показників електричної активності головного мозку приглухуватих осіб.

Дослідження морфологів, нейрофізіологів, психологів і педіатрів встановили, що розвиток і ріст різних відділів головного мозку відбувається не одночасно і досягають вони дефінітивного рівня на різних етапах постнатального розвитку. Нерівномірне дозрівання різних відділів кори головного мозку і підкіркових структур відображається у віковій еволюції кіркової ритміки і її реакціях на функціональні навантаження [1, 3, 6]. Основною закономірністю у характері розвитку центральної нервової системи є більш раннє дозрівання еволюційно давніх структур: від забезпечення життєвоважливих функцій стовбурових утворень – до кори великих півкуль (по вертикалі) і від проек-

ційних – для забезпечення елементарного контакту із середовищем – до асоціативних, які відповідають за складні форми психічної діяльності (по горизонталі). З віком спостерігається збільшення частоти домінуючого ритму спокою у дітей від народження до статевої зрілості. Інша важлива тенденція онтогенезу електричної активності мозку людини – це зменшення частки низькочастотних  $\theta$ - та  $\delta$ -коливань, що відповідає зниженню спектрів потужності цих складників електроенцефалограми (ЕЕГ). Молодший шкільний вік є одним з найбільш чутливих періодів онтогенезу людини, вирішальним для розвитку багатьох психофізіологічних функцій [1]. Структурно-функціональне дозрівання головного мозку продовжується протягом досить тривалого періоду онтогенезу, включаючи і підлітковий вік. І хоча великі зміни у структурі кори головного мозку властиві більш раннім періодам онтогенезу, у підлітковому віці також виявляються суттєві морфологічні зміни нейронального апарату кори – ускладнюється фіброархитектоніка, відбувається тонка диференціація пірамідальних нейронів та зірчастих клітин [6–8], перебудова міжнейрональних перетворень, збільшується питома вага волокнистих структур, які є важливим фактором удосконалення її функціональної організації.

Мета нашого дослідження – проаналізувати вікову динаміку показників біоелектричної активності головного мозку дітей та підлітків з приглухуватістю.

## МЕТОДИКА

У нашому дослідженні взяли участь 336 осіб обох статей, яких було поділено на чотири групи: діти з вадами слуху та діти, що нормально чують, підлітки з вадами слуху та підлітки, що нормально чують.

Група дітей та підлітків з вадами слуху формувалася на базі Херсонської школи-інтернату № 29 для дітей зі зниженим слухом. У досліджувану групу приглухуватих дітей

увійшли 84 дитини, серед них 41 хлопчик та 43 дівчинки, віком від 7 до 9 років, які мали двосторонню сенсоневральну приглухуватість II-III ступеня. На основі вивчення медичних карток і результатів аудіографічного обстеження було відібрано 82 підлітки з приглухуватістю (40 хлопчиків та 42 дівчини від 12 до 15 років) з діагнозом двостороння сенсоневральна приглухуватість II-III ступеня. Приглухуватість обстежуваних осіб була або вродженою. Особи, які у анамнезі мали черепно-мозкову травму, у дослідженні не брали участі. Контрольну групу осіб з нормальним слухом склали 90 учнів від 7 до 9 років загальноосвітніх шкіл м. Херсона (45 хлопчиків та 45 дівчаток того ж віку) та 80 підлітків від 12 до 15 років з нормальним слухом (40 хлопців та 40 дівчат). Усі обстежувані діти та підлітки були праворукими за самооцінкою та мануальними тестами (переплетення пальців кисті, схрещування рук на грудях, динамометрія, аплодування, вміння писати правою та лівою рукою).

ЕЕГ реєстрували за допомогою системи комп'ютерної електроенцефалографії «Braintest» (Харків, 1999). Електроди наклали по загальноприйнятій міжнародній системі «10-20» у восьми симетричних проєкціях: лобові, потиличні, тім'яні, скроневі. Як референтний електрод використовували об'єднаний вушний електрод, встановлений на мочці вуха. Електроди фіксувалися за допомогою резинового шолому. Під час запису ЕЕГ обстежувані знаходилися у світло- та звукоізолюваній камері. Смуга частот трактів підсилення та реєстрації відповідала 1,00 – 30 Гц, частота дискретизації – 50 с<sup>-1</sup>. Аналізували 60-секундні відрізки, епоха аналізу становила 2000 мс. Враховувалися такі частотні діапазони:  $\delta$  (0,2 – 3,8 Гц),  $\theta$  (4,0 – 7,8 Гц),  $\alpha$  (8,0 – 12,8 Гц),  $\beta$  (13,0 – 30 Гц). Перед проведенням дослідження усі обстежувані були інформовані про нешкідливість та безболісність процедури, її порядок і приблизну тривалість.

Для вивчення функціонального стану головного мозку приглухуватих дітей і під-



літків ми використовували аналіз зонального розподілу нормованої спектральної потужності основних частотних діапазонів електричної активності головного мозку, що дає можливість визначити співвідношення різних ритмічних складових ЕЕГ, міру їх вираженості, а також зміни при різних умовах. В основі даної програми лежить визначення зонального розподілу відносної спектральної потужності (у відсотках) основних частотних діапазонів ЕЕГ-  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  – від загальної потужності електрогенезу. Визначалась частка (у відсотках) спектральної щільності потужності в кожному із чотирьох основних діапазонів ЕЕГ.

Кількісні та якісні показники аналізували за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики, визначаючи середнє значення показників ( $M$ ) та похибку середнього ( $\pm m$ ). Вірогідність відмінностей між досліджуваними групами визначали за допомогою двовибіркового критерію Вілкоксона. Різницю між двома середньогруповими величинами вважали достовірною при  $P \leq 0,05$ . Математичні операції проводили з використанням програмних пакетів Microsoft Excel 2003 та «Statistica 6.0»

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами проведено порівняння нормованої спектральної потужності основних частотних діапазонів фоновій ЕЕГ дітей і підлітків з приглухуватістю та з нормальним слухом (табл. 1, 2). Отримані результати дозволили нам зробити висновок про вікову динаміку змін електричної активності головного мозку осіб з приглухуватістю (рисунок). Виявлені характеристики основних частотних діапазонів в спектрі ЕЕГ дітей молодшого шкільного віку свідчать, що в стані функціонального спокою в обох досліджуваних групах нормована спектральна потужність ритмів  $\alpha$ - і  $\beta$ -діапазонів має спадаючий потилично-лобний градієнт,  $\delta$ - і  $\theta$ -ритмів – зростаючий.

Слід відмітити збільшення нормованої

спектральної потужності повільних ритмів  $\delta$ - та  $\theta$ -діапазонів та зменшення основного ритму електричної активності головного мозку –  $\alpha$ -ритму – на ЕЕГ практично у всіх зонах кори головного мозку у групі досліджуваних дітей з приглухуватістю порівняно з дітьми з нормальним слухом ( $P \leq 0,05$ ).

Виявлено дифузне збільшення нормованої спектральної потужності  $\delta$ -ритму на фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю, збільшення  $\theta$ -ритму у лобовій правій зоні кори на фоновій ЕЕГ хлопців з приглухуватістю, дифузне зменшення нормованої спектральної потужності  $\alpha$ -ритму на фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю ( $P \leq 0,05$ ) та переміщення фокусу максимальної активності  $\alpha$ -ритму з потиличних у тім'яні зони кори. Спостерігалися і статеві відмінності у групі підлітків з приглухуватістю: показники  $\delta$ -ритму хлопців із приглухуватістю переважали аналогічні показники дівчат у правій потиличній зоні кори головного мозку.

Досліджуючи показники фоновій електричної активності головного мозку обстежуваних осіб з приглухуватістю ми виявили зменшення тону кори та її еферентних впливів на серединні відділи мозку внаслідок зниження аферентного потоку та зменшення активуючих впливів на кору неспецифічної ретикулярної формації. На це вказує дифузне збільшення нормованої спектральної потужності повільних ритмів ( $\delta$ - та  $\theta$ ) [9, 10]. Зниження нормованої спектральної потужності  $\alpha$ -ритму на фоновій ЕЕГ дітей та підлітків з приглухуватістю може свідчити про недостатність систем активації головного мозку [9].

Фонova активність зумовлена постійними синаптичними бомбардуваннями нейронів притоком аферентних імпульсів від різних рецепторів і інших нейронів. Цей приток аферентації з сенсорних систем є суттєвим фактором, який впливає на формування фоновій активності. В численних дослідженнях на тваринах було показано, що зменшення притоку сенсорної інформації призводить до змін фоновій активності або до змін її



**Таблиця 1. Зональний розподіл нормованої спектральної потужності ритмів ЕЕГ дітей з приглухуватістю та з нормальним слухом (%) у стані функціонального спокою ( $M \pm m$ )**

Зона	Досліджувані групи			
	Діти з приглухуватістю		Діти з нормальним слухом	
	дівчата	хлопці	дівчата	хлопці
<b>δ-діапазон</b>				
Fs	31,8 ± 1,1	32,4 ± 1,3	29,4 ± 0,9	30,3 ± 1,2
Fd	31,3 ± 1,1	32,7 ± 1,0	29,7 ± 1,0	30,1 ± 0,8
Ts	28,7 ± 0,8	29,9 ± 0,9	27,8 ± 1,0	27,9 ± 0,7
Td	29,3 ± 0,8	30,5 ± 0,9 **	27,5 ± 0,7	27,7 ± 0,8
Ps	26,1 ± 0,7 *	27,2 ± 0,8 **	22,6 ± 0,6	25,0 ± 0,6
Pd	25,1 ± 0,8 *	27,4 ± 0,9	22,8 ± 0,6	25,7 ± 0,6
Os	24,2 ± 0,6 *	25,5 ± 0,9 **	19,3 ± 0,5	20,7 ± 0,5
Od	24,3 ± 0,6 *	24,9 ± 0,7 **	18,5 ± 0,5	19,7 ± 0,5
<b>θ-діапазон</b>				
Fs	30,3 ± 1,1 *	31,2 ± 1,2 **	26,6 ± 0,7	27,5 ± 0,8
Fd	30,1 ± 1,0 *	30,5 ± 1,3	26,8 ± 0,6	27,6 ± 0,8
Ts	29,5 ± 1,1 *	30,9 ± 1,1 **	26,5 ± 0,5	27,3 ± 0,7
Td	29,3 ± 0,9 *	30,4 ± 1,0	26,9 ± 0,7	27,9 ± 0,8
Ps	26,1 ± 0,6	29,5 ± 0,9 **	25,8 ± 0,6	26,4 ± 0,6
Pd	26,3 ± 0,8	29,6 ± 1,0 **	25,6 ± 0,6	25,9 ± 0,5
Os	26,7 ± 0,6 *	27,7 ± 0,8 **	24,4 ± 0,6	25,1 ± 0,6
Od	26,8 ± 0,7 *	27,7 ± 0,9 **	24,7 ± 0,6	24,8 ± 0,6
<b>α-діапазон</b>				
Fs	20,5 ± 0,6 *	19,3 ± 0,5 **	27,9 ± 1,0	26,4 ± 0,9
Fd	21,4 ± 0,7 *	19,5 ± 0,5 **	27,6 ± 1,1	26,6 ± 0,8
Ts	24,7 ± 0,7 *	22,4 ± 0,7 **	28,9 ± 0,8	27,6 ± 1,1
Td	24,6 ± 0,6 *	22,6 ± 0,7 **	29,1 ± 1,0	27,5 ± 0,8
Ps	32,4 ± 1,1	27,4 ± 0,7 **	34,5 ± 1,2	32,3 ± 1,0
Pd	32,1 ± 1,2	27,9 ± 0,9 **	34,7 ± 1,1	32,5 ± 1,2
Os	31,6 ± 1,2 *	28,3 ± 0,9 **	35,6 ± 1,2	34,4 ± 1,3
Od	31,2 ± 1,2 *	28,7 ± 1,0 **	35,8 ± 1,3	34,9 ± 1,1
<b>β-діапазон</b>				
Fs	17,4 ± 0,4 *	17,1 ± 0,6 **	16,1 ± 0,5	15,8 ± 0,4
Fd	17,2 ± 0,5	17,3 ± 0,6 **	15,9 ± 0,5	15,7 ± 0,5
Ts	17,1 ± 0,6	16,8 ± 0,6	16,8 ± 0,5	17,2 ± 0,4
Td	16,9 ± 0,5	16,5 ± 0,5	16,5 ± 0,6	16,9 ± 0,5
Ps	16,2 ± 0,4	15,9 ± 0,6	17,1 ± 0,5	16,3 ± 0,4
Pd	16,5 ± 0,4	15,1 ± 0,5	16,9 ± 0,5	15,9 ± 0,5
Os	17,5 ± 0,6 *	18,5 ± 0,5 **	20,7 ± 0,7	20,4 ± 0,6
Od	17,7 ± 0,5 *	18,7 ± 0,7 **	21,0 ± 0,8	20,6 ± 0,7

Примітка. F – лобова частка кори головного мозку, T – скронева частка кори головного мозку, P – тім'яна частка кори головного мозку, O – потилична частка кори головного мозку, s – ліва частка кори головного мозку, d – права частка кори головного мозку, \* – достовірна різниця показників нормальночучючих дівчат при  $P \leq 0,05$  дівчаток різних груп, \*\* – нормальночучючих хлопців при  $P \leq 0,05$ .

**Таблиця 2. Зональний розподіл нормованої спектральної потужності ритмів ЕЕГ підлітків з приглухуватістю та з нормальним слухом (%) у стані функціонального спокою ( $M \pm m$ )**

Зона	Досліджувані групи			
	Підлітки з приглухуватістю		Підлітки з нормальним слухом	
	дівчата	хлопці	дівчата	хлопці
$\delta$ -діапазон				
Fs	46,49 $\pm$ 2,08 *	47,55 $\pm$ 2,01 **	34,15 $\pm$ 1,43	32,66 $\pm$ 2,16
Fd	44,70 $\pm$ 2,05 *	45,38 $\pm$ 2,09 **	32,59 $\pm$ 1,54	34,97 $\pm$ 1,76
Ts	37,82 $\pm$ 1,66 *	42,17 $\pm$ 2,04 **	27,70 $\pm$ 1,40	28,29 $\pm$ 1,20
Td	39,21 $\pm$ 2,08 *	41,00 $\pm$ 2,23 **	30,87 $\pm$ 1,77	27,29 $\pm$ 1,34
Ps	35,22 $\pm$ 1,80 *	34,09 $\pm$ 1,89 **	22,07 $\pm$ 1,04	22,65 $\pm$ 1,19
Pd	32,14 $\pm$ 1,57 *	29,43 $\pm$ 1,03 **	21,89 $\pm$ 1,49	22,72 $\pm$ 1,06
Os	35,88 $\pm$ 1,25 *	35,19 $\pm$ 1,12 **	18,73 $\pm$ 1,00	19,28 $\pm$ 1,07
Od	33,99 $\pm$ 1,94 *	36,82 $\pm$ 2,04 ** ■	19,64 $\pm$ 1,59	19,20 $\pm$ 1,06
$\theta$ -діапазон				
Fs	19,40 $\pm$ 0,98	21,33 $\pm$ 1,01	17,21 $\pm$ 0,79	18,14 $\pm$ 0,96
Fd	19,73 $\pm$ 0,76	21,53 $\pm$ 1,17 **	16,88 $\pm$ 0,61	17,00 $\pm$ 1,05
Ts	19,14 $\pm$ 0,98	20,53 $\pm$ 1,33	18,29 $\pm$ 1,09	16,85 $\pm$ 0,79
Td	19,49 $\pm$ 0,83	18,53 $\pm$ 0,87	17,44 $\pm$ 0,82	15,47 $\pm$ 0,47
Ps	13,64 $\pm$ 0,47	12,74 $\pm$ 0,78	12,17 $\pm$ 0,45	10,79 $\pm$ 0,52
Pd	12,92 $\pm$ 0,63	11,71 $\pm$ 0,20	12,54 $\pm$ 0,79	10,07 $\pm$ 0,57
Os	13,91 $\pm$ 1,26	13,53 $\pm$ 0,96	12,53 $\pm$ 1,48	10,47 $\pm$ 0,61
Od	13,88 $\pm$ 1,36	13,25 $\pm$ 1,02	11,82 $\pm$ 0,51	11,28 $\pm$ 0,62
$\alpha$ -діапазон				
Fs	25,22 $\pm$ 1,59 *	22,67 $\pm$ 1,39 **	38,36 $\pm$ 1,76	40,17 $\pm$ 2,18
Fd	26,30 $\pm$ 1,72 *	24,51 $\pm$ 1,60 **	40,17 $\pm$ 2,10	38,78 $\pm$ 1,44
Ts	33,09 $\pm$ 1,48	28,11 $\pm$ 1,51 **	42,25 $\pm$ 2,34	44,04 $\pm$ 2,43
Td	28,43 $\pm$ 1,62 *	31,72 $\pm$ 2,58 **	40,86 $\pm$ 2,21	46,91 $\pm$ 2,30
Ps	41,71 $\pm$ 2,54 *	45,01 $\pm$ 2,41 **	56,97 $\pm$ 2,45	57,74 $\pm$ 2,33
Pd	46,68 $\pm$ 2,96	50,04 $\pm$ 2,39 **	56,39 $\pm$ 2,54	58,92 $\pm$ 2,18
Os	38,06 $\pm$ 2,28 *	36,40 $\pm$ 2,11 **	57,91 $\pm$ 2,79	60,36 $\pm$ 3,01
Od	41,38 $\pm$ 2,10 *	38,18 $\pm$ 2,26 **	58,37 $\pm$ 2,06	59,71 $\pm$ 2,76
$\beta$ -діапазон				
Fs	8,90 $\pm$ 0,45	8,46 $\pm$ 0,41	10,28 $\pm$ 0,49	9,04 $\pm$ 0,53
Fd	9,26 $\pm$ 0,62	8,59 $\pm$ 0,44	10,36 $\pm$ 0,60	9,25 $\pm$ 0,54
Ts	9,95 $\pm$ 0,48	9,20 $\pm$ 0,66	11,76 $\pm$ 0,95	10,81 $\pm$ 0,62
Td	10,91 $\pm$ 0,51	8,74 $\pm$ 0,49	10,82 $\pm$ 0,42	10,33 $\pm$ 0,55
Ps	9,75 $\pm$ 0,77	8,16 $\pm$ 0,42	8,79 $\pm$ 0,49	8,82 $\pm$ 0,42
Pd	8,26 $\pm$ 0,40	8,81 $\pm$ 0,43	9,17 $\pm$ 0,74	8,29 $\pm$ 0,31
Os	12,15 $\pm$ 0,76	14,87 $\pm$ 1,46 **	10,83 $\pm$ 0,32	9,89 $\pm$ 0,49
Od	10,75 $\pm$ 0,39	11,76 $\pm$ 0,83	10,16 $\pm$ 0,40	9,81 $\pm$ 0,48

Примітка. F – лобова частка кори головного мозку, T – скронева частка кори головного мозку, P – тім'яна частка кори головного мозку, O – потилична частка кори головного мозку, s – ліва частка кори головного мозку, d – права частка кори головного мозку, \* – достовірна різниця показників нормальноточуючих дівчат при  $P \leq 0,05$  дівчаток різних груп, \*\* – нормальноточуючих хлопців при  $P \leq 0,05$ , ■ – достовірна різниця показників дівчат при  $P \leq 0,05$  дівчаток різних груп.

частоти. Це свідчить, що рецептори можуть розглядатися як стимули, які підтримують тонус ЦНС [2, 4–6]. Взаємодія кори і підкіркових структур носить складний динамічний характер і залежить від їх функціонального стану, який значною мірою визначається потоком сенсорної інформації [2].

Збільшення повільних хвиль на фоновій ЕЕГ ( $\delta$ - та  $\theta$ -коливань) пов'язано з підвищенням активності стовбурових структур внаслідок недостатніх гальмівних впливів на серединні відділи мозку з боку кори [4]. У свою чергу для нормального функціонального стану кори потрібний певний рівень аферентного потоку [2, 3]. Часткове виключення слухового аналізатора призводить до зменшення аферентного потоку та, як наслідок, зниження тону кори, яка за умов зниженого функціонування недостатньо гальмує серединні відділи мозку, що спричинює збільшення повільнохвильової активності, що спостерігається на фоновій ЕЕГ осіб з приглухуватістю.

З віком відбувається поступово зменшується представленість повільних хвиль на фоновій ЕЕГ та збільшується представленість  $\alpha$ -ритму [6]. Така тенденція спостерігається і у досліджуваних дітей та підлітків з приглухуватістю. Але при порівнянні показників фоновій ЕЕГ осіб з приглухуватістю та осіб з нормальним слухом, виявляється, що представленість повільних хвиль у спектрі потужності ЕЕГ все одно залишається високою. Це може свідчити про те, що дозрівання кіркової ритміки у осіб з приглухуватістю підпорядковується тим самим закономірностям, що притаманні особам з нормальним слухом, але дозрівання відбувається дещо повільніше. Також збільшення представленості  $\delta$ - та  $\theta$ -ритмів у осіб з приглухуватістю пов'язано з проявом більш ранніх та менш стійких механізмів саморегуляції та максимальне напруження компенсаторних мозкових механізмів. Ці явища є наслідком зниження аферентного потоку, яке зазнають особи з приглухуватістю.

У підлітків з приглухуватістю спостерігається переміщення фокусу максимальної вираженості  $\alpha$ -активності з потиличних у тім'яні зони кори, чого не спостерігається у дітей з приглухуватістю. Зміщення фокусу  $\alpha$ -ритму вказує на активність структур лімбічної системи на фоні зниження кортико-фугальних зв'язків [9–11]. Поява цього феномена тільки у підлітковому віці може свідчити про певне напруження адаптаційних процесів, пов'язаних з віковою динамікою гормонального статусу. Також це може бути пов'язане із зростанням рівня тривожності через усвідомлення підлітком свого дефекту та формуванням неадекватної самооцінки.

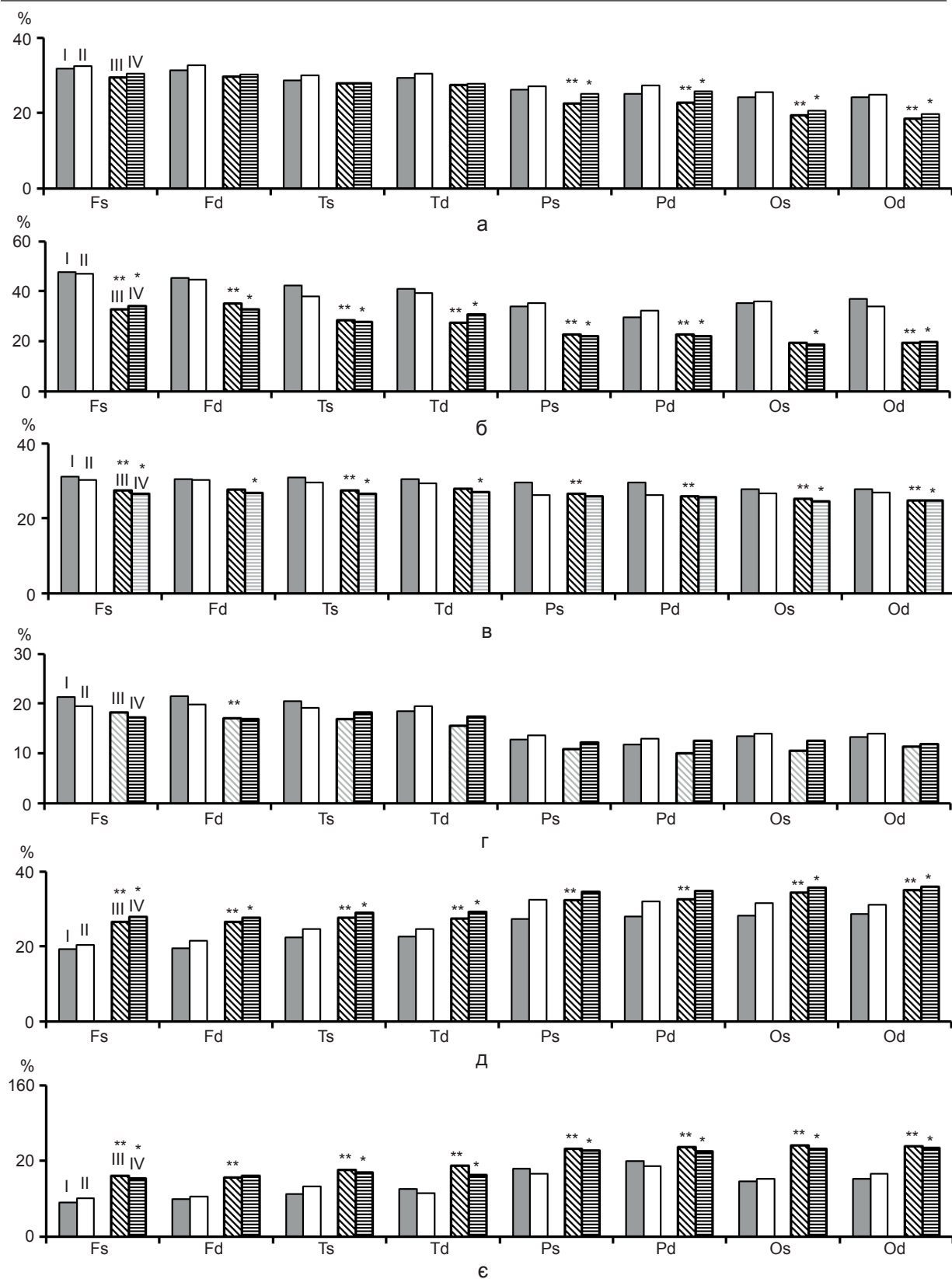
Отже, виявлені особливості вікової динаміки параметрів фоновій ЕЕГ вказують на необхідність проведення корекційно-реабілітаційної та педагогічно-розвивальної роботи не тільки у певний віковий період, а постійно у всіх вікових групах.

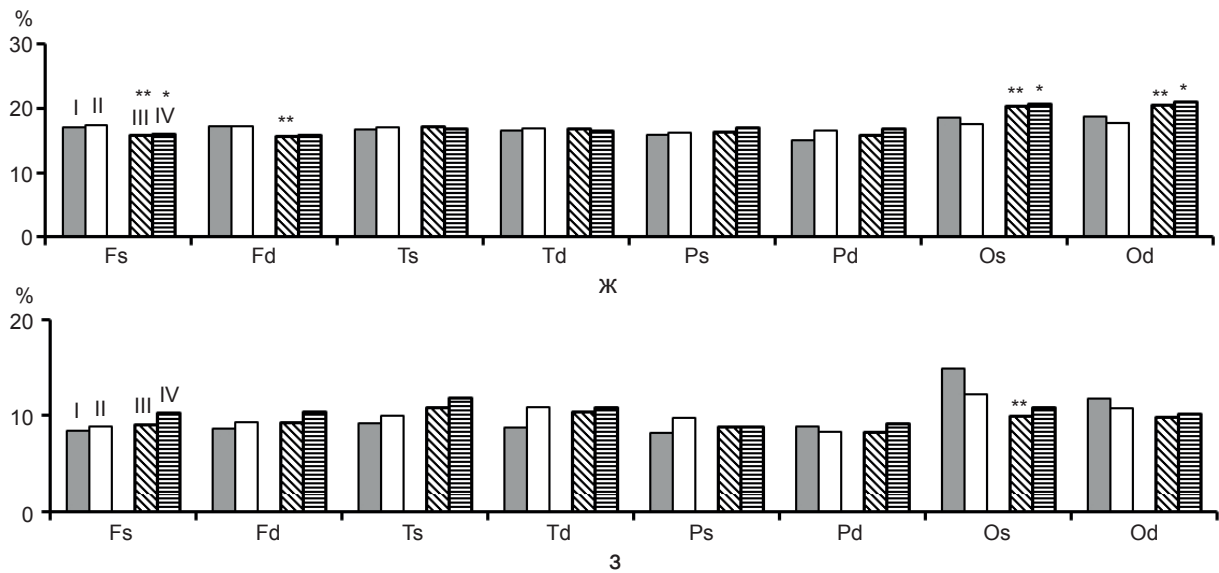
## ВИСНОВКИ

Виявлено, що діти і підлітки з приглухуватістю мають збільшення нормованої спектральної потужності повільних хвиль та зменшення нормованої спектральної потужності  $\alpha$ -ритму на фоновій ЕЕГ порівняно зі своїми однолітками, що нормальночують.

Встановлено, що дозрівання кіркової ритміки осіб з приглухуватістю підпорядковується тим самим закономірностям, як і фонові ритміка осіб з нормальним слухом: з віком на фоновій ЕЕГ осіб з приглухуватістю спостерігається поступове збільшення представленості  $\alpha$ -ритму, але все ж нормована спектральна потужність  $\alpha$ -ритму фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю залишається меншою за аналогічні показники підлітків з нормальним слухом.

З'ясовано, що на фоновій ЕЕГ підлітків з приглухуватістю спостерігається переміщення фокусу  $\alpha$ -активності з потиличних у тім'яні зони кори, чого не спостерігається у дітей з приглухуватістю. Це може бути





Зональний розподіл нормованої спектральної потужності ритмів електроенцефалограми дітей і підлітків з приглухуватістю та з нормальним слухом у стані функціонального спокою.

Примітка: F, T, P, O – лобова, скронева, тім'яна, потилична частки кори головного мозку відповідно, s, d – ліва та права частки кори головного мозку відповідно;

I – приглухуваті хлопці, II – приглухуваті дівчата, III – нормальнослухуючі хлопці, IV – нормальнослухуючі дівчат;

\* достовірна різниця показників нормальнослухуючих дівчат при  $P \leq 0,05$  дівчаток різних груп, \*\* – нормальнослухуючих хлопців при  $P \leq 0,05$ ;

а, б – показники  $\delta$ -ритму досліджуваних дітей і підлітків відповідно,

в, г – показники  $\theta$ -ритму досліджуваних дітей і підлітків відповідно,

д, е – показники  $\alpha$ -ритму досліджуваних дітей і підлітків відповідно,

ж, з – показники  $\beta$ -ритму досліджуваних дітей і підлітків відповідно.

пов'язане з підвищенням активності лімбічної системи на фоні зниження тону кори приглухуватих підлітків.

А.В. Шкуропат, О.О. Тарасова

## ИЗМЕНЕНИЯ НОРМИРОВАННОЙ СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ РИТМОВ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ТУГОУХОСТЬЮ

В статье приведены результаты сравнения параметров нормированной спектральной мощности основных спектральных характеристик фоновой ЭЭГ тугоухих детей и подростков с их сверстниками. Мы выяснили, что созревания коры ритмики лиц с тугоухостью подчиняется тем же закономерностям, что и фоновая ритмика лиц, нормально слышат: с возрастом на фоновой ЭЭГ лиц с тугоухостью наблюдается постепенное увеличение  $\alpha$ -ритма, но все же нормированная спектральная мощность  $\alpha$ -ритма фоновой ЭЭГ подростков с тугоухостью остается ниже аналогичных показателей подростков нормально слышат, а представленность медленных волн больше. Установлено, что на фоновой ЭЭГ подростков с тугоухостью наблюда-

ется перемещение фокуса  $\alpha$ -активности из затылочных в теменные зоны коры, чего не наблюдается детей с тугоухостью. Это может быть связано с повышением активности лимбической системы на фоне снижения тону кори подростков с тугоухостью.

Ключевые слова: тугоухие дети и подростки; фоновая электроэнцефалограмма; нормированная спектральная мощность.

A.V. Shkuropat, O.O. Tarasova

## CHANGES OF NORMALIZED SPECTRAL POWER OF ELECTROENCEPHALOGRAPH RHYTHMS OF HARD-OF-HEARING CHILDREN AND TEENAGERS

We showed that a cortical maturation rhythms of people with hard-of-hearing is the subject to the same laws as the background rhythm persons normally hear: with age on the background EEG in the people with hard-of-hearing is a gradual increase in  $\alpha$ -rhythm, but still normalized spectral power of the  $\alpha$ -rhythm on the background's EEG of teenagers with hard-of-hearing remains below the similar indicators adolescents normally, and greater representation of slow waves. It was found that the background's EEG of teenagers with hard-of-



hearing observed moving focus of  $\alpha$ -occipital activity in the parietal cortex, which is not observed in the hard-of-hearing children. It can be associated with an increased activity in the limbic system on the background of bark tone in the hard-of-hearing children.

Keywords: hard-of-hearing children and teenagers; electroencephalogram; normalized spectral power.

*Kherson State University*

## REFERENCES

1. Fishman M N. Functional state of the brain in children with disorders of hearing and difficulties of the formation of speech learning. Defectology . 2003; (1): 3-8. [Russian.]
2. Zenkov L R. Clinical Electroencephalography (with elements of epileptology). Manual for Physicians: A guide for doctors. Moscow: MEDpressinfo, 2004. [Russian.]
3. Machinskaya R I., Sokolova L S, Krupskaya E V. Formation of functional organization of the brain cortex in children of an early school age with different levels of maturity of the regulatory cerebral systems. Communication II. Analysis of coherence of the alpha EEG rhythm. Hum. Physiol. 2007; (2): 5-15. [Russian.]
4. Shchekout'yev G A. Neurophysiological Studies in Clin-ics. Moscow: Antidor, 2001. [Russian.]
5. Lopes da Silva F H. Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. EEG and Clin. Neurophysiology. 1991; (79): 81.
6. Dubrovinskaya N V, Farber D A, Armless M M. Psychophysiology child. Moscow: VLADOS, 2000. [Russian.]
7. Vypasnyak I. Characteristics of physical development and physical qualities of students with auditory derivation. Contemporary Problems of Physical Cult.e and Spor. 2005; (8-9): 93-7. [Ukrainian.]
8. Danko S G. On reflection of various aspects of brain activation in the EEG: shows that quantitative electroencephalography standstill with open and closed eyes. Hum. Physiol. 2006; (4): 5-17. [Russian.]
9. Shvayko S E. Features intrahemispheric and interhemispheric actions cortex in men at rest and during mental tasks solution (coherent analysis). Bulletin of Donetsk Nat. Univ. Series A: Nat. Sc. 2008; (4): 414-9. [Ukrainian.]
10. Tarasova O A. Peculiarities of EEG in hard-of-hearing children of primary school age. Neurophysiology. 2008; (2): 137-46.
11. Shkuropat A V. Analysis of Coherence in EEGs of Hard-of-Hearing Teenagers. Neurophysiology. 2010; (3): 263-74.

*Матеріал надійшов до  
редакції 06.05.2015*

# Вплив блокаторів НМДА-рецепторів на динаміку внутрішньоочного тиску у кролів

І.Л. Черешнюк, О.І. Альчук, Л.І. Маринич, Р.А. Кравець, А.О. Іваниця, О.А. Ходаківський

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова; e-mail: vin19@yandex.ru

*У дослідях на кролях з моделлю гострої тимчасової офтальмогіпертензії, яку створювали внутрішньошлунковим введенням води (100 мл/кг) встановлено, що внутрішньовенне застосування або інстиляції в око блокатора НМДА-рецепторів 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемом) на відміну від амантадину сульфату сприяє вірогідному зниженню внутрішньоочного тиску (ВОТ). Подібна офтальмогіпотензивна дія спостерігається і у тварин з незмінним офтальмотонусом. Зважаючи на нейроретинопротекторні та офтальмогіпотензивні властивості адемоу препарат є перспективним у терапії ішемічних захворювань сітківки та зорового нерва, особливо в умовах підвищеного ВОТ.*

*Ключові слова:* адемом; амантадину сульфат; НМДА-рецептори; внутрішньоочний тиск; нейроретинопротекція.

## ВСТУП

Всебічний ґрунтовний аналіз літературних джерел свідчить, що глаукома (особливо її гострий напад) або офтальмогіпертензивні стани з високим внутрішньоочним тиском (ВОТ), які розвиваються внаслідок травм та оперативних втручань на оці, супроводжуються ішемічним ураженням сітківки та зорового нерва [1 – 3]. При підвищенні офтальмотонусу, насамперед до високих його значень, порушується або зникає ауторегуляція кровообігу та погіршується кровотік в інтраокулярних судинах, що забезпечують трофіку сітківки та зорового нерва, порушується аксональний транспорт внаслідок механічного здавлення тощо [4, 5]. Все це призводить до надмірної активації НМДА-рецепторів сітківки та запуску глутамат-кальцієвого патобіохімічного каскаду – основних механізмів апоптотичної загибелі ретинальних гангліозних клітин [1]. Фіналом цих подій, є розвиток деструктивно-дегенеративних змін у сітківці та зоровому нерві, що спричиняє втрату зору [1, 6]. Таким чином,

© І.Л. Черешнюк, О.І. Альчук, Л.І. Маринич, Р.А. Кравець, А.О. Іваниця, О.А. Ходаківський

глутаматна ексайтотоксичність та ВОТ, являють собою потенційні мішені щодо можливих розробок патогенетичної терапії ішемічних уражень зорового аналізатора, зокрема і тих, що асоційовані з високим офтальмотонусом [7 – 9]. Бажаним фармакологічним ефектом для препарату подібної спрямованості, є не тільки можливість модулювати надмірну активність рецепторканального комплексу НМДА-рецепторів, а й безпосередньо знижувати підвищений ВОТ. Нині серед блокаторів НМДА-рецепторів відомі препарати, для яких експериментально доведено наявність нейроретинопротекторної активності в умовах ішемії ока на тлі підвищеного ВОТ. Мова йде перш за все про похідні адамантану: мемантин, амантадину гідрохлорид або сульфат [10, 11]. Однак дані стосовно їхнього впливу на ВОТ є обмеженими та суперечливими. Таким чином, в ургентній офтальмології (гострий напад глаукоми, гостра офтальмогіпертензія) препаратами вибору є  $\beta$ -адреноблокатори для зниження ВОТ, які доцільно комбінувати з нейропротекторною терапією [12]. Для оптимізації фармакотерапії синдрому ВОТ

нашу увагу привернуло одне із похідних адамантану – 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид під умовною назвою адемо́л, якому притаманний нейропротекторний ефект, котрий реалізується за рахунок його модульовального впливу на активність НМДА-рецепторів [13]. Дані попередніх досліджень ефективності адемо́лу на різних моделях ішемічного ураження зорового аналізатора у тварин також переконливо доводять наявність у нього нейроретинопротекторної активності [14 – 17].

Молекула 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемо́лу) структурно містить адамантанове ядро подібно до амантадину, а з іншого боку має структурну подібність до кардіо-неселективних  $\beta$ -адреноблокаторів пропранололу та тимололу [18, 19]. У цьому нескладно пересвідчитися, адже молекула адемо́лу містить пропанаміновий фармакофор, характерний для всіх  $\beta$ -адреноблокаторів із феноксипропаноламіною будовою [18].

Однак на відміну від відомих  $\beta$ -блокаторів – тимололу, пропранололу, та селективного  $\beta_3$ -адреноблокатора SR 59230A молекула адемо́лу містить замість фенокси-групи адамантилетилокси-групу, тому згідно з уявленнями сучасної медичної хімії та хемоінформатики фактор насиченості ( $F_{sp}^3$ ) такої молекули є максимальним та дорівнює 1,0, що створює передумови для її високої ліпофільності. Крім того, адемо́л на відміну від багатьох  $\beta$ -блокаторів є вторинним аліфатичним аміном, а як відомо це зумовлює здатність таких молекул легко проникати крізь гематоенцефалічний та гематоофтальмічний бар'єри.

Аналізуючи наведені факти, а також зважаючи на притаманні адемо́лу ліпофільні властивості (обчислення молекулярних дескрипторів були зроблені за допомогою програмного комплексу SIB, розрахункової платформи Vital-IT та Molinspiration Cheminformatics [20, 21], а референтними структурами для розрахунків було обрано

кардіо-неселективні  $\beta$ -адреноблокатори – тимолол, пропранолол та високоліпофільний  $\beta_3$ -адреноблокатор – SR 59230A, який здатен блокувати гіпертермію, викликану НМДА у щурів [22]) та його молекулярну масу, яка не перевищує 500 а.о.м., а значить і можливість проникнення через гематоенцефалічний та гематоофтальмологічний бар'єри, ми припустили, що цей препарат є перспективним для вивчення його захисної дії на сітківку та зоровий нерв при їх ішемічному ураженні, асоційованому із підвищеним ВОТ. Теоретично, завдяки неселективній блокаді  $\beta$ -адренорецепторів, адемо́л, окрім прямої нейропротекторної дії, може знижувати ВОТ, що є його потенційною перевагою. Однак ця теза потребує експериментального підтвердження. Для порівняння було обрано нейропротектор амантадину сульфат, пропранолол і тимолол. Двом останнім притаманний офтальмогіпотензивний ефект, який пов'язаний із їх блокувальною дією на  $\beta$ -адренорецептори [23].

Мета нашої роботи - порівняльна характеристика впливу блокаторів НМДА-рецепторів: адемо́лу та амантадину сульфату на ВОТ за умов експериментальної офтальмогіпертензії у кролів.

## МЕТОДИКА

Досліджували промисловий зразок ампульного розчину адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемо́л, «Дарниця», Україна) для внутрішньовенних ін'єкцій (1,0%-й розчин) та очних інстиляцій (0,5%-й та 1,0%-й розчини). На різних етапах як препарати порівняння використовували розчини магнію сульфату, амантадину сульфату для внутрішньовенних інфузій (ПК-Мерц, «Merz Pharmaceuticals», Швейцарія), очні краплі тимололу малеату (арутимол, «Bausche & Lomb», Німеччина) та таблетовану форму пропранололу (анаприлін, Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна).

Експерименти проведено на кролях-

самцях породи шиншила віком 10 міс і масою 3,0-3,3 кг. Усі тварини знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) імені М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні при природному освітленні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України і вимог біоетики згідно з Національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [24].

При дослідженні впливу адемоу на нормальний офтальмотонус його інстилювали у різних концентраціях (0,5%-й та 1,0%-й розчин) у кон'юнктивальний мішок правого ока тварин, які були розподілені на дві дослідні групи відповідно до концентрації крапель. Контролем слугували ліві очі тварин, в які закрапували еквівалентну кількість 0,9%-го розчину NaCl. При оцінці впливу адемоу на БОТ в умовах гострої тимчасової офтальмогіпертензії препарат вводили повільно внутрішньовенно впродовж 10 хв у попередньо катетеризовану (катетер, ERG 22 G, Польща) крайову вену вуха дозами 2 та 5 мг/кг, які забезпечують максимальну реалізацію його захисних ефектів на ішемізований головний мозок [13]. Розчин амантадину сульфату (5 мг/кг) застосовували за вищеприписаною схемою. Пропранолол (40 мг/кг) вводили перорально через орогастральний зонд у вигляді його суспензії з Твіном-80, розраховуючи концентрацію таким чином, щоб її об'єм становив 5 мл/кг. Очні краплі тимололу малеату та адемоу інстилювали у кон'юнктивальний мішок обох очей. Адемол (внутрішньовенно або інстиляції в око), амантадину сульфат або тимололу малеат застосовували за 60 хв, а суспензію пропранололу за 4 год до моделювання гострої

тимчасової офтальмогіпертензії, яку моделювали введенням через орогастральний зонд дистильованої води (100 мл/кг). Обрана модель є загально визнаною для скринінгу офтальмогіпотензивної дії фармакологічних засобів [25]. Тваринам контрольної патології (модель гострої тимчасової офтальмогіпертензії) не проводили жодної фармакологічної корекції.

БОТ вимірювали тонометром ICARE (Фінляндія). Для виключення патології офтальмотонусу та стандартизації досліджень кролів рандомізували за асиметрією БОТ лівого і правого ока. Дослідні групи формували із тварин у яких різниця БОТ між обома очима становила не більше ніж 2 мм рт. ст. Також з урахуванням впливу циркадних ритмів на коливання БОТ експерименти проводили завжди в однаковий світловий проміжок доби. У першій серії дослідів, після реєстрації початкових показників БОТ та одноразової інстиляції адемоу, його вплив на офтальмотонус досліджували через 60, 120, 240 та 360 хв. На моделі гострої тимчасової офтальмогіпертензії оцінку ефективності досліджуваних препаратів проводили в динаміці через 30, 60 та 90 хв після інтрагастрального введення води. Вихідні значення БОТ у кожній групі вимірювали за 1 год до внутрішньошлункового введення води.

Кількісні результати обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Стюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта – за його відсутності, парний критерій T Вілкоксона – для визначення змін у динаміці всередині групи. Відмінності вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати першої серії дослідів, присвяченій впливу адемоу на нормальний

офтальмотонус кролів при його очній інстиляції в двох концентраціях наведено в табл. 1. Нами встановлено, що на початку експерименту, до закапування препарату, середні значення ВОТ лівого – контрольного та правого – дослідного ока кролів обох груп, достовірно не відрізнялися. Через годину після того, як у праве око кролів інстилювали 1,0%-й або 0,5%-й розчин адемола середні значення ВОТ були меншими ( $P<0,05$ ) порівняно з вимірами тиску в лівому оці кожної тварини в яке закапували 0,9%-й розчин NaCl. Достовірно менший ВОТ на тлі крапель адемола в обох концентраціях реєструвався також і через 120 та 240 хв після інстиляцій, а також у кінці експерименту, який тривав 6 год. Приріст ВОТ упродовж усього досліджу на тлі фізіологічного розчину NaCl пов'язаний із циркадними фазами підвищенням очного тиску в кролів, що також відмічено й іншими дослідниками [26, 27]. Відповідно, синхронне підвищення ВОТ було і в контрлатеральних очах у які інстилювали адемола. Аналіз коливання ВОТ на тлі дії адемола вказує на той факт, що препарат не тільки нівелював циркадне підвищення офтальмотонусу, а й знижував фізіологічні значення ВОТ.

Після закапування 0,5%-го або 1,0%-го розчину адемола різниця між середніми значеннями ВОТ лівого і правого ока кролів упродовж усього терміну спостереження становила 18% (60 хв), 17% (120 хв), 19% (240 хв) і 24% (360 хв) та 16% (60 хв), 19% (120 хв), 21 (240 хв) і 22% (360 хв), ( $P<0,05$ ). При

цьому, достовірної різниці між показниками ВОТ правих очей тварин, котрим інстилювали 0,5%-й або 1,0%-й розчин адемола не спостерігалось. Це засвідчує однаковий офтальмогіпотензивний ефект препарату в обох досліджуваних концентраціях. Таким чином, однократна інстиляція розчину 0,5%-го та 1,0%-го адемола кролям з нормальним офтальмотонусом призводить до вірогідного зниження ВОТ, і ця дія триває, принаймні, не менше як 6 год.

Результати оцінки порівняльного впливу адемола при різних способах введення (очні краплі або внутрішньовенна інфузія) та референс-препаратів на підвищений ВОТ наведено у табл. 2. У групі контролю в динаміці моделювання гострої тимчасової офтальмогіпертензії, починаючи з 30-ї хвилини експерименту відмічено вірогідне підвищення ВОТ відносно вихідних значень у середньому в 2,34 раза. Впродовж наступних 30 хв досліджуваний показник дещо знизився (перевищував вихідні значення ВОТ у середньому в 2,08 раза), що також є достовірно вищим відносно початкового рівня. Станом на 90-ту хвилину спостереження відбулася деескалація ВОТ до  $9,6\pm 0,3$  мм рт. ст., що є в середньому на 29,7% більше, ніж на початку експерименту ( $P<0,05$ ). Отже, пікове підвищення ВОТ упродовж першої години на тлі водного навантаження з наступним різким зниженням свідчить про розвиток гострої тимчасової офтальмогіпертензії та вказує на адекватність обраної моделі.

**Таблиця 1. Динаміка внутрішньоочного тиску (мм рт.ст.) у кролів на тлі місцевої інстиляції в око розчинів адемола різної концентрації ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Око	Препарат	До інстиляції	Термін після інстиляції, хв			
			60	120	240	360
Ліве	0,9 %-й розчин NaCl	$7,1\pm 0,4$	$6,7\pm 0,3$	$7,2\pm 0,5$	$7,5\pm 0,4$	$8,0\pm 0,6$
Праве	Адемола (0,5 %-й розчин)	$6,8\pm 0,6$	$5,5\pm 0,3^*$	$6,0\pm 0,3^*$	$6,1\pm 0,4^*$	$6,1\pm 0,4^*$
Ліве	0,9 %-й розчин NaCl	$6,3\pm 0,3$	$7,1\pm 0,4$	$7,5\pm 0,5$	$7,7\pm 0,6$	$7,9\pm 0,3$
Праве	Адемола (1,0 %-й розчин)	$6,2\pm 0,2$	$6,0\pm 0,3^*$	$6,1\pm 0,4^*$	$6,1\pm 0,6^*$	$6,2\pm 0,3^*$

\*  $P<0,05$  відносно відповідного значення лівого ока у певний часовий інтервал.



Оцінюючи дію адемоу при різних шляхах введення, слід відмітити його стабільно тривалу, вірогідну офтальмогіпотензивну дію як при місцевій інстиляції в око, так і за умови внутрішньовенного застосування. У перші 30 хв – термін, коли в групі контрольної патології реєструвався максимальний приріст ВОТ відносно початкового рівня, дія адемоу сприяла його достовірному зниженню. Так, при внутрішньовенному застосуванні дозою 5 мг/кг, середнє значення досліджуваного показника становило  $14,6 \pm 0,4$  щодо  $17,3 \pm 0,5$  мм рт. ст. у контролі, що є меншим у середньому на 16 % ( $P < 0,05$ ). При закапуванні адемоу ВОТ сягав  $14,9 \pm 0,5$  мм рт. ст., що за величиною офтальмогіпотензивного ефекту збігається з його парентеральним введенням у цій самій дозі. Надалі (60 та 90 хв) адемоу також продемонстрував спроможність дос-

товірно відносно контрольної патології зменшувати підвищений рівень ВОТ. На тлі його внутрішньовенного введення у меншій дозі (2 мг/кг, внутрішньовенно) офтальмогіпотензивний ефект був також, однак проявився відносно контролю тільки на 30-ту та 60-ту хвилину досліду. Таким чином, оцінюючи вплив адемоу на офтальмотонус при цій модельній патології у всі часові проміжки (окрім 90 хв у дозі 2 мг/кг, внутрішньовенно), можна стверджувати, що за динамікою ВОТ його гіпотензивна дія достовірно не відрізнялась від такої у пропранололу та тимололу малеату. Слід відзначити, що розчин амантадину сульфату на моделі офтальмогіпертензії проявив лише тенденцію до зниження ВОТ, значення якого у всі терміни спостереження не відрізнялося від таких в групі контрольної патології.

**Таблиця 2. Вплив адемоу та препаратів порівняння на динаміку внутрішньоочного тиску (мм рт.ст.) у кролів в умовах гострої тимчасової офтальмогіпертензії ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Схема досліду	Інтервал між введенням препаратів та водним навантаженням, хв	До введення препарату	До навантаження водою	Після навантаження водою, хв		
				30	60	90
Контроль	—	—	$7,4 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,5$	$15,4 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,4$
Пропранолол (40,0 мг/кг, внутрішньошлунково)	240	$7,6 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,3$	$15,2 \pm 0,3$ *,**	$13,2 \pm 0,4$ *,**	$7,5 \pm 0,3$ *,**
Амантадину сульфат (5 мг/кг, внутрішньовенно)	60	$7,4 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,2$	$16,9 \pm 0,5$	$14,9 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,5$
Адемоу (2 мг/кг, внутрішньовенно)	60	$7,5 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,3$	$15,8 \pm 0,4$ *	$14,1 \pm 0,3$ *	$8,8 \pm 0,4$
Адемоу (5 мг/кг, внутрішньовенно)	60	$7,2 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,2$	$14,6 \pm 0,4$ *,**	$12,8 \pm 0,3$ *,**	$7,5 \pm 0,3$ *,**
Адемоу 0,5 %-й розчин (інстиляція в око)	60	$7,6 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3$	$14,9 \pm 0,5$ *,**	$13,1 \pm 0,4$ *,**	$7,3 \pm 0,3$ *,**
Тимололу малеат (очні краплі, 0,5 %)	60	$7,3 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,2$	$15,3 \pm 0,3$ *,**	$13,4 \pm 0,4$ *,**	$7,7 \pm 0,3$ *,**

\*  $P < 0,05$  відносно відповідного значення в групі контрольної патології у певний часовий інтервал;

\*\*  $P < 0,05$  у відповідні строки відносно показників у групі амантадину сульфату.

Тобто всі досліджувані препарати, окрім амантадину сульфату, достовірно протидіяли наростанню ВОТ після їх введення до моделювання офтальмогіпертензії, а також в умовах примусового водного навантаження.

Наявність побічної дії лікарських засобів, зокрема негативного впливу на ВОТ, обмежує їх застосування в офтальмології, особливо при глаукомі та станах, що супроводжуються розладами офтальмотонусу. Подібне явище описане при дії амантадину. У наукових публікаціях добре висвітлено його нейро- та ретинопротекторні властивості [10, 28], однак наявність М-холіноблокувальних ефектів, обмежила перспективу його використання у хворих з підвищеним офтальмотонусом, що і знайшло своє віддзеркалення в інструкції до застосування. При вивченні впливу адемола за різних способів введення (очні краплі та внутрішньовенна інфузія) нами встановлено наявність у нього офтальмогіпотензивного ефекту, що проявилось вірогідним зниженням ВОТ як у кролів із нормальним (не підвищеним) тиском, так і на моделі гострої тимчасової офтальмогіпертензії. За своєю активністю дія адемола збігається з пропранололом за його внутрішньошлункового введення та тимололу малеату при інстиляції у вигляді очних крапель. На нашу думку, поєднання офтальмогіпотензивного ефекту адемола, який сягає достовірних значень вже через годину після застосування, з описаними раніше ретинопротекторними властивостями [14 – 17] вигідно відрізняють цей лікарський засіб поміж інших препаратів із аналогічною спрямованістю. Зазначені якості є особливо цінними в ургентній офтальмологічній практиці, де від швидкості та якості стабілізації підвищеного ВОТ і захисту сітківки від постреперфузійних уражень залежить подальше якісне функціонування зорового аналізатора.

Відомо, що блокада  $\beta$ -адренорецепторів призводить до зниження ВОТ за рахунок зменшення продукції внутрішньоочної

рідини. Наявність офтальмогіпотензивного ефекту адемола ми пов'язуємо саме з  $\beta$ -адрено-блокувальними властивостями. Підґрунтя цього твердження доповнюється також тим фактом, що адемола має певні структурні тотожності з пропранололом. Згідно з представленими власними результатами, які не суперечать літературним, останній знижує підвищений ВОТ. Причому ця дія реалізується не тільки за рахунок блокади  $\beta$ -адренорецепторів, а й внаслідок активуючого впливу  $\beta$ -адреноблокаторів на функціонування 5-гідрокситриптамінових рецепторів (5-ГТ) венул ока [29]. Цей механізм лежить в основі покращення відтоку рідини та венозної крові, що сприяє зниженню ВОТ. Враховуючи вищевикладені факти, доцільно зробити припущення, що офтальмогіпотензивна дія адемола також може бути пов'язана із його впливом на 5-ГТ рецептори венул ока, що потребує подальших досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Досліджуваному блокатору НМДА-рецепторів 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) при його інстиляції в око або внутрішньовенному введенні на відміну від амантадину сульфату притаманна спроможність знижувати як нормальний, так і підвищений ВОТ.

2. Адемола являє собою перспективний нейроретинопротекторний засіб, який можливо використовувати в умовах підвищеного внутрішньоочного тиску.

**И.Л. Черешнюк, А.И. Альчук, Л.И. Маринич,  
Р.А. Кравец, А.А. Иваница, А.А. Ходаковский**

## **ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ НМДА-РЕЦЕПТОРОВ НА ДИНАМИКУ ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ У КРОЛИКОВ**

В опытах на кролях с моделью острой временной офтальмогипертензии, которую создавали путем внутрижелудочного введения воды (100 мл/кг) установлено, что внутривенное применение или инстиляции в глаз блокатора НМДА-рецепторов 1-адамантилетилокси-3-

морфолино-2-пропанола гидрохлорида (Адемола) в отличие от амантадина сульфата способствует достоверному снижению внутриглазного давления (ВГД). Подобное офтальмогипотензивное действие имеет место и у животных с неизменным офтальмотонусом. Учитывая нейроретинопротекторные и офтальмогипотензивные свойства Адемола данный препарат является перспективным в терапии ишемических заболеваний сетчатки и зрительного нерва, особенно в условиях повышенного ВГД.

Ключевые слова: адемола; амантадина сульфат; НМДА-рецепторы; внутриглазное давление; нейроретинопротекция.

**I.L. Cheresnyuk, O.I. Alchuk, L.I. Marynych, R.A. Kravets, A.O. Ivanitsa, O.A. Khodakovskiy**

### **EFFECT OF NMDA-RECEPTOR BLOCKERS ON THE DYNAMICS OF INTRAOCULAR PRESSURE IN RABBITS**

Experiments on rabbits with a model of acute temporary ocular hypertension created by intragastric administration of water (100 ml/kg) have been performed. It was found that intravenous administration or instillation into the eye of blocker of NMDA-receptor 1-adamantylethoxy-3-morpholino-2-propanol hydrochloride (Ademol) unlike amantadine sulfate results in a significant decrease in intraocular pressure (IOP). It was also discovered that such ocular hypotensive effect takes place in animals with unchanged ophthalmotonus. Taking into account neuroretinoprotective and hypotensive ocular hypotensive properties of Ademol this drug appears to be perspective in the treatment of ischemic disorders of the retina and optic nerve, especially under the conditions of increased IOP. Key words: ademol; amantadine sulfate; NMDA-receptors; intraocular pressure; neuroretinoprotection.

*Vinnitsya National Medical University n.a. M.I. Pyrogov.*

### **REFERENCES**

1. Osborne NN. Pathogenesis of ganglion «cell death» in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog Brain Res.* 2008;173:339-52.
2. Chi W, Li F, Chen H, Wang Y, Zhu Y et al. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production in acute glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 29;111(30):11181-6.
3. Ha Y, Liu H, Xu Z, Yokota H, Narayanan SP et al. Endoplasmic reticulum stress-regulated CXCR3 pathway mediates inflammation and neuronal injury in acute glaucoma. *Cell Death Dis.* 2015 Oct 8;6:e1900.
4. Zavgorodnyaya NG, Pasechnikova NV. Primary glaucoma. A new look at an old problem. *Zaporozh'e: Orbita-YuG,* 2010. [Ukrainian].
5. Kasimova MS. The comparative analysis of a an anterior ischemic optical neuropathy and glaucoma optical neuropathy. *Glaucoma.* 2010;9(3):50-54. [Russian].
6. Osborne NN, DeSantis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS et al. Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res.* 1999 Sep;69(3):331-42.
7. Ebnetter A, Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Protection of retinal ganglion cells and the optic nerve during short-term hyperglycemia in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2011 Oct;129(10):1337-44.
8. Nilforushan N. Neuroprotection in glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res.* 2012 Jan;7(1):91-3.
9. Ullian EM, Barkis WB, Chen S, Diamond JS, Barres BA. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Aug;26(4):544-57.
10. Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HA, Okumura A, Namekata K et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 2007 Jul;117(7):1763-70.
11. Gabelt BT, Rasmussen CA, Tektas OY, Kim CB, Peterson JC, Nork TM et al. Structure/function studies and the effects of memantine in monkeys with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Apr 30;53(4):2368-76.
12. Shih GC, Calkins DJ. Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. *Expert Rev Ophthalmol.* 2012 Apr;7(2):161-175.
13. Khodakivskiy OA. Pathogenetic background of new adamantane derivatives use reasonability in brain and myocardial acute ischemia experimental therapy (experimental investigation) [dissertation]. Odessa: Odessa National Med Univ Minist Health Care Ukr; 2014. [Ukrainian].
14. Cheresnyuk IL. Efficiency ademol in reperfusion period of total ischemia eye through treatment principles of modern neuroretinoprotective therapy. Reports of Vinnitsya National Medical University. 2015;19(1):14-20. [Ukrainian].
15. Cheresnyuk IL, Khodakivskiy OA, Zagoriy GV. Ademol neuroretinoprotective properties characteristics using retina and optic nerve morphological changes under conditions of experimental eye ischemia-reperfusion on the background of alloxane-induced diabetes. *Integrative anthropology.* 2015;26(2):51-55. [Ukrainian].
16. Cheresnyuk IL, Povkh VL, Zagoriy GV, Khodakivskiy O.A., Ostra OA. Usage of neuromarker (s100 protein) and flow cytometry for comparative assessment of nmda-receptor antagonists' effect on neuroproliferative processes in retina and optic nerve in case of modelled ophthalmic ischemia-reperfusion. *World of medicine and biology.* 2016;56(2):159-164. [Ukrainian].
17. Cheresnyuk IL, Povkh VL, Zagoriy GV, Khodakivskiy A.A. Cerebrovascular effects nmda-blockers receptors and mexidol against the backdrop of alloxan diabetes, as well as their impact on the course of metabolic processes in the retina of the mongolian gerbil in the acute reperfusion period. *Postgraduate doctor.* 2016;74(1-2):295-303. [Russian].
18. Kovtunen VO. Medicines with action on the peripheral nervous system. Kiev, 2005. [Ukrainian].
19. Skvortsova MI, Stankevich IV, Palyulin VA, Zefirov NS.

- Molecular similarity concept and its use for prediction of the properties of chemical compounds. Uspekhi khimii. 2006;75(11):1074-93. [Russian].
20. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. Molinspiration Cheminformatics, 2012. Available from: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
21. Mishra NK, Kumar M, Raghava GP. Support vector machine based prediction of glutathione S-transferase proteins. Protein Pept. Lett. 2007;14(6):575-80.
22. Nisoli E, Tonello C, Landi M, Carruba MO. Functional studies of the first selective  $\beta_3$ -adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes. Mol. Pharmacol. 1996;49(1):7-14.
23. Kaiser HJ, Flammer J, Stämpfig D, Hendrickson P. Longterm visual field follow-up of glaucoma patients treated with beta-blockers. Surv Ophthalmol. 1994 May;38 Suppl:S156-9; discussion S160.
24. De Simone FI, Serratos J. Biotechnology, animal health and animal welfare within the framework of European Union legislation. Rev Sci Tech. 2005 Apr;24(1):89-99.
25. van Bijsterveld OP, van Loenen AC, ten Ham M. The effect of hypotensive drugs on the intraocular pressure after waterloading in rabbits. Doc Ophthalmol. 1981 Dec;52(2):189-98.
26. Bar-Ilan A. Diurnal and seasonal variations in intraocular pressure in the rabbit. Exp Eye Res. 1984 Aug;39(2):175-81.
27. Bar-Ilan A, Beilin M. Diurnal variations in intraocular pressure in the albino rabbit: relationship to morning intraocular pressure. Ophthalmic Res. 1997;29(2):110-6.
28. Gabelt BT, Rasmussen CA, Tektas OY, Kim CB, Peterson JC, Nork TM et al. Structure/function studies and the effects of memantine in monkeys with experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Apr 30;53(4):2368-76.
29. Osborne NN, Wood JP, Melena J, Chao HM, Nash MS, Bron AJ et al. 5-Hydroxytryptamine1A agonists: potential use in glaucoma. Evidence from animal studies. Eye (Lond). 2000 Jun;14:454-63.

*Матеріал надійшов до  
редакції 10.03.2016*

# Протифіброзна дія дипроспану, лонгідази та їх комбінацій при механічному травмуванні міжхребцевих дисків у щурів

<sup>2</sup>Я.В. Фіщенко, <sup>1</sup>Д.О. Заводовский, <sup>3</sup>О.М. Мотузюк, <sup>1</sup>Т.Ю. Матвієнко, <sup>1</sup>Д.М. Ноздренко

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», Київ; e-mail: ddd@univ.kiev.ua;

<sup>2</sup>ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ; e-mail: fishchenko@gmail.com;

<sup>3</sup>Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк.

*Досліджено формування фіброзу оболонок спинного мозку дорослих щурів, викликаного методом механічного травмування міжхребцевих дисків з епідуральним введенням суміші препаратів лонгідази та дипроспану. Епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону в складі препаратів дипроспану та лонгідази проявило високий синергічний ефект та антифіброзну активність. Протифіброзна дія цих двох лікарських препаратів суттєво перевищувала сумарний ефект порівняно з роздільним використанням. Так, зменшення максимальної товщини фіброзного шару становило 49% що до контрольних значень, а зменшення загальної площі фіброзного утворення – 46%. Виявлено проти-запальну дію комплексу, що підсилює позитивний ефект препарату та дає підстави говорити про перспективу його використання для попередження епідурального фіброзу спинного мозку.*

*Ключові слова:* фіброз; сполучна тканина; дипроспан; лонгідаза.

## ВСТУП

Фіброз – надмірне розростання сполучної тканини внаслідок певного активуючого фактора (альтерації), що супроводжується рубцюванням. Це можуть бути травми, опромінення, хірургічне втручання, алергію, інфекції тощо[1]. За нормальних умов на місці травми утворюються елементи сполучної тканини. При цьому мезенхімальні фібробласти мігрують у ділянку пошкодження та утворюють у великих кількостях білки матриксу – колаген та фібронектин. Наявні в цій зоні фібробласти синтезують  $\alpha$ -SMA-фактор (фактор росту для  $\alpha$ - актоміозину), який потрібен для закриття пошкодженої поверхні [2,3].

До цього часу не існує ефективної профілактики післяопераційного епідурального фіброзу, який може виникати при пошкодженні елементів спинномозкового каналу, що є великою проблемою для сучасної медицини [4]. В деяких випадках, як один з компонентів

регуляції процесу фіброзування, використовують препарат гіалуронідази (лонгідаза) - протеолітичний фермент, та бетаметазону (дипроспан) – синтетичний глюкокортикоїд, та їх комбінацію[5].

Мета нашого дослідження – вивчення впливу гіалуронідази та бетаметазону на темпи та якість розвитку зайвої сполучної тканини під час епідурального фіброзування.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 16 дорослих щурах лінії Вістар масою від 0,2 до 0,3 кг, які були поділені на 4 групи: контрольну (4 тварини) і 3 дослідні (по 4 тварини). При попередній підготовці до експерименту анестезію здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Фіброз викликали методом механічного травмування міжхребцевих дисків. В епідуральну порожнину тварин



одразу після хірургічного втручання вводили лонгідазу та дипроспан у концентраціях 1 мл/кг (2-га та 3-тя групи відповідно). Щурам четвертої дослідної групи вводили суміш цих препаратів по 0,5 мл/кг. Через 10 діб ініціації фіброзу тварин декапітували з урахуванням рекомендацій міжнародного комітету щодо гуманного поводження з експериментальними тваринами.

Спинний мозок тримали протягом 2 тиж у 10%-му формаліні і впродовж 10 діб у 7%-му. Для приготування зрізів заливали матеріал у парафін-воскову суміш (95 % парафіну і 5 % очищеного воску). Перед цим поміщали його в суміш різних частин абсолютного спирту і ксилолу на 1 год. Потім матеріал переносили послідовно в ортоксилол на 30-40 хв, а згодом в насичений розчин парафіну в ортоксилолі при 37°C на 1 год і в перший чистий парафін до 2 год при 57°C, а потім в другий чистий парафін до 1 год при 57°C. Блоки нарізали проводили на санному мікротомі (МС-2) з товщиною зрізу 10 мкм. Сполучну тканину виявляли за Ван-Гізоном [10].

Фотографували препарати за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioscop "Carl ZEISS", Німеччина. Мікрофотографії, отримані за допомогою світлової мікроскопії, обробляли за допомогою програми ВідеоТест Морфологія 5.0.

Обробляли результати методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0 ("StatSoft", США). Перевірку вибірок на їхню приналежність до нормально розподілених здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували U-критерій Манна-Вітні. Вірогідними вважали відмінності при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в твердій оболонці спинного мозку швидко збільшувалася кількість сполучнотканинних елементів з подовженням

часу після індукції фіброзу (рис.1). Товщина прошарку сполучної тканини на 10-ту добу після механічного травмування зросла до 330 % порівняно з нормою та на 13 % що

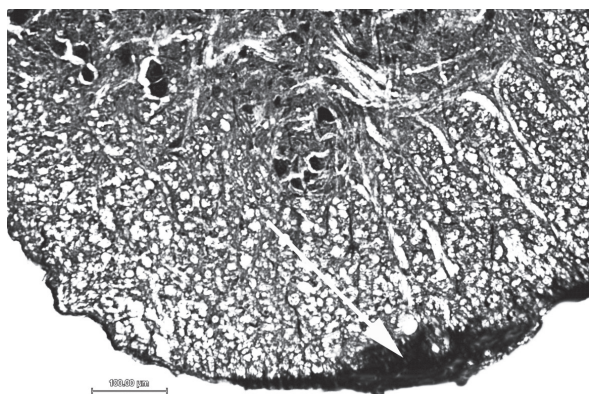
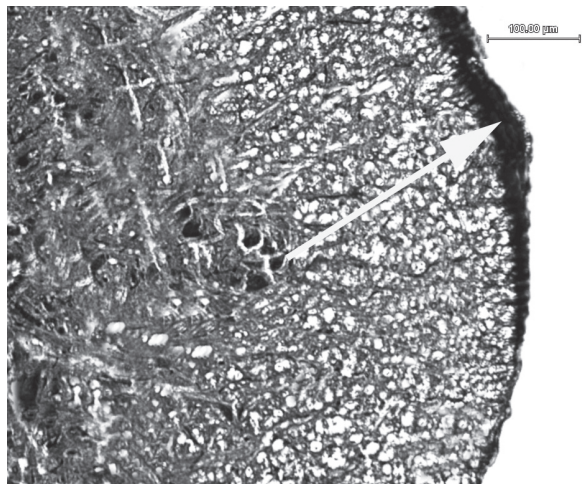
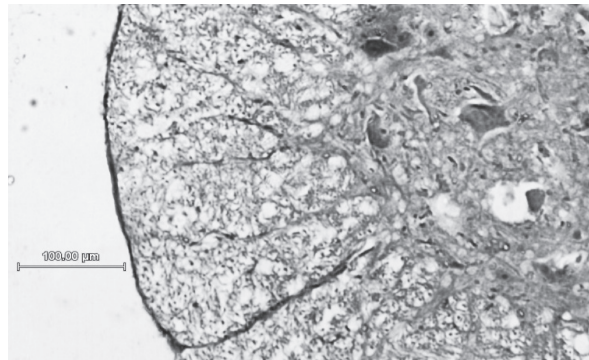


Рис. 1. Поперечний переріз нативного спинного мозку щура (а), через 5 (б) та 10 (в) діб після активації фіброзу (світлова мікроскопія,  $\times 100$ ) Стрілками показані місця виникнення фіброзних структур

до значень с 5-ї доби після ініціації фіброзу (рис. 2).

Значно збільшилось і співвідношення кількості сполучної тканини в різні періоди фіброзування. Загальна площа фіброзних утворень між 5-ю та 10-ю добами зросла на 60%. Отже, спостерігалось стрімке зростання прошарку колагенових волокон зі збільшенням часу після виникнення післяопераційного епідурального фіброзу. Ймовірно, що зміни торкнулися внутрішньоклітинних компонентів жорсткості, які представлені цитоскелетом, що сприяло розростанню сполучної тканини з появою рубцевих змін, які виникають, як правило, в результаті хронічного запалення.

Введення дипроспану (1мл/кг) призвело до змін морфофункціонального стану сполучної тканини щурів (рис. 3,4). Кількість сполучної тканини після ініціації фіброзу зменшилася на 27%. Зменшення максимальної товщини фіброзу становило 43% в порівняно з контрольними значеннями (10-та доба після активації фіброзу). Зафіксовано зменшення загальної площі фіброзного утворення – 41% порівняно з контролем.

Після введення лонгідази (1мл/кг) кількість сполучної тканини в досліджуваних препаратах значно зменшилася. Це відно-

силося до всіх досліджуваних показників. Кількість сполучної в різні періоди після ініціації фіброзу зменшилась на 38%, максимальна товщина фіброзного шару – на 43%. Найсуттєвіші зміни проявились у зменшенні загальної площі фіброзного утворення – на 68 % через 10 діб (див. рис. 4).

Одночасне введення дипроспану і лонгідази в співвідношеннях 1:1 в загальній дозі 1мг/кг проявило значний синергічний ефект (див. рис. 3,4). Слід відзначити, що сумісна протифіброзна дія цих двох лікарських препаратів є сильнішою, ніж сума дії цих двох ліків при їх роздільному використанні. Так, зменшення максимальної товщини фіброзного шару становило 49%, порівняно з контрольними значеннями, а загальної площі фіброзного утворення – 46 %.

Адекватність аналізу отриманих результатів ускладняються участю багатьох чинників розвитку сполучнотканинних утворень при епідуральних фіброзах спинного мозку. Значний інтерес представляє гіпотеза, що головним патогенетичним чинником утворення фіброзних структур спинного мозку є імунінофільтративний асептичний запальний процес [6]. Механічні пошкодження у фіброзному кільці міжхребцевого диска сприяють просочуванню елементів пульпозного ядра в

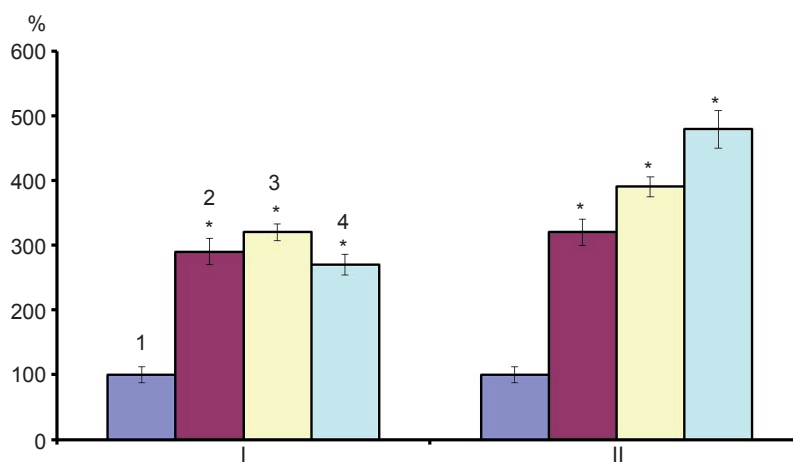


Рис. 2. Морфологічні зміни тканини спинного мозку щура в різні періоди після його ініціації, відображені в відсотках від контрольних значень: I, II - 5 та 10 діб після активації фіброзу відповідно - 1 – контроль; 2 - кількість елементів сполучної тканини; 3 - максимальна товщина прошарку сполучної тканини; 4 - загальна площа фіброзного утворення.

\*  $P \leq 0,05$



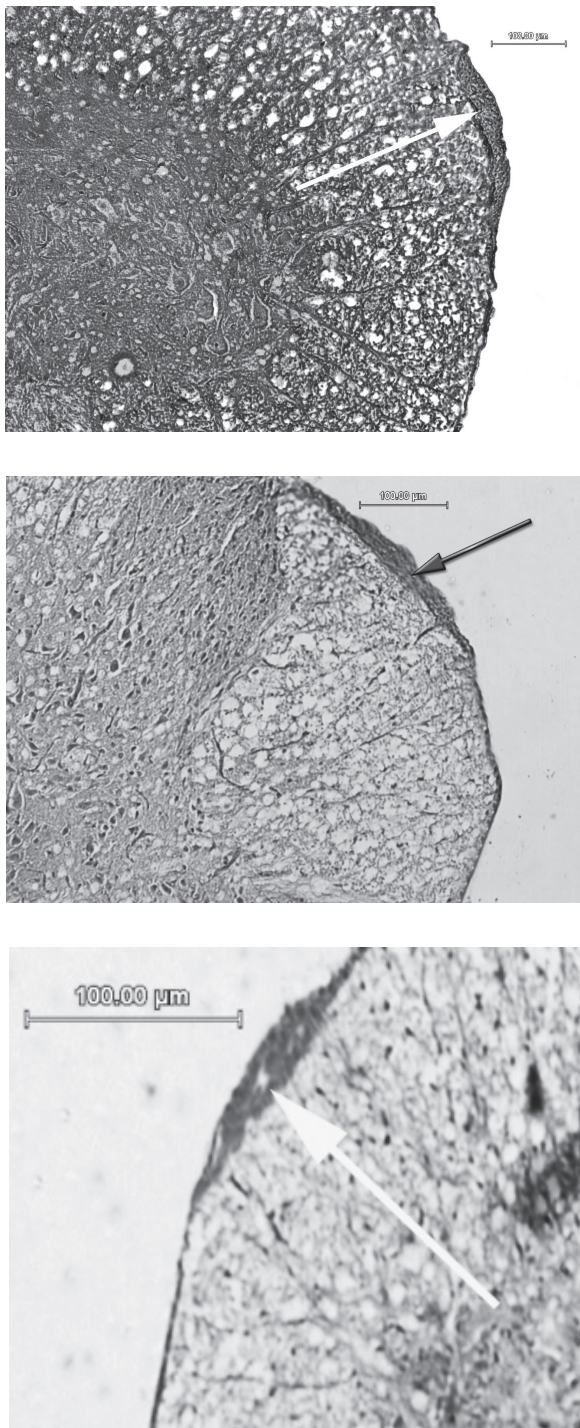


Рис. 3. Поперечний переріз спинного мозку щура при епідуральному фіброзі, викликаному методом механічного травмування міжхребцевих дисків, після введення дипроспану (а), лонгідази (б) в концентрації 1мл/кг, та їх суміші (0,5мл/кг;в). Світлова мікроскопія,  $\times 100$ . Стрілками показані місця виникнення фіброзних структур

епідуральний простір, багатий на кровоносні судини. Ці елементи викликають утворення антитіл, які ініціюють реактивно-запальні зміни в корінцях епідуральних клітин спинномозгових оболонок [7].

Відомо, що дипроспан має високу глюкокортикостероїдну активність та незначну мінералокортикостероїдну активність [8]. Бетаметазон, котрий входить до його складу, чинить сильну протизапальну, протиалергійну та імуносупресивну дію [9] що, на нашу думку, має важливий внесок у формування описаних ефектів. Як відомо глюкокортикостероїди проникають через клітинні мембрани і утворюють комплекси зі специфічними рецепторами цитоплазми [10-13]. Ці комплекси потім проникають у клітинне ядро, зв'язуються з ДНК і стимулюють транскрипцію інформаційної РНК і подальший синтез білків різних ензимів. Основні аспекти цих властивостей можуть бути такими: зменшення імуноактивних клітин на рівні осередку запалення, зменшення вазодилатації, стабілізація лізосомальних мембран, пригнічення фагоцитозу, зменшення продукування простагландинів і споріднених сполук [14-16]. Саме на протизапальних, імунодепресивних та протиалергійних властивостях глюкокортикоїдів може ґрунтуватись описана регуляторна дія дипроспану, а саме зниження епідуральної рубцевої адгезії у щурів та гальмування розвитку фіброзу або зменшення щільності фіброзної тканини [8].

Значно вищий клінічний ефект лонгідази, ніж нативної гіалуронідази [11] можна пояснити тим, він являє собою кон'югат протеолітичного ферменту гіалуронідази з високомолекулярним носієм з групи похідних *n*-оксиду полі-1,4-етиленпіперазину. Кон'югація підвищує стійкість ферменту до дії температури і інгібіторів, збільшує його активність і призводить до пролонгації дії. Ковалентний зв'язок лонгідази забезпечує одночасну локальну присутність протеолітичного ферменту і носія, здатного зв'язувати інгібітори, що вивільняються, ферменту і

стимулятори синтезу колагену (іони заліза, мідь, гепарин тощо). Завдяки вказаним властивостям лонгідаза здатна деполімеризувати матрикс сполучної тканини у фіброзно-гранулематозних утвореннях, але і пригнічувати зворотню регуляторну реакцію, направлену на синтез компонентів сполучної тканини. Специфічним субстратом тестикулярної гіалуронідази є глікозаміноглікани (гіалуронова кислота, хондроїтин, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат), складові основу матриксу сполучної тканини. В результаті деполімеризації (розриву зв'язку між C<sub>1</sub> ацетилглюкозаміну і C<sub>4</sub> глюкуроною або індуроною кислоти) під впливом гіалуронідази глікозаміноглікани втрачають свої основні властивості: в'язкість, здатність зв'язувати воду, іони металів. Внаслідок цього ускладнюється формування колагенових білків у волокна, підвищується проникність тканинних бар'єрів, полегшується рух рідини в міжклітинному просторі, покращується еластичність сполучної тканини, що виявляється в зменшенні набряклості тканини, сплюсненні рубців, збільшенні об'єму руху суглобів, зменшенні контрактур і запобіганні їх формуванню, зменшенні спаєчного процесу. Гіалуронідаза має суттєву протифіброзну дію, але при введенні вона природно викликає алергічну реакцію, і у зв'язку з цим, проти її

дії направлена безліч ферментів як руйнівних так, і інактивуючих. Крім того, гіалуронідаза інактивується при підвищенні температури. А у вогнищі запалення температура зазвичай підвищена. Оскільки у кожному конкретному випадку складно визначити вектор порушення імунної відповіді необхідний препарат, який міг би протистояти патологічному зростанню сполучної тканини як в разі ослаблення, так і гіперактивності імунної системи. Свій внесок повинна зробити і протиалергійна дія обох використаних препаратів, яка розвивається в результаті зниження синтезу і секреції медіаторів алергії, гальмування вивільнення з сенсibilізованих клітин і базофілів гістаміну і інших біологічно активних речовин, зменшення числа циркулюючих базофілів, пригнічення проліферації лімфоїдної і сполучної тканини [11,14,15]. Описані нами ефекти дипроспану та лонгідази можуть бути пов'язані також і з їх протизапальною дією. Тому, на нашу думку, одночасна дія лонгідази та дипроспану виявляє яскраво виражений синергічний ефект протидії утворення фіброзних структур. Завдяки протизапальній дії та здатності гальмувати епідуральну рубцевою адгезію цей комплекс є перспективним для його терапевтичних впроваджень при лікуванні епідурального фіброзу спинного мозку.

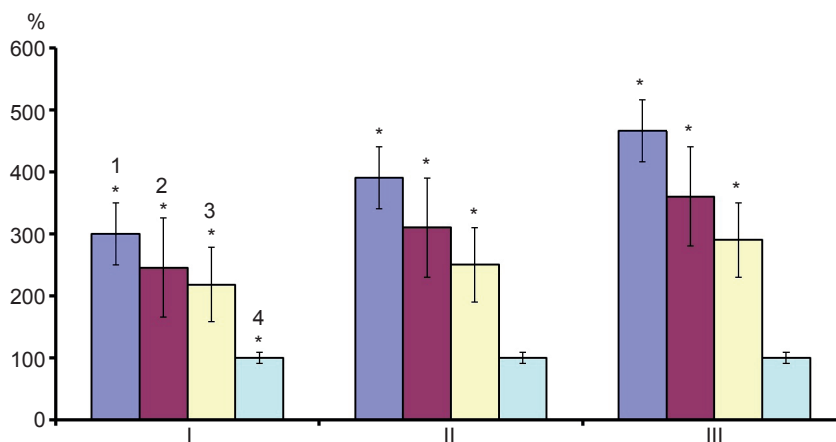


Рис. 4. Морфологічні зміни тканини спинного мозку щура при дії дипроспану (1), лонгідази (2) 1мл\кг, та їх суміші (3) 0,5мл\кг. відображені в відсотках від контрольних –значень -4. I - кількість сполучної тканини; II - максимальна товщина прошарку сполучної тканини; III- загальна площа фіброзного утворення.

\* P≤0,05

## ВИСНОВКИ

1. Результати проведеного дослідження підтвердили можливість екзогенної регуляції реактивного формування сполучної тканини спинномозкового каналу після механічного пошкодження міжхребцевого диска.

2. Одночасне епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону виявляє вірогідну високу антифіброзну активність. Завдяки протизапальній дії та здатності гальмувати процес утворення сполучної тканини цей комплекс може бути застосований для цілеспрямованої регуляції активності процесу фіброзування спинномозкового каналу.

**Я.В. Фищенко, Д.О. Заводовский, О.М. Мотузюк, Т.Ю. Матвиенко, Д.М. Ноздренко**

## ПРОТИВОФИБРОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИПРОСПАНА, ЛОНГИДАЗЫ И ИХ КОМБИНАЦИЙ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ МЕЖПОЗВОНОЧНЫХ ДИСКОВ У КРЫС

Исследован процесс формирования фиброза оболочек спинного мозга взрослых крыс, вызванный механическим повреждением межпозвоночных дисков с эпидуральным введением смеси препаратов лонгидаза и дипроспан. Эпидуральное введение гиалуронидазы и бетаметазона в составе препаратов дипроспан и лонгидазы, проявило высокий синергетический эффект и антифиброзную активность. Противовоспалительное действие комбинации этих двух препаратов существенно превышало суммарный эффект при их раздельном использовании. Так, уменьшение максимальной толщины фиброзного слоя составило соответственно 49%, по сравнению с контрольными значениями, а уменьшении общей площади фиброзного образования - 46%. Выявлено противовоспалительное действие комплекса, которое усиливает положительный эффект препаратов, позволяет говорить о перспективе его использования для предупреждения эпидурального фиброза спинного мозга. Ключевые слова: фиброз; соединительная ткань; дипроспан; лонгидаза.

<sup>2</sup>I.V.Fishchenko, <sup>1</sup>D.O.Zavodovskiy,

<sup>3</sup>O.M.Motuzuyk, <sup>1</sup>T.Yu.Matvienko,

<sup>1</sup>D.N.Nozdrenko

## DIPROSPAN, LONGIDAZA AND THEIR COMBINED ACTION AGAINST FIBROSIS CAUSED BY MECHANICAL INJURY OF THE INTERVERTEBRAL DISCS IN RATS.

The formation of connective tissue changes in the spinal canal

of rats, caused by the method of intervertebral disc ruptures, in association with a mixture of epidural injection of longidaza and diprospan has been researched. Simultaneous injection of hyaluronidase and betamethasone in composition of diprospan and longidaza, revealed a high synergistic effect and antifibrotic activity. Combined antifibrosis action of these two drugs is stronger than the sum of the actions of the two drugs in their separate use. Reduction of the maximum thickness of the fibrous layer was 49%, compared with the reference value and reduction of the total area of the fibrous formation was 46%. In our opinion, due to anti-inflammatory effects and the ability to reduce epidural scar adhesion, this complex is promising for its therapeutic use in treatment of spinal epidural fibrosis. Key words: fibrosis; connective tissue; diprospan; longidaza.

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre, Institute of Biology, Kyiv;

<sup>2</sup>SI «Institute of traumatology and orthopedics of NAMN of Ukraine», Kyiv;

<sup>3</sup>Eastern European National University named after Lesia Ukrainka, Lutsk.

## REFERENCES

1. Riordan JR1, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsky N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989; 245: 1066-73.
2. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol. 2003; 500-3.
3. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. Matrix Biol. 2000; 19: 325-32.
4. Zhulev NM, Badzgaradze JD, Zhulev SN. Osteochondrosis vertebralis. SPb.: Lan; 2001. [Russian].
5. Menendez MI, Phelps MA, Bertone AL. Pharmacokinetics of intra-articular betamethasone sodium phosphate and betamethasone acetate and endogenous hydrocortisone suppression in exercising horses. J Vet Pharmacol Ther. 2016; 39: 22-6.
6. Dyakonova VA., Dambaeva VA., Dambaeva SV, Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxonium immunomodulator and the human immune system cells. Int Immunopharmacol. 2004; 15(13): 1615-23.
7. Simonovich AE, Baykalov AA. Surgical treatable of the pain syndrome's secondary infection after hernia excision of lumbar intervertebral cartilages. Spin surg. 2005; 3: 87-92. [Russian].
8. Habib G, Zahran R, Najjar R, Badarny S, Jabbour A, Artul S, Hakim G, Jabaly-Habib H. The effect of intra-articular injection of Diprospan at the knee joint on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Swiss Med Wkly. 2015; 145: w14134.
9. Habib G, Artul S, Chernin M, Hakim G, Jabbour A. The effect of intra-articular injection of betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate at the knee



- joint on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a case-controlled study. J Investig Med. 2013; 61(7):1104-7.
10. Korzhevsky DE. Summary of histologic technique's fundamentals for doctors and histotechnologists. St. Petersburg; 2005. [Russian].
11. Leena James, Akshay Shetty, Diljith Rishi, Marin Abraham. Management of Oral Submucous Fibrosis with Injection of Hyaluronidase and Dexamethasone in Grade III Oral Submucous Fibrosis: A Retrospective Study. J Int Oral Health. 2015; 7: 82-5.
12. Papagelopoulos PJ, Petrou HG, Triantafyllidis PG. Treatment of lumbosacral radicular pain with epidural steroid injections. Orhtopedics. 2001; 24 (2): 145 – 9.
13. Benzon HT. Epidural steroid injectoins for low back pain and lumbosacral radiculopathy. Pain. 1986; 24 (3): 277- 95.
14. Isaeva NV, Dralyuk MG. Basic principles of treatment and prevention postoperative epidural fibrosis of patient lumbar osteochondrosis. Neurosurgery. 2010; 3: 74-9. [Russian].
15. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. J. Pathol. 2003: 504-15.
16. Robertson JT. Role of peridural fibrosis in the failed back: a review Eur. Spine J. 1996; 5(1): 2-6.

*Матеріал надійшов  
до редакції 25.04.2016*

# Фізіологічний зв'язок еритроцитарних антигенів із показниками спермограми коней

О.В. Ткачов<sup>1</sup>, В.І. Шеремета<sup>2</sup>, О.Л. Ткачова<sup>3</sup>, В.І. Россоха<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, Харків, <sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, <sup>3</sup>Інститут тваринництва НААН України, Харків;  
e-mail: sasha\_sashaola@mail.ru

*У статті показано можливу наявність фізіологічного зв'язку еритроцитарних антигенів систем груп крові А, С, D, К обстежених коней української селекції з основними показниками спермограм. Встановлено, що при успадкуванні алелів ad/bcm і dg/cgm системи групи крові D у жеребців спостерігається тенденція до зниження активності сперматозоїдів у середньому менше ніж на 5 балів; за наявності алелів ad/cgm, ad/d, ad/de, ad/dk, bcm/d, bcm/de, bcm/dg, bcm/dk, cegm/cgm, cegm/d, cegm/dg, cegm/dk, cgm/ceg, cgm/cgm, cgm/dg, cgm/dk, de/cgm, de/dk, dg/di, dk/d, dk/de, dk/dk було отримано спермограми середньої якості з активністю сперматозоїдів від 5 до 7 балів; при виявленні алелей bcm/cgm, dg/dk, de/d, cgm/d, cgm/de - отримання високих значень активності сперматозоїдів більше ніж 7 балів. Встановлена тенденція збільшення концентрації сперматозоїдів за наявності у жеребців a/- алеля системи групи крові С. Показано можливе зниження концентрації сперматозоїдів у коней в разі носійства a/- алеля системи групи крові К. Найбільшим кореляційним зв'язком із об'ємом еякуляту, активністю, концентрацією та кількістю патологічних форм сперматозоїдів мали алелі D-системи, коефіцієнт кореляції становив 0,36, 0,31, 0,43 і 0,27 відповідно. Водночас було встановлено, що алелі А, С і К-систем груп крові мали коефіцієнт кореляції з досліджуваними показниками сперми не більше ніж 0,07.*

*Ключові слова:* еритроцитарні антигени; алелі; системи групи крові; коні; спермограма.

## ВСТУП

У сучасній фізіології більше досліджується вплив мікроорганізмів на основні показники спермограм при отриманні і кріоконсервуванні сперми, що пояснюється наступним застосуванням заготовлених спермодоз у системі штучного осіменіння коней [1-4]. При цьому досліджується велика кількість чинників, які можуть впливати на основні показники спермограм жеребців: гормональний фон, порода, вік, пора року, загальний фізіологічний стан, мікотоксини, загальна хромосомна нестабільність та інші [5-10]. Водночас асоційований зв'язок алелів еритроцитарних антигенів із показниками свіжеотриманих еякулятів практично не вивчається, незважаючи на те, що ще в 40-х роках ХХ століття було доведено їх кореляційний вплив на фертильний потенціал

коней [11]. Якщо у людини сьогодні офіційно визнано 29 систем груп крові з 35 існуючих [12], то у коней відомо лише 9 подібних систем, у тому числі найбільше практичне значення мають лише 4 з них: А, С, D, К, зв'язок яких з показниками спермограм не досліджували; у фізіології коней вивчали лише особливості антигенного профілю еритроцитів при збільшенні кількості абортів та при появі гемолітичної хвороби лошат після їх народження [4, 6, 11].

Таким чином, недостатньо вивченим залишається питання зв'язку алелів еритроцитарних антигенів систем груп крові коней з основними фізіологічними показниками їх спермограм. Дослідження в цьому напрямку можуть мати велике теоретичне і практичне значення для підвищення ефективності по-

© О.В. Ткачов, В.І. Шеремета, О.Л. Ткачова, В.І. Россоха

дальшого кріоконсервування та прогнозування фертильного потенціалу сперми коней.

Мета нашого дослідження - встановлення тенденцій асоційованого зв'язку алелів еритроцитарних антигенів систем груп крові А, С, D, К з основними показниками спермограм коней.

## МЕТОДИКА

Дослідження виконували в Україні впродовж 10 років, починаючи з 2005 р. на 1371 еякулятах від 69 жеребців-плідників 9 заводських порід (українська верхова, чистокровна верхова, тракененська, ганноверська, бельгійська, вестфальська, арабська, орловська рисиста і російська рисиста), що розводяться в кінних заводах, племрепродукторах, кінно-спортивних клубах Харківської, Полтавської, Запорізької, Луганської, Київської, Житомирської, Дніпропетровської областей. Отримання сперми здійснювали за харківською технологією на стерильну штучну вагіну із стерильним спермоприймачем і проведенням санітарної обробки жеребців перед отриманням еякулятів [6]. У свіжеотриманій спермі загальноприйнятими методиками [10] визначали: активність сперматозоїдів у балах (1 бал дорівнює 10 % статевих клітин із прямолінійно-поступальним рухом) візуально у світловому мікроскопі Jenaval («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні об'єктива у 10-20 разів; об'єм еякуляту визначали в сантиметрах кубічних у мірному циліндрі; концентрацію сперматозоїдів визначали в камері Горяєва; відносну кількість патологічних форм сперматозоїдів визначали в процентах візуально в світловому мікроскопі при збільшенні об'єктива у 10-20 разів. Показники спермограм аналізували залежно від еритроцитарних антигенів за алелями кожної з D, А, С, К-систем груп крові окремо. Генотипування за еритроцитарними антигенами жеребців визначали реакцією прямої аглютинації з застосуванням стандартних моноспецифічних сироваток-реагентів, які верифіковані з між-

народним банком імунодіагностиків ISAG (International Society for Animal Genetics): а- та d-антигени за А-системою; а-антиген за С-системою; а-, b-, с-, d-, е-, g- та k-антигени за D-системою; а-антиген за К-системою загальноприйнятими методиками [13] на базі лабораторії генетики Інституту тваринництва НААН України. При визначенні генотипів жеребців за групами крові в кожній системі визначали обидва алелі, що успадковані від батьків, проведенням сімейного алельного аналізу. Оскільки у коней успадкування алелей систем груп крові є кодомінантним, генотипи позначали через ризик: алель до ризику - успадкований від батька, алель після ризику - успадкований від матері (наприклад, за D-системою груп крові: bcm/dk)

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методиками варіаційної статистики [14]. Кореляційно-дисперсійний аналіз виконували з використанням спеціалізованого пакету прикладних програм SPSS for Windows.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку було проведено аналіз отриманих показників спермограм коней залежно від еритроцитарних антигенів поліморфної системи D, як найбільш поширеної серед коней подібно до системи АВ0 у людини (табл.1).

Слід відмітити, що застосований аналіз отриманих результатів спермограм жеребців тільки в розрізі алелей еритроцитарних антигенів системи групи крові D дає змогу розділити їх на 3 групи: з рухливістю сперматозоїдів менше ніж 5 балів, від 5 до 7 балів та більше ніж 7 балів, що може мати практичне значення при прогнозуванні фертильного потенціалу сперми коней. Від жеребців з алелями ad/bcm і dg/cgm у середньому було отримано спермограми низької якості, оскільки активність сперматозоїдів була менше ніж 5 балів, що достовірно менше порівняно з активністю 5-7 балів ( $P < 0,05-0,01$ ) та менше від групи самців з активністю статевих клітин

7 та більше балів ( $P<0,01-0,001$ ). Встановлено, що за наявності у жеребців алелей ad/cgm, ad/d, ad/de, ad/dk, bcm/d, bcm/de, bcm/dg, bcm/dk, cegm/cgm, cegm/d, cegm/dg, cegm/dk, cgm/ceg, cgm/cgm, cgm/dg, cgm/dk, de/cgm, de/dk, dg/di, dk/d, dk/de, dk/dk було отримано

**Таблиця 1. Алелі системи групи крові D та фізіологічні показники спермограми жеребців ( $M\pm m$ )**

Алелі	Кількість еякулятів	Об'єм еякуляту, см <sup>3</sup>	Активність сперматозоїдів, бали	Концентрація сперматозоїдів, млн/см <sup>3</sup>	Патологічні форми сперматозоїдів, %
Активність сперматозоїдів менше ніж 5 балів					
ad/bcm	17	97,29 $\pm$ 3,97	4,88 $\pm$ 0,08	77,12 $\pm$ 2,94	7,5 $\pm$ 0,24
dg/cgm	14	115,9 $\pm$ 2,94	4,71 $\pm$ 0,13	100,9 $\pm$ 2,16*	13,14 $\pm$ 0,50**
Активність сперматозоїдів від 5 до 7 балів					
ad/cgm	12	112,0 $\pm$ 3,15*	5,17 $\pm$ 0,11*	102,83 $\pm$ 1,62**	15,75 $\pm$ 0,42***
ad/d	16	72,56 $\pm$ 2,72*	5,13 $\pm$ 0,09	76,56 $\pm$ 3,40	16,81 $\pm$ 0,29***
ad/de	36	79,89 $\pm$ 3,85*	5,44 $\pm$ 0,08*	135,75 $\pm$ 1,91**	11,03 $\pm$ 0,25*
ad/dk	14	39,64 $\pm$ 2,83**	5,14 $\pm$ 0,14	91,64 $\pm$ 1,34	19,29 $\pm$ 0,32**
bcm/d	34	33,21 $\pm$ 0,83***	6,15 $\pm$ 0,13**	110,41 $\pm$ 1,79*	11,47 $\pm$ 0,22*
bcm/de	110	60,85 $\pm$ 2,97*	6,21 $\pm$ 0,13**	161,5 $\pm$ 5,56**	15,31 $\pm$ 0,22**
bcm/dg	110	94,30 $\pm$ 3,26	5,91 $\pm$ 0,10*	113,9 $\pm$ 1,49*	17,53 $\pm$ 0,67**
bcm/dk	130	66,96 $\pm$ 1,88*	6,20 $\pm$ 0,11**	108,7 $\pm$ 1,91*	13,88 $\pm$ 0,19*
cegm/cgm	33	63,27 $\pm$ 0,93*	5,76 $\pm$ 0,13*	85,67 $\pm$ 1,34	17,36 $\pm$ 0,18**
cegm/d	25	59,72 $\pm$ 1,97**	5,72 $\pm$ 0,21*	122,2 $\pm$ 0,87**	11,32 $\pm$ 0,32*
cegm/dg	33	59,75 $\pm$ 1,93**	5,57 $\pm$ 0,09*	88,76 $\pm$ 1,38	12,27 $\pm$ 0,35*
cegm/dk	52	59,46 $\pm$ 3,78**	5,29 $\pm$ 0,14*	112,9 $\pm$ 3,4**	15,15 $\pm$ 0,33**
cgm/ceg	15	37,93 $\pm$ 1,77***	5,20 $\pm$ 0,11*	79,07 $\pm$ 1,79	14,33 $\pm$ 0,46**
cgm/cgm	89	50,19 $\pm$ 1,22*	5,31 $\pm$ 0,09*	88,25 $\pm$ 1,31	13,15 $\pm$ 0,40**
cgm/dg	60	66,47 $\pm$ 3,82*	6,11 $\pm$ 0,13**	104,85 $\pm$ 2,53*	12,88 $\pm$ 0,23*
cgm/dk	58	50,26 $\pm$ 1,88**	5,03 $\pm$ 0,09*	82,53 $\pm$ 2,73	15,79 $\pm$ 0,28*
de/cgm	8	65,50 $\pm$ 2,95*	5,25 $\pm$ 0,25*	65,88 $\pm$ 1,92	19,87 $\pm$ 0,13**
de/dk	114	50,45 $\pm$ 1,21***	5,65 $\pm$ 0,11*	95,21 $\pm$ 2,97*	15,11 $\pm$ 0,29**
dg/di	16	29,18 $\pm$ 1,26***	5,31 $\pm$ 0,12*	56,43 $\pm$ 0,98*	17,43 $\pm$ 0,24**
dk/d	80	40,56 $\pm$ 1,6*	6,01 $\pm$ 0,15**	130,7 $\pm$ 4,86***	13,21 $\pm$ 0,47**
dk/de	29	92,2 $\pm$ 3,27	5,51 $\pm$ 0,19*	123,9 $\pm$ 5,12*	14,31 $\pm$ 0,37**
dk/dk	32	77,9 $\pm$ 2,44*	6,08 $\pm$ 0,18**	130,2 $\pm$ 6,3**	14,8 $\pm$ 0,15**
Активність сперматозоїдів більше ніж 7 балів					
bcm/cgm	107	47,82 $\pm$ 2,95**	7,01 $\pm$ 0,09***	177,48 $\pm$ 7,57**	13,19 $\pm$ 0,20**
dg/dk	19	54,11 $\pm$ 1,16*	7,73 $\pm$ 0,10**	153,7 $\pm$ 2,9***	11,05 $\pm$ 0,42*
de/d	27	17,48 $\pm$ 0,44***	8,25 $\pm$ 0,08***	220,7 $\pm$ 3,44***	14,41 $\pm$ 0,28**
cgm/d	29	30,24 $\pm$ 1,05**	7,62 $\pm$ 0,09***	227,3 $\pm$ 2,84***	14,83 $\pm$ 0,29*
cgm/de	52	69,98 $\pm$ 2,02*	7,46 $\pm$ 0,07***	132,5 $\pm$ 1,51***	8,61 $\pm$ 0,20

\*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*\*\*  $P<0,001$  порівняно до алелей ad/bcm та dg/cgm.

спермограми середньої якості з активністю сперматозоїдів від 5 до 7 балів. Отримання спермограм із високим фертильним потенціалом за активністю сперматозоїдів у середньому більше ніж 7 балів супроводжувалося наявністю bcm/cgm, dg/dk, de/d, cgm/d, cgm/de алелів еритроцитарних антигенів. Найбільша концентрація сперматозоїдів спостерігалася у жеребців української селекції з алелем cgm/d. У разі успадкування кінсьми алеля dg/di спостерігалася концентрація сперматозоїдів у середньому менше ніж 60 млн/см<sup>3</sup>. Кількість патологічних форм сперматозоїдів менше як 10 % було відмічено у коней з алелем ad/bcm, а при наявності алеля ad/dk статевих клітин аномальної морфології було більше понад 19 %.

Коефіцієнт кореляції алелей еритроцитарних антигенів системи групи крові D жеребців української селекції з об'ємом еякуляту становить 0,36 (P<0,01), з активністю сперматозоїдів – 0,31 (P<0,01), з концентрацією статевих клітин – 0,43 (P<0,01), з кількістю патологічних форм – 0,27 (P<0,05). Це може підтверджувати обґрунтованість встановлених фізіологічних тенденцій.

Отримані результати основних фізіологічних показників спермограм в розрізі алелей системи групи крові A представлено у табл. 2.

Отримані результати свідчать про те, що еритроцитарні антигени системи групи крові A мають менший статистичний зв'язок із показниками спермограм обстежених жеребців української селекції порівняно з D-системою. Наявність алелей еритроцитарних антигенів a/- та їх відсутність -/- сприяло недостовір-

ному зменшенню активності сперматозоїдів на 0,78 та 0,12 бала відповідно порівняно до носіїв ad/- алеля. Проте об'єм еякуляту у жеребців з a/- алелем був на 5,37 см<sup>3</sup> більше від коней з ad/- алелем та на 1,25 см<sup>3</sup> більше від плідників з відсутністю алелей цієї системи групи крові. Наявність у обстежених коней a/- алеля сприяло зниженню концентрації сперматозоїдів на 57,8 млн/см<sup>3</sup> (P<0,01) порівняно до носіїв ad/- алеля та на 33,88 млн/см<sup>3</sup> (P<0,05) від тварин з -/- алелем. При успадкуванні жеребцями a/- алеля достовірно збільшувалася кількість патологічних форм сперматозоїдів на 5,84 % (P<0,01) порівняно з носіями ad/- алеля, та на 5,28 % (P<0,01) порівняно з тваринами у яких відсутні еритроцитарні антигени досліджуваної системи. Проведений кореляційно-дисперсійний аналіз показав, що у обстежених жеребців української селекції коефіцієнт кореляції алелей системи групи крові A становить з об'ємом еякуляту 0,002, з активністю сперматозоїдів – 0,006, з концентрацією – 0,02 (P<0,05), з кількістю патологічних форм статевих клітин – 0,04 (P<0,05).

Проаналізовано також фізіологічні показники спермограм обстежених коней української селекції тільки в розрізі алелей системи групи крові C (табл. 3).

Ця система групи крові ще менше зумовлює основні показники фертильного потенціалу спермограм обстежених коней української селекції. Достовірних відмінностей за об'ємом еякуляту та активністю сперматозоїдів не встановлено. Водночас при наявності у жеребців a/- алеля концентрація

Таблиця 2. Алелі системи групи крові A та фізіологічні показники спермограми жеребців (M±m)

Алелі	Кількість проб	Об'єм еякуляту, см <sup>3</sup>	Активність сперматозоїдів, бали	Концентрація сперматозоїдів, млн/см <sup>3</sup>	Патологічні форми сперматозоїдів, %
-/-	121	64,25 ±2,38	5,91 ±0,11	99,75 ±2,56*	14,59 ±0,19
a/-	8	65,50 ±2,94	5,25 ±0,25	65,87 ±1,92**	19,87 ±0,13*
ad/-	1242	60,13 ±0,81	6,03 ±0,04	123,67 ±1,43	14,03 ±0,11

\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 порівняно до алеля ad/-.



сперматозоїдів була більше на 18,88 млн/см<sup>3</sup> ( $P<0,05$ ) від відсутності еритроцитарних антигенів цієї системи групи крові. Відносна кількість патологічних форм сперматозоїдів була менше на 2,29 % ( $P<0,05$ ) у жеребців, які не успадкували алелі досліджуваної антигенної системи. Коефіцієнт кореляції алелей системи групи крові С з об'ємом еякуляту становить 0,003, з активністю сперматозоїдів – 0,004, з їх концентрацією – 0,02 ( $P<0,05$ ), з кількістю патологічних форм – 0,07 ( $P<0,05$ ).

Наступною частиною дослідження було складання спермограм обстежених коней української селекції тільки в розрізі алелей системи групи крові К (табл. 4).

Еритроцитарні антигени алелей системи групи крові К ще менше зумовлювали основні показники фертильного потенціалу спермограм обстежених жеребців порівняно із антигенними системами А, С і D. Достовірних відмінностей за об'ємом еякуляту і активністю сперматозоїдів у носіїв алелей цієї системи групи крові не було встановлено. Однак у жеребців-носіїв а/- еритроцитарного антигену концентрація сперматозоїдів була менше на 24,89 млн/см<sup>3</sup> ( $P<0,05$ ) від тварин у яких немає алелей цієї системи групи крові. Коефіцієнт кореляції К- системи становить з об'ємом еякуляту 0,001, з активністю сперма-

тозоїдів – 0,005, з концентрацією та з відносною кількістю патологічних форм статевих клітин – 0,03 ( $P<0,05$ ).

Таким чином, отримані результати вперше вказують на можливу наявність асоційованого зв'язку основних фізіологічних показників спермограм із антигенним профілем за алелями А, С, D і К-систем груп крові у обстежених коней української селекції.

## ВИСНОВКИ

1. У наших дослідженнях на обстежених конях української селекції найбільший кореляційний зв'язок з об'ємом еякуляту, активністю, концентрацією та кількістю патологічних форм сперматозоїдів мали алелі еритроцитарних антигенів системи групи крові D, коефіцієнт кореляції становив 0,36 ( $P<0,01$ ), 0,31 ( $P<0,01$ ), 0,43 ( $P<0,01$ ) і 0,27 ( $P<0,05$ ) відповідно. Водночас алелі еритроцитарних антигенів А, С і К-систем груп крові мали коефіцієнт кореляції з досліджуваними показниками фертильного потенціалу сперми не більше ніж 0,07.

2. Встановлено, що у обстежених жеребців української селекції спостерігається тенденція отримання спермограм з активністю сперматозоїдів у середньому менше ніж 5

Таблиця 3. Алелі системи групи крові С та фізіологічні показники спермограми жеребців ( $M\pm m$ )

Алелі	Кількість проб	Об'єм еякуляту, см <sup>3</sup>	Активність сперматозоїдів, бали	Концентрація сперматозоїдів, млн/см <sup>3</sup>	Патологічні форми сперматозоїдів, %
-/-	1106	61,37 $\pm$ 0,85	5,99 $\pm$ 0,04	117,6 $\pm$ 1,35	13,67 $\pm$ 0,09
a/-	265	57,03 $\pm$ 1,68	6,08 $\pm$ 0,08	136,48 $\pm$ 3,82*	15,96 $\pm$ 0,31*

\*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*\*\*  $P<0,001$  порівняно до -/- алеля.

Таблиця 4. Алелі системи групи крові К та фізіологічні показники спермограми жеребців ( $M\pm m$ )

Алелі	Кількість проб	Об'єм еякуляту, см <sup>3</sup>	Активність сперматозоїдів, бали	Концентрація сперматозоїдів, млн/см <sup>3</sup>	Патологічні форми сперматозоїдів, %
-/-	1186	60,27 $\pm$ 0,85	6,03 $\pm$ 0,04	124,6 $\pm$ 1,47	14,15 $\pm$ 0,11
a/-	185	62,17 $\pm$ 1,51	5,9 $\pm$ 0,07	99,71 $\pm$ 2,34*	13,9 $\pm$ 0,27*

\*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*\*\*  $P<0,001$  порівняно до еякулятів жеребців у яких відсутні алелі -/-.

балів при успадкуванні алелей ad/bcm та dg/cgm системи групи крові D. Наявність у коней алелей ad/cgm, ad/d, ad/de, ad/dk, bcm/d, bcm/de, bcm/dg, bcm/dk, cegm/cgm, cegm/d, cegm/dg, cegm/dk, cgm/ceg, cgm/cgm, cgm/dg, cgm/dk, de/cgm, de/dk, dg/di, dk/d, dk/de, dk/dk супроводжувалось отриманням спермограм з активністю сперматозоїдів у середньому від 5 до 7 балів. У разі носійства кіньми алелей bcm/cgm, dg/dk, de/d, cgm/d, cgm/de було отримано високі показники спермограм з активністю статевих клітин у середньому більше ніж 7 балів. Це можливо дасть змогу прогнозувати фертильний потенціал коней у практичній роботі племінних підприємств за їх антигенним профілем.

3. Встановлено тенденцію ( $P < 0,05$ ) збільшення концентрації сперматозоїдів за наявності у обстежених жеребців а/- алеля системи групи крові С. Показано, що у разі носійства а/- еритроцитарного антигена К-системи спостерігається зниження ( $P < 0,05$ ) концентрації сперматозоїдів.

**А. В. Ткачѳв, В. І. Шеремета, О. Л. Ткачѳва,  
В. І. Россоха<sup>3</sup>**

### **ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ СПЕРМОГРАММЫ ЛОШАДЕЙ**

В статье показано возможное наличие физиологической связи эритроцитарных антигенов систем групп крови А, С, D, К обследованных лошадей украинской селекции с основными показателями спермограмм. Установлено, что при наследовании аллелей ad/bcm и dg/cgm системы группы крови D у жеребцов наблюдается тенденция снижения активности сперматозоидов в среднем менее 5 баллов; при наличии аллелей ad/cgm, ad/d, ad/de, ad/dk, bcm/d, bcm/de, bcm/dg, bcm/dk, cegm/cgm, cegm/d, cegm/dg, cegm/dk, cgm/ceg, cgm/cgm, cgm/dg, cgm/dk, de/cgm, de/dk, dg/di, dk/d, dk/de, dk/dk было получено спермограммы среднего качества с активностью сперматозоидов от 5 до 7 баллов; при выявлении аллелей bcm/cgm, dg/dk, de/d, cgm/d, cgm/de - получение высокой активности сперматозоидов более 7 баллов. Установлена тенденция увеличения концентрации сперматозоидов при наличии у жеребцов а/- аллеля системы группы крови С. Показано возможное снижение концентрации сперматозоидов у лошадей при носительстве а/- аллеля системы группы крови К. Наибольшей корреляционной связью с объемом эякулята, активностью,

концентрацией и количеством патологических форм сперматозоидов имели аллели D-системы, коэффициент корреляции составил 0,36, 0,31, 0,43 и 0,27 соответственно. В то же время было установлено, что аллели А, С и К-систем групп крови имели коэффициент корреляции с исследуемыми показателями спермы не более 0,07.

Ключевые слова: эритроцитарные антигены; аллели; системы групп крови, лошади; спермограмма.

**A.V. Tkachev<sup>1,2</sup>, V.I. Sheremeta<sup>2</sup>, O.L. Tkacheva<sup>3</sup>,  
V. I. Rossokha<sup>3</sup>**

### **PHYSIOLOGICAL RELATIONSHIP OF ERYTHROCYNE ANTIGENS WITH INDICATORS OF HORSE SPERMOGRAM**

The possible presence of the physiological relationship of erythrocyte antigens of the A, C, D, K alleles of the blood group systems in the examined horses of the Ukrainian selection with the spermogram major parameters has been demonstrated. It has been found that when investigating ad/bcm and dg/cgm alleles of the blood group system D in the stallions, there was the physiological tendency of the decrease in the semen activity on average less than 5 points; at the presence of ad/cgm, ad/d, ad/de, ad/dk, bcm/d, bcm/de, bcm/dg, bcm/dk, cegm/cgm, cegm/d, cegm/dg, cegm/dk, cgm/ceg, cgm/cgm, cgm/dg, cgm/dk, de/cgm, de/dk, dg/di, dk/d, dk/de, dk/dk alleles the spermogram of the average quality with the activity of the semen on average from 5 to 7 points was obtained; at the presence of bcm/cgm, dg/dk, de/d, cgm/d, cgm/de alleles high parameters of semen activity, more than 7 points, were received. The tendency of the increase in the semen concentration was revealed in the examined stallions having а/- allele of the blood group C. The possible decrease in the semen concentration in the stallions having а/- allele of the blood group K was shown. The alleles of the blood group system D had the highest statistical impact on the volume of the ejaculate, the activity, concentration and the number of pathological forms of semen, the correlation coefficient was 0,36; 0,31; 0,43 and 0,27, respectively. At the same time it has been found out that the alleles of the blood group systems A, C and K had the coefficient of correlation with the examined parameters of the semen at the level of not more than 0,07.

Key words: alleles; erythrocyte antigens; blood group system; horses; semen analysis.

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, Kharkiv;

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup>Institut of Animal science of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv

### **REFERENCES**

1. Tkachev AV, Kalashnikov VO, Sushko OB. Bacterial contamination of semen stallions sires at different stages of biotechnology cryopreservation. *Nauk-Tech Bull Inst*

- Anim Sci NAAS. 2011; 104 : 208-12. [Ukrainian].
2. Katila T. In Vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. Acta vet Scand. 2001; 42 : 199 – 217.
  3. Mahon G, Cunningham E. Inbreeding and the inheritance of fertility in the thoroughbred mare. Lavestock Prod Sci. 1982; 9 (6) : 743-54.
  4. Mottershead J. Frozen semen preparation and use Part 1. Canadian Morgan Magazine. 2000; Nov/Dec : 32 - 43.
  5. Tkachev AV. Effect of acceptable levels of forage micotoxins on the resistance and contamination of studhorse semen in Ukraine. Animal Agriculture and Veterinary Medicine. 2014; 3 (14) : 3-7. [Russian].
  6. Tkachev AV. Influence of immunogenetic factors on artificial insemination efficiency and natural copulation of horses in Ukraine. Fundamental res. 2013; 10 (2) : 371-4. [Russian].
  7. Tkachev AV. Hormonal background of stallions exposed to maximal permissible levels of feed mycotoxins in Ukraine. Vestnik of Novosibirsk agricultural university. 2014; 4 (33) : 115-9. [Russian].
  8. Tkachev AV. The cytogenetic status of stallions under the influence of permissible mycotoxin levels in feed. Mold Applied Gen. 2015; 19 : 79-84. [Russian].
  9. Tkachev AV. Efficiency of artificial insemination in respect to the schemes of males sanitation before getting sperm. Vestnik of Novosibirsk agricultural university. 2015; 4 (37) : 95-101. [Russian].
  10. Tkachev AV. Efficiency of horses artificial insemination of depending of spermatozoa membranes damage rate. Fundamental res. 2013; 10 (1) : 145-8. [Russian].
  11. Coombs R, Crowhurst R, Day P. Hemolytic disease of newborn foals due to iso-immunisation of pregnancy. J. Hyd. 1948; 46 : 403-18.
  12. Tkachev AV. Blood. Pharmaceutical Encyclopedia: Nats farm universytet. 2016 : 255-8. [Ukrainian].
  13. Dubrovskaya RM, Starodumov IM. Guidelines on the use of immunogenetic markers to assess population structure change (species) of horses. Divovo: Institute of Horse Breeding; 1995. [Russian].
  14. Plohinsky NA. Guide to biometrics for livestock. Moscow: Kolos; 1969. [Russian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 21.09.2016*

# Зміни прижиттєвих морфологічних показників сітківки на тлі корекції ліпідного обміну у хворих на цукровий діабет 2-го типу

Н.М. Веселовська

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

*Досліджували функціональні зміни прижиттєвих морфологічних показників макулярної зони сітківки в умовах тривалої дії фенотібу в хворих на цукровий діабет 2-го типу. Проведено динамічне спостереження деяких офтальмологічних (гострота зору, товщина сітківки макулярної ділянки за результатами оптико-когерентної томографії) та системних (біохімічні показники вмісту ліпідних фракцій) функціональних показників в умовах тривалого застосування цього препарату у 20 хворих на ЦД 2-го типу та діабетичного макулярного набряку протягом 8 міс. За цей час спостерігали певні позитивні зміни морфофункціонального стану макулярної зони сітківки: підвищення гостроти зору та зменшення товщини сітківки макулярної ділянки з одночасним покращенням ліпідного профілю в сироватці крові: зменшення вмісту вільного холестерину та ЛПНЩ з підвищенням вмісту ЛПВЩ. Ключові слова: цукровий діабет; макулярний набряк; ліпідні фракції крові.*

## ВСТУП

На розвиток та прогресування діабетичної ретинопатії (ДР) впливають тривалість та ступінь компенсації цукрового діабету (ЦД) [1], високий рівень артеріального тиску, особливо в пацієнтів з ЦД 2-го типу [2-4] та певні зміни ліпідного профілю крові, що можуть додатково виникати і внаслідок неправильного харчування, недостатньої фізичної активності та нервового напруження [5-7]. Нині немає чітких доказів про прямий зв'язок ліпідних фракцій на характер перебігу та прогресування ДР. Проте, за даними ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), визначено наявність прямої кореляції між кількістю твердих екссудатів у сітківці та збільшеним вмістом холестерину в сироватці крові [8]. За сучасними спостереженнями збільшення вмісту вільного холестерину, ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) і тригліцеридів асоційовано з ризиком розвитку діабетичного макулярного набряку (ДМН), а корекція ліпідних фракцій може позитивно

впливати на перебіг змін у макулярній зоні сітківки [9]. В останні роки отримані позитивні дані щодо впливу похідних фенотібу кислоти для відновлення ліпідних фракцій крові та лікування тяжких ускладнень ЦД: застосування препарату трайкор на основі фенотібу кислоти сприяло зниженню вмісту вільного холестерину на 25%, ЛПНЩ на 32% та збільшенню ЛПВЩ на 11-34 % [10,11]. Деякі автори взагалі наводили дані про ефективність фенотібу в лікуванні ДР у хворих на ЦД 2-го типу навіть за нормальних значень ліпідних показників [5].

Мета нашої роботи - дослідити функціональні зміни прижиттєвих морфологічних показників макулярної зони сітківки в умовах тривалої дії фенотібу (145 мг) у хворих на ЦД 2-го типу.

## МЕТОДИКА

Протягом 8 міс обстежено 20 осіб (40 очей) віком від 55 до 75 років із ЦД 2-го типу тривалістю 10–18 років, які за рекомендаціями

ендокринолога приймали трайкор (Трайкор<sup>®</sup>, 145; «Abbott, Lab.», Франція) на основі мікронізованого фенофібрату у дозі 145 мг один раз на добу. Всі хворі вживали і цукрознижувальні препарати з групи бігуанідів за призначенням ендокринолога, режим прийому яких під час спостереження не змінювали. Контролю підлягали гострота зору, товщина сітківки макулярної зони (ТСМД) за результатами оптико-когерентної томографії на оптичному когерентному томографі – Стратус-3000 («Carl Zeiss», Німеччина), вміст вільного холестерину у сироватці крові та його фракцій (ЛПВЩ, ЛПНЩ). Результати оцінювали за розрахунком відносних змін у відсотках.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити позитивні зміни гостроти на всьому терміні спостереження. Покращення визначено вже у перші 4 міс, а максимальне відносно збільшення її рівня - за 8 міс прийому препарату (табл. 1).

Аналіз результатів оптико-когерентної томографії з визначенням ТСМД за програмою «Макула» також показав суттєве відносно покращення морфологічних характеристик центральної зони сітківки (табл. 2).

Так, вихідне значення ТСМД становило  $392 \pm 64$  мкм, що свідчило про наявність небезпечного для прогнозу зорових функцій ретинального ускладнення ЦД - ДМН. Проте вже за 1 міс від початку прийому препарату оптико-когерентний аналіз визначив відносно зменшення ТСМД на рівні 8%. Подальше спостереження за хворими показало, що за 4 і 8 міс від початку лікування відносно зменшення ТСМД стало більш помітним (12 та 42% відповідно). Тобто тривалий прийом трайкору сприяв стабільній динаміці прогресивного покращення функціонального стану макулярної ділянки сітківки за результатами прижиттєвого морфологічного аналізу ТСМД як свідчення поступового регресу набрякових явищ у сітківці.

Результати біохімічного аналізу крові показали наявність деяких відхилень у по-

Таблиця 1. Зміни гостроти зору хворих на цукровий діабет у різні терміни спостереження

Кількість обстежених	Відносні зміни гостроти зору, $\Delta$ %			
	Вихідне значення	1 міс	4 міс	8 міс
n = 40 очей (20 осіб)	$0,65 \pm 0,02$	+7,4	+18,2	+18,7

казниках ліпідного профілю у обстежених на початку дослідження (табл. 3). Проте за 8 міс прийому препарату відбулися певні позитивні зміни: зменшення вмісту вільного холестерину та ЛПНЩ при збільшенні ЛПВЩ.

Отже, представлені результати свідчать про існування вихідних відхилень як офтальмологічних, так і системних показ-

ників у хворих на ЦД 2-го типу. Тривале спостереження за обстеженими протягом 8 міс у разі прийому мікронізованого фенофібрату (Трайкор<sup>®</sup>145) продемонструвало, що в функціональному стані сітківки та у сироватці крові сталося покращення. На наш погляд, це може відбуватися за рахунок ліпідомодифікуючих та антизапальних властивостей фенофібрату, який також має

Таблиця 2. Відносні зміни томографічних показників товщини сітківки макулярної ділянки (ТСМД) за прижиттєвим аналізом

Кількість обстежених	Відносні зміни ТСМД у різні терміни спостереження ( $\Delta$ %)		
	1 міс	4 міс	8 міс
n = 40 очей (20 осіб)	- 8 %	- 12 %	- 42 %



Таблиця 3. Відносні зміни показників ( $\Delta$  %) ліпідного профілю у обстежених осіб

Показник	Обстежені хворі (n = 20 осіб)	
	До лікування	Через 8 міс
Вільний холестерин, ммоль/л	7,5 $\pm$ 0,2	+ 2,7
Ліпопротеїди, ммоль/л	1,9 $\pm$ 0,3	+ 17,4
високої щільності		
низької щільності	3,4 $\pm$ 0,1	+ 20,6

здатність блокувати синтез ферменту - альдозоредуктази, відновлювати ендотелій та активувати ядерні рецептори PPAR- $\alpha$ . Важливою властивістю фармакологічної дії основної речовини препарату також вважають здатність блокувати синтез VEGF-фактора та зменшувати активність проліферативних процесів у сітківці ока [12,13]. Тобто позитивна динаміка перебігу ДР з проявами ДМН у хворих на ЦД 2-го типу за оцінкою показників гостроти зору, ТСМД та ліпідних фракцій сироватки крові в умовах тривалого прийому мікронізованого фенотифрату, може відбуватися під його позитивним впливом на важливі ланки патогенезу ДР, що забезпечило необхідні передумови для відновлення важливих процесів життєдіяльності клітин сітківки.

**Н.Н. Веселовская**

### ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕТЧАТКИ НА ФОНЕ КОРРЕКЦИИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Исследовали функциональные изменения прижизненных морфологических показателей макулярной зоны сетчатки в условиях длительного действия фенотифрата у 20 ольных сахарным диабетом 2-го типа. Проведено динамическое наблюдение некоторых офтальмологических (острота зрения, толщина сетчатки макулярной области по данным оптической когерентной томографии) и системных (биохимические показатели содержания липидных фракций) функциональных показателей в условиях длительного применения этого препарата в течение 8 мес. За этот период наблюдали определенные положительные изменения морфофункционального состояния макулярной зоны сетчатки: повышение остроты зрения и уменьшение толщины сетчатки макулярной области с одновременным

улучшением липидного профиля в сыворотке крови: уменьшение содержания свободного холестерина и липопротеидов низкой плотности при повышении содержания липопротеидов высокой плотности.  
Ключевые слова: сахарный диабет; макулярный отек; липидные фракции крови.

**N.N. Veselovskaya**

### CHANGES OF LIFETIME MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF THE RETINA ON THE BACKGROUND OF CORRECTION OF LIPID METABOLISM IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

The functional changes of retina morphological parameters of macular zone were investigated under condition of long term action of fenofibrate, 145 mg in patients with diabetes mellitus type 2. Dynamic observation of certain ophthalmologic (visual acuity, macular thickness zone) and system functional parameters (lipid fractions content in serum) in long-term use of this medical drug in 20 patients with diabetes type 2 and DMO for 8 months. In this period we revealed some positive changes in the functional state of the macular area: increase of visual acuity, decrease of macula thickness and the improvement of the lipid profile in blood serum.

Key words: diabetes; macular edema; blood lipid fractions.

*Kyiv Medical University UAFM; Kyiv City Eye Center, KCH №1.*

### REFERENCES

1. Balashevich LI, Izmaylov AS, Brzheskiy VV. Ocular manifestations of diabetes. Saint Petersburg, MAPO, 2004; 123. [Russian].
2. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type I diabetes. Ophthalmology. 1998; (105): 1801.
3. Chaturvedi N, Sjolie AK., Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z, Fuller JH. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type I diabetes. The EUCLID

- Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet*. 1998; (351): 28.
4. UK Prospective Diabetes Study Group. UK Prospective Diabetes Study. XII: Differences between Asian, Afro-Caribbean and white Caucasian type 2 diabetic patients at diagnosis of diabetes. *Diabetes Medicine*. 1994; (11): 670.
5. Arbeneva NS, Patrina VV, Bratko GV, Chernykh VV, Sazonova OV. Experience of micronized fenofibrate in the proliferative diabetic retinopathy. *Bulletin of the Novosibirsk State University*. 2011; (4): 11–14. [Russian].
6. Veselovska NM. Risk factors for vascular pathology of eye in patients with diabetes. *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery*. 2013; (1): 42. [Ukrainian].
7. Stephenson JM, Fuller JH, Viberti GC, Sjolie AK. Blood pressure, retinopathy and urinary albumin excretion in IDDM: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*. 1995; (38): 599.
8. Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology*. 1991; (98): 1261.
9. Early Treatment Diabetes Retinopathy Study Research Group. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1991; (98): 1262.
10. Keating GM, Croom KF. Fenofibrate. A Review of its Use in Primary Dyslipidaemia, the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes mellitus. *Drugs*. 2007; (67): 121.
11. Diabetes Atherosclerosis Intervention Study Investigators. Effect of fenofibrate on progression of coronary artery disease in type 2 diabetes; The Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet*. 2001; (357): 905.
12. Wright AD, Dodson PM. Medical management of diabetic retinopathy fenofibrate and ACCORD Eye studies. *Eye*. 2011; (25): 843.
13. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007; (370): 1687.

*Матеріал надійшов до  
редакції 01. 09. 2016*

## М'язова втома: фактори розвитку та шляхи корекції

Т.Ю. Матвієнко<sup>1</sup>, Д.О. Заводовський<sup>1</sup>, Д.М. Ноздренко<sup>1</sup>, І.В. Міщенко<sup>2</sup>,  
О.П. Мотузюк<sup>2</sup>, К.І. Богуцька<sup>1</sup>, Ю.П. Скларов<sup>3</sup>, Ю.І. Прилуцький<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: prylut@ukr.net;

<sup>2</sup>Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк;

<sup>3</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

*Узагальнено літературні дані щодо аналізу фізіологічних і біохімічних механізмів розвитку м'язової втоми та шляхів її запобігання. Проаналізовано дію найбільш поширених ендогенних та екзогенних антиоксидантів на біохімічні процеси у стомленому м'язі. Показано, що біосумісні нетоксичні водорозчинні C<sub>60</sub>-фулерени як потужні антиоксиданти здатні виступати перспективними засобами для корекції розвитку втоми скелетних м'язів, в основі якої лежить деструктивна дія вільнорадикальних процесів.*

*Ключові слова:* скелетні м'язи; м'язова втома; вільні радикали; C<sub>60</sub>-фулерен.

М'язова втома як фізіологічний стан настає внаслідок напруженої або тривалої роботи і виражається у тимчасовому зниженні або повній втраті працездатності організму. Вона характеризується зменшенням сили скорочення і витривалості м'язів, порушенням координації рухів, збільшенням енерговитрат для виконання однієї і тієї самої роботи. Тому зменшення ефекту втоми скелетних м'язів за умов фізичних навантажень, особливо тих, що потребують витривалості, а також монотонних дій, які включають швидкі одноманітні повторні рухи, що призводить до постійного напруження (втоми) та є причиною розвитку хворобливої чутливості м'язів, є надзвичайно важливою терапевтичною проблемою.

### **Становлення фізіології м'язової втоми.**

Незважаючи на практичну важливість вирішення цього питання, поглиблене вивчення фізіологічних та біохімічних механізмів м'язової втоми має відносно недовгу історію. Перше таке дослідження було проведене швейцарським хіміком Берцеліусом, який виявив накопичення молочної кислоти у втомлених м'язах оленя [1]. Експерименталь-

© Т.Ю. Матвієнко, Д.О. Заводовський, Д.М. Ноздренко, І.В. Міщенко, О.П. Мотузюк, К.І. Богуцька, Ю.П. Скларов, Ю.І. Прилуцький

но показано, що в активно функціонуючих м'язах значення рН змінюється у бік закиснення. Швидка втома м'яза настає навіть тоді, коли нерв стимулюють струмом. На той час було зроблене припущення, що втома відбувається саме у м'язах, а не у центральній нервовій системі (ЦНС) [2]. Коли м'яз жаби (після стимуляції до значного розвитку втоми) одразу поміщали у розчин Рінгера, його скорочення відновлювалося, оскільки молочна кислота дифундувала з нього у розчин. М'язова втома впливає як на динаміку скорочення, так і на розслаблення м'яза. Експериментально доведено, що втомлений м'яз відновлюється швидше при додаванні кофеїну. Це відбувається завдяки тому, що останній полегшує вивільнення Ca<sup>2+</sup> із саркоплазматичного ретикулула (СР). Фізіологічне явище втоми, не охоплює одночасно і синхронно увесь об'єм м'яза, що виконує інтенсивну роботу. Так, швидкі м'язові волокна втомлюються в першу чергу.

### **Сучасні погляди на м'язову втому.**

Нині під терміном «м'язова втома» розуміють широкий спектр дисфункцій: фізіологічну, неврологічну і психіатричну [3]. Тому

пропонуються досить різнобічні концепції шляхів її розвитку [4], існування яких зумовлено тим, що у складному процесі, кінцевим результатом якого є зміна механокінетики скорочення м'яза, задіяний цілий комплекс механізмів порушення роботи ЦНС, дисфункцій периферичних нервів і безпосередньо самих м'язів. Усі механізми об'єднуються за результатом викликаних ними функціональних змін, а саме – неможливістю утримання необхідного рівня зусилля м'язом упродовж навантаження.

М'язова втома – це захисний механізм організму від перенавантажень, що призводить до розвитку больової чутливості м'язів [5–7]. Її якісне та кількісне вивчення є важливим фактором для цілеспрямованого формування адаптацій і підвищення рівня функціональних та фізичних можливостей організму. За інтенсивних фізичних навантажень для підтримання оптимального функціонування і нормального фізіологічного стану м'язів, що активно скорочуються, достатньо важливим є тривалість періодів їх відновлення (активного відпочинку) [8]. У процесі розвитку втоми спостерігається уповільнення генерації сили і розслаблення м'яза. Ось чому за втоми тетанус можна отримати за менших значень частоти стимуляції та розряду мотонейронів. У разі підтримування певного рівня сили на фоні зменшення частоти імпульсації одних мотонейронів відбувається залучення нових моторних одиниць. Таке зменшення частоти імпульсації є певною адаптацією до втоми. У досліджах *in vivo* виявлено важливу роль пригнічення активності мотонейронів м'яза за розвитку втоми. Автори припустили, що причиною зменшення аферентної активності мотонейронів втомленого м'яза є посилення пресинаптичного гальмування, що було підтверджено зменшенням частоти імпульсації мотонейронів при розтягуванні триголового м'яза литки на фоні формування його втоми [6, 9] та супутнього пригнічення активності мотонейронів у дузі стретч-рефлексу.

Цікавим є той факт, що під час активації

окремих волокон скелетного м'яза ефекти втоми спостерігаються у сусідніх з ними, які не були попередньо стимульовані. Вважається, що причинами цього ефекту можуть бути: дифузія метаболітів з активного м'язового волокна до неактивного; зниження ефективності нервово-м'язової передачі через стиснення моторних терміналей і зміни вмісту зовнішніх метаболітів; локальна гіпоксія внаслідок збільшення внутрішньом'язового тиску, що, в свою чергу, змінює збудливість м'язового волокна і його скорочувальну здатність [5, 6].

За допомогою методу реєстрації електроміограми вивчали координату центральних моторних команд, що надходили до м'язів руки людини за виконання складних двосуглобових рухів і створення ізометричного зусилля, та розвиток втоми у часі. Було показано, що рівень варіабельності міограми змінюється по-різному у різних обстежуваних. Це свідчить про те, що однакові рухи або статичні зусилля можуть бути реалізовані центральними командами з різним ступенем перерозподілу активності між м'язами та їх функціональними компонентами. Розуміння природи явища втоми скелетних м'язів є вкрай важливим для захисту організму людини від його побічних ефектів [10].

М'язове скорочення на молекулярному рівні описується загальновизнаною, з певними доповненнями, «cross-bridge» теорією [11]. Згідно з нею важливу роль у генерації сили за актин-міозинової взаємодії відіграють молекули АТФ, АДФ,  $H^+$  та  $F_n$  (неорганічний фосфат). У дослідженнях на окремих м'язових волокнах, зростання їх концентрацій інгібує скоротливий цикл [12]. Це ще раз підтверджує той факт, що в активно функціонуючих м'язах рівень рН змінюється у бік закиснення. Однак рівень впливу рН на розвиток втоми у скелетному м'язі, як виявилось, не є сталою величиною і залежить від температури: суттєво збільшується зі зменшенням фізіологічної температури (нижче від нижньої межі для гомойотермних тварин) [13]. Водночас дослідження з

міченими флуоресцентними білками молекул актину показали, що скорочення м'яза значно сповільнюється при ацидозі навіть за фізіологічних температур [14].

**Фактори розвитку м'язової втоми.**  
*Неорганічний фосфат.* У дослідженнях з використанням методу ядерного магнітного резонансу було виявлено, що одним з основних біохімічних факторів, що впливає на м'язову втому, є концентрація  $\Phi_n$ . На моделях ізольованих волокон скелетних м'язів кролів встановлено кумулятивну пригнічувальну дію накопичення  $\Phi_n$  (продукту гідролізу АТФ) на силову відповідь м'яза. У стані спокою концентрація АДФ у клітині досить низька (близько 10 мкмоль/л), оскільки функціональна активність креатинкінази спрямована на утворення АТФ. Однак під час інтенсивного скорочення концентрація креатинфосфату зменшується, а концентрація креатину, навпаки, зростає. Концентрація АДФ може сягати значення 1 ммоль/л, хоча, зазвичай, *in vivo* вона є меншою. Експериментально показано, що концентрація цитоплазматичного АТФ не опускається нижче ніж 60% від рівня, який є нормою у стані спокою, впродовж стимуляції м'яза або його фізичного навантаження [15]. Зауважимо, що ці дослідження були проведені або на цілому м'язі, або у його гомогенаті і тому відображають усередненні зміни у всіх типах волокон, незважаючи на відмінність біохімічних показників, пов'язаних зі способом енергозабезпечення і рівнем рекрутизації.

Загальний процес обміну фосфатного залишку між АТФ та креатинфосфатом можна записати таким рівнянням:  $\text{ФКр} + \text{АДФ} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Кр(креатин)} + \text{АТФ}$ . У міоциті цю біохімічну реакцію каталізує фермент креатинкіназа. Під час активного скорочення певний час концентрація АТФ є сталою, оскільки вона «працює» на підтримку її рівня. Але через деякий проміжок часу (прямо пропорційний інтенсивності функціонування м'яза) вміст АТФ починає зменшуватися,

паралельно з чим накопичується значна кількість креатину, яка не так сильно впливає на розвиток м'язової втоми, як утворення великих концентрацій фосфату [16].

Наростання концентрації креатинкінази та  $\Phi_n$  під час скорочення відбувається внаслідок вичерпання ресурсів креатинфосфату. Згідно з моделлю «ковзаючих філаментів», м'яза скорочується за рахунок енергії АТФ і після цього утворюються АДФ та  $\Phi_n$ . Вважають, що за великих концентрацій фосфат здатен інгібувати скорочення. Також показано, що за великих концентрацій  $\Phi_n$  відбувається редукція кальційактивованих струмів [17]. Dahlstedt з співавт. виявили, що для мишей з відсутньою креатинкіназою характерні високі значення концентрацій фосфату під час відпочинку, а кальційактивоване скорочення м'яза невтомлених нокаутних мишей є значно слабшим, аніж скорочення м'яза контрольних (інтактних) тварин. Це свідчить, що пригнічувальний вплив на розвиток м'язової сили має саме  $\Phi_n$ .

За останні роки встановлено, що зростаючі концентрації фосфату також впливають на розвиток втоми, модифікуючи функціонування саркоплазматичного ретикулула (СР) міоцитів. Виділяють декілька можливих механізмів такого впливу: за прямої дії фосфат може безпосередньо взаємодіяти з кальцієвими каналами, розташованими у СР, тримаючи їх відкритими та ідукуючи вихід кальцію. Це призводить до підвищення внутрішньоклітинного тетанічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Але тоді незрозумілими є дані, що нокаутовані за геном креатинкінази миші не проявляють такої зміни на ранніх стадіях втоми [19]; альтернативним шляхом впливу  $\Phi_n$  є інгібування поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ . Підвищений вміст фосфату може пригнічувати АТФ-залежне поглинання кальцію у СР. Спочатку це призводить до зростання викиду  $\text{Ca}^{2+}$  під час тетанічного скорочення, однак, за тривалого впливу він буде акумулюватися в інших органелах або зовсім покидати клітину і, таким чином, знижується сила тетанічного скорочення;



нарешті, можлива і  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{F}_n$ –преципітація. Фосфат може надходити до СР, зв'язуватися з кальцієм і, відповідно, не давати йому виходити із самого СР [19]. Але у цієї гіпотези є один недолік. Надлишок фосфату утворюється на початкових стадіях м'язової втоми, а зменшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  спостерігається доволі пізно. Крім того, на швидких волокнах мишей показано, що зменшення тетанічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  корелює зі зростанням  $\text{Mg}^{2+}$ , який швидше за все утворюється після розпаду АТФ [20]. Припускають, що фосфат надходить у клітину через аніонні канали, коли знижується вміст АТФ. Це пояснює, чому фосфат проникає у СР зі зменшенням концентрації АТФ і чому існує залежність між зростанням вмісту магнію і зменшенням тетанічного  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [21].

**Лактат.** Під час м'язового скорочення змінюється рівень рН – він може зменшитися на 0,5 одиниць. Показано, що є зв'язок між закисненням та зменшенням сили м'яза людини. Експерименти на окремих м'язових волокнах виявили, що вплив закиснення на ізометричну силу та швидкість скорочення. Встановлено, що м'яз може відновлюватися швидше, ніж значення рН повертаються до норми. Вплив закинення на розвиток втоми м'яза не є сталим: виявлено кореляцію між рівнем ацидозу і розвитком м'язової втоми за температури  $\leq 15^\circ\text{C}$  [13]. Максимальне пригнічення скорочення м'яза відбувалося за  $10^\circ\text{C}$ , а мінімальний вплив ацидозу виявили при  $30^\circ\text{C}$ . Проведені досліді на окремих м'язових волокнах [22] та цілих м'язах мишей [23] довели, що за  $30^\circ\text{C}$  закиснення мінімально впливає на скоротливу активність м'яза. Таким чином, за фізіологічних температур скорочення м'яза слабко залежить від наведених коливань рівня рН. Проте можливий альтернативний шлях впливу ацидозу на зміну силової відповіді м'яза – це енергетичний метаболізм. Відомо, що ключові ензими у глікогенолізі та гліколізі – фосфорилаза та фосфофруктокіназа – інгібуються кислим рН. Проте зменшення активності цих ферментів за м'язової втоми у людей не виявили [24]

як не було виявлено значного впливу на зазначені ензими зменшення загального рівня рН на 0,4 одиниці при  $28^\circ\text{C}$ . Отже, можна припустити, що на ці ферменти паралельно з ацидозом впливає інший фактор. Також існує теорія, яка ростує, що закиснення суттєво впливає на викид іонів кальцію із СР під час скорочення м'яза. Вважається, що зміщення значення рН в кислий бік впливає на ріанодинові рецептори і заважає внутрішньоклітинному викиду кальцію. Однак досліді на окремих м'язових волокнах не виявили жодних «збоїв» у деполяризаційно-індукованому викиді іонів кальцію із СР.

**Глікоген.** Фракція глікогену, що депонується у м'язах, є депо енергії, яка через ферментативне перетворення за фізичних навантажень стає джерелом глюкози, котра використовується у гліколізі [25]:  $\text{Глюкоза} + 2\text{НАД}^+ + 2\text{АДФ} + 2\text{F}_n \rightarrow 2 \text{ піруват} + 2\text{НАДН} + 2\text{H}^+ + 2\text{АТФ} + 2\text{H}_2\text{O}$ . Відновлення АТФ з АДФ використовується для актин-міозинової взаємодії у м'язі, який скорочується. Тож логічно припустити кореляцію розвитку втоми з вичерпанням запасів глікогену. Однак експериментальні дослідження заперечують цю гіпотезу, оскільки у стані м'язової втоми глікогену у м'язах залишається понад 50% від початкового рівня [26].

**Вільні радикали.** Найбільший вплив на розвиток м'язової втоми спричинюють вільні радикали. Спочатку це було підтверджено методом електронного парамагнітного резонансу на м'язах кролика, де реєстрацію вільних радикалів проводили до та після виснажливих навантажень. Пізніше з використанням спінових уловлювачів був виявлений вплив вільних радикалів на м'язову втому кінцівок людини. Показано, що фізичне навантаження індукує окиснення глутатіону, який не є ферментативною системою «боротьби» клітини з вільними радикалами, та призводить до загального зменшення його концентрації, збільшення маркерів ліпідної пероксидації, протеїнового карбонілювання та окиснення ДНК за розвитку м'язової втоми [22–28].

За нормального функціонування м'яза у ньому утворюються активні форми кисню (АФК), зокрема супероксид-аніон, перекис водню та гідроксильні радикали [29, 30]. Варто зазначити, що концентрація АФК зростає з тривалістю фізичного навантаження. Виявлено, що м'язи під час скорочення-розслаблення продукують окис азоту (NO). Також м'язові волокна здатні експресувати нейрональну NO-синтазу (nNOS), ендотеліальну (eNOS) або обидві ці форми [31]. Дані, отримані в експериментах з окремими м'язовими волокнами, свідчать про те, що фармакологічна блокада NO-синтази, або генетичне вимикання цього ферменту, не впливає на розвиток м'язової втоми [32]. Припускають, що окис азоту може викликати розвиток м'язової втоми за іншими механізмами, наприклад, через дію на кровоносні судини чи беручи участь у розвитку синдрому хронічної втоми та фіброміалгії [33, 34]. АФК здатні пошкоджувати усі елементи клітин та уражати тканини. Проте Andrade з співавт. [35] показали, що значне окиснення тканин м'яза екзогенним перекисом водню не призводить до змін у концентрації кальцію і навіть збільшує чутливість міофіламентів до кальцію. Така чутливість є оборотною.

Оскільки розвиток втоми м'яза спряжений зі збільшенням концентрації АФК, то клітинні антиоксидантні системи можна розглядати як компоненти захисної системи організму від біохімічних наслідків розвитку м'язової втоми. Кожна клітина організму має антиоксидантну ферментативну систему, яка складається з багатьох ланок і механізмів. До основних антиоксидантних ферментів відносять супероксиддисмутазу (СОД), глутатіонпероксидазу (ГП) та каталазу. Основне завдання СОД – утворювати із супероксиду пероксид водню і кисень. ГП і каталаза каталізують розпад пероксиду водню на воду і кисень. До допоміжних антиоксидантних ензимів відносять тіоредоксин, глутаредоксин та піроксиредоксин.

Серед неензиматичних антиоксидантів у

м'язових волокнах можна виділити глутатіон. Тканини, які найбільше потерпають від оксидативного стресу, містять значні концентрації цієї сполуки. Так, наприклад, концентрація глутатіону у волокнах 1-го типу на 400-600 % більша, ніж у волокнах 2б-типу [36]. Роль глутатіону у процесі руйнування АФК полягає в тому, що він здатен віддавати атом водню і, таким чином, відновлювати вільні радикали. Встановлено, що антиоксидантні ефекти є температурозалежними. Так, м'язова втома настає швидше за 37 °С, аніж за 22 °С. Антиоксидант, використаний у роботі Мооранар з співавт. [37], подовжував час настання м'язової втоми за 37 °С, не впливаючи на роботу м'яза за 22 °С. Відомими антиоксидантами є вітаміни С, Е та β-каротин. Однак, коли люди вживали збагачену на вказані нутрієнти їжу, не виявлено особливих змін у роботі м'язів [38].

Незважаючи на значну кількість тематичних наукових праць, дані щодо залежності накопичення АФК та активності таких ендогенних антиоксидантів, як каталаза, СОД, глутатіон за умов інтенсивного фізичного навантаження скелетного м'яза залишаються суперечливими [39, 40]. Ці розбіжності пов'язані, насамперед, з використанням різних видів фізичного навантаження, його інтенсивністю і тривалістю, нарешті, типу м'язових волокон, оскільки останнім притаманні специфічні метаболічні особливості та властивості антиоксидантної системи [41].

**Шляхи корекції розвитку втоми м'язів.** *N-ацетилцистеїн (НАЦ).* Відомою речовиною для ефективного інгібування розвитку м'язової втоми діафрагми та окремих м'язових волокон є НАЦ [42]. Цей препарат здатен пригнічувати розвиток м'язової втоми у 6 з 8 людей. За його інфузійного введення ефект реєстрували вже на 3-й хвилині досліду. Сила скорочення м'язів в експериментальній групі була на 15% вищою за контрольні значення.

*Кофеїн.* Однією з найпоширеніших речовин, що впливає на організм людини, є кофеїн. Відомо, що за помірної інтенсивності

навантажень м'язова втома настає у проміжку 30–60 хв. Кофеїн «працює» у цьому разі як енергогенна субстанція [26, 43–46]. Доведена перевага його перорального [47]. Однак, під час короткотривалого високоінтенсивного фізичного навантаження він демонстрував невисоку ефективність [48]. Водночас застосування структурного аналогу кофеїну теофіліну – показало приріст сили на 19%. Припускають, що кофеїн індукує зміни у м'язі на локальному рівні, можливо впливаючи на вивільнення кальцію з ріанодинових рецепторів [49]. Крім того, значного впливу кофеїну на дихальний обмін та вміст вільних жирних кислот у крові не виявлено [50, 51]. Також показано відсутність значного впливу кофеїну на використання м'язом глікогену [26, 52]. Водночас кофеїн з високою вірогідністю подовжує час настання м'язової втоми [48]. Ще одна його специфічна особливість – підвищення вмісту лактату в крові [53]. У дослідженнях з використанням кофеїну і теофіліну рівновага у співвідношенні  $\Phi_{\text{H}}/\text{фосфокреатин}$  зміщується у бік фосфокреатину, що, у свою чергу, «покрашує» енергетичне депо м'яза. Корекція кофеїном м'язової втоми може також бути опосередкована через вплив на іонний баланс. Експериментально доведено, що пероральне застосування кофеїну призводить до зменшення вмісту натрію у плазмі крові під час фізичних навантажень [54]. Це, ймовірно, є наслідком або меншого виходу натрію у позаклітинний простір, або його швидкого повернення у клітину. Використання кофеїну стимулює у ненавантажених м'язах роботу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази на поглинання натрію. Водночас він здатен впливати на роботу СР в ізольованих м'язових волокнах [55].

*Низькорівнева лазерна терапія.* Експерименти на тваринах та клінічні випробовування з використанням низькорівневої лазерної терапії (на основі червоного, інфрачервоного світла та змішаних хвиль) продемонстрували такі результати з вивчення м'язової втоми: покращення мікроциркуляції [56], підвищення

синтезу АТФ та стимулювання дихального ланцюга мітохондрії [57], зменшення концентрації АФК та активності креатинфосфокінази, активування синтезу антиоксидантів та білків теплового шоку [58, 59]. На лабораторних щурах з використанням лазерного випромінювання з червоною (655 нм) [60] та інфрачервоною (904 нм) [61] довжинами хвиль виявлено зменшення м'язової втоми приблизно на 13% порівняно з контролем.

*Пікногенол.* Одним з перспективних антиоксидантів, дія якого спрямована на нейтралізацію АФК, є пікногенол. Він здатний не лише підвищувати вміст як окисненого, так і відновленого НАД<sup>+</sup> у сироватці крові, але й безпосередньо збільшувати витривалість м'язів, відтермінуючи час настання втоми [62].

*Аденозин.* Аденозин є природним антиоксидантом. Доведено протекторну дію його та його похідних на тваринних моделях реперфузійної травми та за ішемії міокарда.

*Лактоферин.* Залізо зв'язуючий білок, подібний до трансферину, але з вищою афінністю до іонів заліза, особливо за кислих рН, що актуально для м'язової втоми, яка супроводжується ацидозом. Зв'язані білком іони заліза не здатні каталізувати вільнорадикальні реакції. Встановлено, що лактоферин запобігає вільнорадикальним процесам у легенях щурів.

*Аллопуринол.* Це синтетичний антиоксидант, який інгібує продукцію супероксид-аніона, пероксиду водню та сечової кислоти за допомогою синтезу оксипуринолу – інгібітора для ксантиноксидази як головного джерела утворення АФК. Добре зарекомендував себе у «боротьбі» з АФК ішемічного генезу на серцевому м'язі, нервовій тканині та шлунково-кишковому тракті.

*Дефероксамін.* Ця біоорганічна сполука пригнічує залізо залежну ліпідну переоксидацию та запобігає утворенню оксиду водню, супероксид-аніона, перекису водню.

*C<sub>60</sub>-фулерен.* Одними з найпотужніших антиоксидантів, які можна використати для корекції розвитку втоми скелетних м'язів,

є біосумісні водорозчинні  $C_{60}$ -фулерени [63, 64].  $C_{60}$ -фулерен являє собою молекулу майже сферичної форми діаметром 0,72 нм, поверхня якої вкрита п'яти – та шестикутниками, у вузлах яких міститься 60 атомів вуглецю, поєднаних між собою одинарними та подвійними хімічними зв'язками. Йому притаманна висока відновлювальна здатність – можливість приєднувати до шести електронів. Завдяки цій властивості  $C_{60}$ -фулерени та їхні похідні діють у біологічних системах як ефективні уловлювачі вільних радикалів, зокрема АФК, гіперпродукція яких призводить до виникнення багатьох патологій [65], включаючи ішемічні ушкодження травматичного генезу тонкої кишки [66] та ішемічно-реперфузійне ушкодження легень [67, 68]. Доведено, що  $C_{60}$ -фулерени нормалізують клітинний обмін речовин та нервові процеси, підвищуючи стійкість до стресу, посилюють активність ензимів і регенеративну здатність тканин, виявляють виражені протівірусну, протизапальну та антиалергенну дії [69, 70], ефективно регулюють АТФазну активність актоміозину [71]. Експериментально встановлено, що  $C_{60}$ -фулерени та їхні похідні можуть бути допоміжними засобами у комплексній терапії завдяки здатності інтенсифікувати захисні функції імунної та антиоксидантної систем організму людини [72–76]. Жодних токсичних ефектів чи летальних наслідків не було зафіксовано за досліджень дії  $C_{60}$ -фулеренів після їх перорального введення в організм щурів загального дозування 2 г/кг упродовж 14 днів [77].

Вищенаведені дані свідчать про реальну перспективу застосування водорозчинних  $C_{60}$ -фулеренів, антиоксидантна дія яких значно перевищує таку для відомих природних антиоксидантів – вітамінів С, Е і каротиноїдів [78–80] як потенційних агентів для підвищення ефективності функціонування скелетних м'язів людини модифікацією АФК-залежних механізмів, що відіграють важливу роль у процесів розвитку м'язової втоми.

**Т.Ю. Матвиенко<sup>1</sup>, Д.А. Заводовский<sup>1</sup>,  
Д.Н. Ноздренко<sup>1</sup>, И.В. Мищенко<sup>2</sup>,  
А.П. Мотузюк<sup>2</sup>, Е.И. Богуцкая<sup>1</sup>, Ю.П. Скларов<sup>3</sup>,  
Ю.И. Прилуцкий<sup>1</sup>**

## **МЫШЕЧНАЯ УСТАЛОСТЬ: ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ И ПУТИ КОРРЕКЦИИ**

Обобщены литературные данные по анализу физиологических и биохимических механизмов развития мышечной усталости и путей ее предотвращения. Проанализировано действие наиболее распространенных эндогенных и экзогенных антиоксидантов на биохимические процессы в утомленной мышце. Показано, что биосовместимые нетоксичные водорастворимые  $C_{60}$ -фуллерены как мощные антиоксиданты способны выступать перспективными средствами для коррекции развития усталости скелетных мышц, в основе которой лежит деструктивное действие свободнорадикальных процессов.

Ключевые слова: скелетные мышцы; мышечная усталость; свободные радикалы;  $C_{60}$ -фуллерен.

**T.Yu. Matvienko<sup>1</sup>, D.A. Zavadovskyi<sup>1</sup>, D.N. Nozdrenko<sup>1</sup>, I.V. Mishchenko<sup>2</sup>, O.P. Motuziuk<sup>2</sup>, K.I. Bogutska<sup>1</sup>, Yu.P. Sklyarov<sup>3</sup>, Yu.I. Prylutskyi<sup>1</sup>**

## **MUSCLE FATIGUE: FACTORS OF DEVELOPMENT AND WAYS OF CORRECTION**

The data regarding the analysis of the physiological and biochemical mechanisms of muscle fatigue and ways to prevent it are summarized. The effect of the most common endogenous and exogenous antioxidants in the biochemical processes in muscle fatigue was analyzed. It is shown that biocompatible, non-toxic water-soluble  $C_{60}$  fullerenes, which possess powerful antioxidative properties, promise great prospects in the correction of skeletal muscle fatigue caused by the destructive action of free radicals.

Key words: skeletal muscles; muscle fatigue; free radicals;  $C_{60}$  fullerene.

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: prylut@ukr.net;

<sup>2</sup>Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk;

<sup>3</sup>O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

## **REFERENCES**

1. Tipton MC. Exercise physiology: people and ideas. Amsterdam: Elsevier. 1993; 510 p.
2. Mosso A. Fatigue (1904). Whitefish: Kessinger Publishing. 2008; 348 p.
3. Dittner AJ, Wessely SC, Brown RG. The assessment of fatigue: a practical guide for clinicians and researchers. J Psychosom Res. 2004; 56(2): 157-70.



4. Boyas S, Guervel A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann Phys Rehabil Med.* 2011; 54(2): 88-108.
5. Kostyukov AI, Day S, Hellstrom F, Radovanovic S, Ljubisavljevic M, Windhorst U, Johansson H. Fatigue-related changes in electromyogram activity of cat gastrocnemius during frequency-modulated efferent stimulation. *Neurosci.* 2000; 97(4): 801-9.
6. Kostyukov AI, Kalezic I, Serenko SG, Ljubisavljevic M, Windhorst U, Johansson H. Spreading of fatigue-related effects from active to inactive parts in the medial gastrocnemius muscle of the cat. *Eur J Appl Physiol.* 2002; 86(4): 295-307.
7. Ervilha UF, Farina D, Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T. Experimental muscle pain changes motor control strategies in dynamic contractions. *Exp Brain Res.* 2005; 164(2): 215-24.
8. Harris RC, Sale C. Beta-alanine supplementation in high-intensity exercise. *Med Sport Sci.* 2012; 59: 1-17.
9. Kalezic I, Bugaychenko LA, Kostyukov AI, Pilyavskii AI, Ljubisavljevic M, Windhorst U. Fatigue-related depression of the feline monosynaptic gastrocnemius-soleus reflex. *J Physiol.* 2004; 556(Pt1): 283-96.
10. Lehedza AV, Gorkovenko AV, Vereshchaka IV, Dornowski M, Kostyukov AI. Comparative analysis of electromyographic muscle activity of the human hand during cyclic turns of isometric effort vector of wrist in opposite directions. *Fiziol Zh.* 2014; 61(2): 3-14.
11. Williams WO. Huxley's model of muscle contraction with compliance. *J Elasticity.* 2011; 105(1): 365-80.
12. Cooke R. Modulation of the actomyosin interaction during fatigue of skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2007; 36(6): 756-77.
13. Pate E, Bhimani M, Franks-Skiba K, Cooke R. Reduced effect of pH on skinned rabbit psoas muscle mechanics at high temperatures: implications for fatigue. *J Physiol.* 1995; 486(3): 689-94.
14. Debold EP, Beck SE, Warshaw DM. The effect of low pH on single skeletal muscle myosin mechanics and kinetics. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295(1): 173-9.
15. Walter G, Vandenborne K, Elliott M, Leigh JS. *In vivo* ATP synthesis rates in single human muscles during high intensity exercise. *J Physiol.* 1999; 519(Pt3): 901-10.
16. Westerblad H, Allen DG, Lännergren J. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci.* 2002; 17: 17-21.
17. Dahlstedt AJ, Katz A, Westerblad H. Role of myoplasmic phosphate in contractile function of skeletal muscle: studies on creatine kinase-deficient mice. *J Physiol.* 2001; 533(2): 379-88.
18. Dahlstedt AJ, Katz A, Wieringa B, Westerblad H. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of skeletal muscle deficient of creatine kinase. *FASEB J.* 2000; 14(7): 982-90.
19. Fryer MW, Owen VJ, Lamb GD, and Stephenson DG. Effects of creatine phosphate and Pi on Ca<sup>2+</sup> movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1995; 482(1): 123-40.
20. Allen DG, Lännergren J, Westerblad H. Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol.* 1995; 80(4): 497-527.
21. Ahern GP, Laver DR. ATP inhibition and rectification of a Ca<sup>2+</sup>-activated anion channel in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biophys J.* 1998; 74(5): 2335-51.
22. Westerblad H, Bruton JD, Lännergren J. The effect of intracellular pH on contractile function of intact, single fibres of mouse muscle declines with increasing temperature. *J Physiol.* 1997; 500(Pt1): 193-204.
23. Wiseman RW, Beck TW, Chase PB. Effect of intracellular pH on force development depends on temperature in intact skeletal muscle from mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271(3 Pt1): 878-86.
24. Bangsbo J, Madsen K, Kiens B, Richter EA. Effect of muscle acidity on muscle metabolism and fatigue during intense exercise in man. *J Physiol.* 1996; 495(Pt2): 587-96.
25. Nelson DL, Lehninger MC. Principles of biochemistry. New York: WH Freeman and company, 2008; 1158 p.
26. Greer F, Friars D, Graham TE. Comparison of caffeine and theophylline ingestion: exercise metabolism and endurance. *J Appl Physiol.* 2000; 89(5): 1837-44.
27. Barreiro E, Gea J, Di Falco M, Kriazhev L, James S, Hussain SN. Protein carbonyl formation in the diaphragm. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32(1): 9-17.
28. Tsakiris S, Parthimos T, Parthimos N, Tsakiris T, Schulpis KH. The beneficial effect of L-cysteine supplementation on DNA oxidation induced by forced training. *Pharmacol Res.* 2006; 53(4): 386-90.
29. Vasilaki A, Mansouri A, Remmen H, van der Meulen, JH, Larkin L, Richardson AG, McArdle A, Faulkner JA, Jackson MJ. Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell.* 2006; 5(2): 109-17.
30. Hasegawa A, Suzuki S, Matsumoto Y, Okubo T. *In vivo* fatiguing contraction of rat diaphragm produces hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(1-2): 349-54.
31. Stamler J, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 2001; 81(1): 209-37.
32. Abraham RZ, Miller CC, Reid MB. The contractile response to nitric oxide (NO) varies among skeletal muscle. *Endothelium.* 1995; 3: 108.
33. Nijs J, Meeus M, McGregor NR, Meeusen R, de Schutter G, van Hoof E, de Meirleir K. Chronic fatigue syndrome: exercise performance related to immune dysfunction. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37(10): 1647-54.
34. McIver K L, Evans C, Kraus RM, Ispas L, Sciotti VM, Hickner RC. NO-mediated alterations in skeletal muscle nutritive blood flow and lactate metabolism in fibromyalgia. *Pain.* 2005; 120(1-2): 161-9.
35. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from mouse. *J Physiol.* 1998; 509(Pt2): 565-75.
36. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M,



- Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1997; 272 (1 Pt2): 363-9.
37. Moopanar TR, Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar calcium sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J Physiol.* 2005; 564(Pt1): 189-99.
38. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc.* 1998; 57(1): 9-13.
39. Ji LL. Exercise sport science reviews: Exercise and oxidative stress: Role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev.* 1995; 23(1): 135-66.
40. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(3): 253-62.
41. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 222(3): 283-92.
42. Katz A, Hernández A, Caballero DM, Briceno JF, Amezcua LV, Kosterina N, Bruton JD, Westerblad H. Effects of N-acetylcysteine on isolated mouse skeletal muscle: contractile properties, temperature dependence, and metabolism. *Pflugers Arch.* 2014; 466(3): 577-85.
43. Trice I, Haymes EM. Effects of caffeine ingestion on exercise-induced changes during high-intensity, intermittent exercise. *Int J Sport Nutr.* 1995; 5(1): 37-44.
44. Pasman WJ, van Baak MA, Jeukendrup AE. The effect of different dosages of caffeine on endurance performance time. *Int J Sports Med.* 1995; 16(4): 225-30.
45. Graham TE, Spriet LL. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J Appl Physiol.* 1995; 78(3): 867-4.
46. Mohr T, van Soeren M, Graham TE. Caffeine ingestion and metabolic responses of tetraplegic humans during electrical cycling. *J Appl Physiol.* 1998; 85(3): 979-85.
47. Cohen BS, Nelson AG, Prevost MC. Effects of caffeine ingestion on endurance racing in heat and humidity. *Eur J Appl Physiol.* 1996; 73(3-4): 358-63.
48. Jackman M, Wendling P, Friars D. Metabolic, catecholamine, and endurance responses to caffeine during intense exercise. *J Appl Physiol.* 1996; 81(4): 1658-63.
49. Tarnopolsky MA, Cupido C. Caffeine potentiates low frequency skeletal muscle force in habitual and nonhabitual caffeine consumers. *J Appl Physiol.* 2000; 89(5): 1719-24.
50. Raguso CA, Coggan AR, Sidossis LS. Effect of theophylline on substrate metabolism during exercise. *Metabolism.* 1996; 45(9): 1153-60.
51. Graham TE, Helge JW, MacLean DA. Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 2000; 529(Pt3): 837-47.
52. Laurent D, Scheider KE, Prusaczyk WK. Effects of caffeine on muscle glycogen utilization and the neuroendocrine axis during exercise. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(6): 2170-5.
53. Chesley A, Howlett RA, Heigenhauser JF. Regulation of muscle glycogenolytic flux during intense aerobic exercise after caffeine ingestion. *Am J Physiol.* 1998; 275(2 Pt2): 596-603.
54. MacIntosh BR, Wright BM. Caffeine ingestion and performance of a 1500 meter swim. *Can J Appl Physiol.* 1995; 20(2): 168-77.
55. Kalmar JM, Cafarelli E. Effects of caffeine on neuromuscular fatigue. *J Appl Physiol.* 1999; 87(2): 801-8.
56. Tullberg M, Alstergren PJ, Ernberg MM. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. *Pain.* 2003; 105(1-2): 89-96.
57. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95(2): 89-92.
58. Avni D, Levkovitz S, Maltz L, Oron U. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(3): 273-7.
59. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Correa DS. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(7): 704-13.
60. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006; 101(1): 283-8.
61. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 108(6): 1083-8.
62. Mach J, Midgley AW, Dank S, Grant R, Bentley DJ. The effect of antioxidant supplementation on fatigue during exercise: potential role for NAD<sup>+</sup>(H). *Nutrients.* 2010; 2(3): 319-29.
63. Prylutska SV, Grynyuk II, Matyshevska OP, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Anti-oxidant properties of C<sub>60</sub> fullerenes *in vitro*. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2008; 16(5-6): 698-705.
64. Ritter U, Prylutsky YuI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, Marchenko OA, Naumovets AG. Structural features of highly stable reproducible C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2015; 23(6): 530-4.
65. Sun T, Xu Z. Radical scavenging activities of alpha-alanine C<sub>60</sub> adduct. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16(14): 3731-4.
66. Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J Surg.* 2000; 24(4): 450-4.
67. Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287(1): 21-6.
68. Lai YL, Murugan P, Hwang KC. Fullerene derivative

- attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. Life Sci. 2003; 72(11): 1271-8.
69. Cataldo F, Da Ros T. Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes. Berlin: Springer. 2008; 408 p.
70. Wilson SR. Biological aspects of fullerenes. Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology. 2000; 437-65.
71. Andreichenko KS, Prylutska SV, Medynska KO, Bogutska KI, Nurishchenko NE, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Effect of fullerene C<sub>60</sub> on ATPase activity and superprecipitation of skeletal muscle actomyosin. Ukr Biochem J. 2013; 85(2): 20-6.
72. Ashcroft JM, Tsyboulski DA, Hartman KB. Fullerene C<sub>60</sub> immunoconjugates: interaction of water-soluble C<sub>60</sub> derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody. Chem Commun. 2006; 28: 3004-6.
73. Prylutska SV, Burlaka AP, Prylutsky YuI. Pristine C<sub>60</sub> fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. Exp Oncol. 2011; 33(3): 162-4.
74. Prylutska SV, Burlaka AP, Klymenko PP. Using water-soluble C<sub>60</sub> fullerenes in anticancer therapy. Cancer Nanotechnol. 2011; 2(1-6): 105-10.
75. Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Prylutsky YuI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS. Application of C<sub>60</sub> fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. J Biomed Nanotechnol. 2015; 11(7): 1139-52.
76. Halenova TI, Vareniuk IM, Roslova NM, Dzerzhynsky ME, Savchuk OM, Ostapchenko LI, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C<sub>60</sub> fullerene against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in rats. RSC Adv. 2016; 6(102): 100046-55.
77. Mori T, Takada H, Ito S. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. Toxicology. 2006; 225(1): 48-54.
78. Wang IC, Tai LA, Lee DD. C<sub>60</sub> and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radicals-initiated lipid peroxidation. J Med Chem. 1999; 42(22): 4614-20.
79. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M. Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. Nano Lett. 2005; 5(12): 2578-85.
80. Xiao L, Takada H, Gan X, Miwa N. The water-soluble fullerene derivative «radicalsponge» exerts cytoprotective action against UV irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. Bioorg Med Chem Lett. 2006; 16(5): 1590-5.

Матеріал надійшов  
до редакції 18.10.2016

## ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



### До 75-річчя з дня народження Василя Максимовича Мороза

2 лютого 2017 р. виповнюється 75 років Василю Максимовичу Морозу – відомому нейрофізіологу, педагогу, організатору вищої медичної освіти, віце-президенту Українського фізіологічного товариства. В його особі на диво вдало і гармонійно сполучається численна кількість привабливих рис, котрі характеризують його як високо обдаровану людину, здатну різнобічно й щедро реалізувати свої творчі здібності.

Народився Василь Мороз 2 лютого 1942 р. у селі Озеро Немирівського району Вінницької області. Важким було його дитинство – як і в усього народу в часи війни, у роки відбудови господарства, знищеного, понівеченого війною. Батько, Максим Павлович, у 1944 р. загинув на фронті. У 1949–1956 рр. Василь Мороз навчався в Озерянській семирічній школі. А після семирічки для закінчення середньої освіти щодня за будь-якої погоди

прямував до Чуківської середньої школи Брацлавського району, яку закінчив у 1959 р. Вчився добре, навчання приносило радість. Мріяв, пізнавав світ не лише з життя, але й із улюблених книг. До вступу у 1961 р. до Вінницького медичного інституту працював у будівельній бригаді, робітником заводу. В інституті вчився старанно, з насолодою, поєднував теорію і практику, щоб краще підготуватися до практичної роботи. Після закінчення Вінницького медичного інституту (1967) працював лікарем-терапевтом Шпиківської лікарні № 1 Вінницької області. Заслужив шану, любов людей. У 1968 р. Василь Максимович був прийнятий на роботу до Вінницького медичного інституту ім. М.І.Пирогова на посаду асистента кафедри нормальної фізіології. Подальша його діяльність пов'язана з Вінницьким медичним університетом: асистент кафедри нормальної фізіології (1968 – 1969), аспірант цієї ж кафедри (1969 – 1972), асистент (1972 – 1976), доцент (1976 – 1984), професор (1984 – 1991), завідувач кафедри (1991 – 2015). Призначався вченим секретарем ради університету, заступником декана, деканом, проректором з навчальної роботи. На будь-якому посту, завдяки виключній працездатності, помноженій на природний талант організатора та педагога, проявив себе як висококваліфікований викладач-лектор, чудовий вихователь молоді. Ці риси характеру вдало поєднуються з властивістю до невпинного творчого пошуку.

У 1972 р. Василь Максимович в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР (м. Київ) захистив кандидатську дисертацію, яка була присвячена вивченню електричних реакцій кори мозочка на звукові стимули і йому було присуджено науковий ступінь кандидата медичних наук. Після захисту кандидатської дисертації науковий пошук не припиняється. Розгортаються багатопланові дослідження механізмів поведінкових реакцій, а саме

— ролі мозочка, базальних гангліїв, кори великих півкуль в організації та здійсненні автоматизованих рухів. Плідній реалізації творчих задумів сприяло відрядження за кордон, до Академії наук Чехословаччини. Згодом, якимось в приватній бесіді керівник Інституту фізіології, всесвітньо відомий нейрофізіолог Ян Буреш пригадував свій подив і захоплення з приводу надзвичайної наполегливості й працьовитості молодого науковця з Вінниці. Мабуть цим і можна пояснити гостинність маститого вченого — приватне повторне запрошення Василя Максимовича до Праги для остаточного завершення експериментів. Отриманий матеріал став основою докторської дисертації “Інтегративна функція мозочка, базальних гангліїв і моторної кори в програмуванні й регуляції рухів”, блискуче захищеної Василем Максимовичем у 1983 р. в Інституті фізіології АН УРСР ім. О.О. Богомольця.

Нині В.М.Мороз — видатний нейрофізіолог, під його керівництвом проводяться дослідження ролі структур головного мозку в здійсненні поведінкової реакції цілісного організму — центральні механізми програмування та контролю довільних рухів. Подальший творчий розвиток Василь Максимович здійснює в численних роботах разом з учнями, висвітлюється значення структур головного мозку — латерального гіпоталамуса, префронтальної (асоціативної) кори мозку (М.В.Йолтухівський), вентролатерального ядра таламуса, моторної кори (О.В.Власенко), базолатерального мигдалеподібного тіла (О.Д.Омельченко), гіпокампа (І.Л.Рокунець), вивчаються структурні особливості експресії гена *c-fos* у нейронах головного та спинного мозку під час реалізації оперантного рефлексу (О.В.Довгань), встановлюються фізіологічні особливості просторово-часових параметрів ходьби людини і залежність їх змін при виконанні додаткових завдань (М.В.Йолтухівський, Т.О.Величко, О.В.Богомаз). Так сформувалася наукова школа, очолювана професором Морозом.

Невпинно удосконалюються і збагачуються комплексні дослідження. У зв’язку з розробкою і запровадженням нових методичних прийомів та технологій, що мають пріоритетне значення (методи реєстрації електричних реакцій окремих нейронів мозкових центрів у вільній поведінці тварини під час руху, мікропроцесорного квантування рухів, а також імпульсних реакцій нейронів), розкриваються перспективи оцінки закономірностей мозкових функцій.

Важливим напрямком наукового пошуку є розробка проблем інтегративної медичної антропології, як науки про цілісність, мінливість і реабілітаційні можливості людини за рахунок адаптації. Для цього в університеті створено науково-дослідний центр, проголошений у 1993 р. базою Міжнародної академії інтегративної антропології, президентом якої обрано В.М.Мороза (1997).

Професор Мороз є членом Всесвітньої організації з вивчення мозку (IBRO), у 1995 р. обраний академіком Академії вищої школи, у 2010 — академіком Національної Академії медичних наук України. Він — автор 35 винаходів, опублікував 364 наукові праці, у тому числі 47 монографій та навчальних посібників, підготував 21 доктора і кандидата наук. Учні Василя Максимовича плідно працюють у ВНЗ України на наукових, педагогічних й адміністративних посадах.

В.М. Мороз — талановитий педагог, новатор у справі виховання майбутніх лікарів і молодих науковців. Його перу належить низка посібників для викладачів та студентів вищих та середніх медичних навчальних закладів, зокрема «Посібник з фізіології нервової системи» (2001), «Фізіологія сенсорних систем» (2006), «Фізіологія: навчально-методичний посібник» (2007), «Інтегративна функція мозочка, базальних гангліїв і моторної кори в програмуванні та регуляції рухів» (2010), два видання (2012, 2015) підручника для студентів вищих медичних навчальних закладів «Фізіологія», навчальний посібник для медичних і фармацевтичних ВНЗ «Фізіологія»



(2015), два видання (2011, 2016) підручника англійською мовою для студентів вищих медичних навчальних закладів «Physiology : Textbook».

Василь Максимович очолює спеціалізовану вчену раду Д 05.600.02 Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова, є редактором журналів “Вісник Вінницького медичного університету”, “Biomedical and biosocial anthropology”, “Медицина болю Pain Medicine”, заступник редактора журналу “Вісник Морфології”, член редакційних колегій “Фізіологічного журналу”, журналів “Медицина освіти”, “Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія”, “Проблеми медичної науки та освіти”, “Архів експериментальної та клінічної медицини”.

В університеті налагоджено контакти і співробітництво з медичними факультетами провідних ВНЗ зарубіжних країн з важливих питань для охорони здоров’я в Україні (Франція, Німеччина, США, Єгипет, Польща, Італія, СНД тощо); були отримані гранти фондів Спаркмана і Фогерті (США). На факультетах різної спеціалізації навчаються більш ніж 2000 іноземних громадян з 67 країн світу.

Стрімко зростає авторитет Василя Максимовича Мороза як талановитого керівника: він проводить активну громадську роботу, Голова ради ректорів ВНЗ Подільського регіону, голова асоціації медичних ВНЗ України, член колегії МОЗ України, член вченої ради МОЗ України, член атестаційної колегії МОН України.

Обирався (1990, 2010) депутатом Вінницької обласної Ради. З 1992 до 1994 рр. на громадських засадах працював заступником голови цієї ради. Як депутат Вінницької обласної Ради на її сесіях та засіданнях комісії порушував питання щодо вдосконалення правил прийому на навчання до ВНЗ, міжнародного співробітництва ВНЗ, сучасного стану вищої освіти в Україні, розвитку студентського самоврядування, працевлаштування випускників ВНЗ, залучення до навчання у ВНЗ дітей з сільської місцевості Вінниччини,

пілотного варіанту реформи охорони здоров’я у Вінницькій області тощо.

У 1993 р. В.М. Морозу присвоєно почесне звання Заслуженого працівника науки та техніки України. У 1997 р. Указом Президента України нагороджений орденом “За заслуги” III ступеня, у 2002 – орденом Ярослава Мудрого V ступеня. 24 серпня 2003 р. у День незалежності Указом Президента України за визначні особисті заслуги перед Українською державою у підготовці висококваліфікованих фахівців для охорони здоров’я, багаторічну плідну наукову, педагогічну і громадську діяльність В.М. Мороз удостоєний високого звання „Герой України” із врученням ордена Держави.

З ініціативи ректора Вінницький національний медичний університет з 1994 р. обрано центром проведення Пироговських читань, які є міжнародним оглядом усіх галузей вітчизняної і світової медицини. У 2010 р. проведені IV Міжнародні читання, присвячені 200-річчю від дня народження М.І. Пирогова. На читаннях були присутні майже 2500 делегатів-медиків з України і 28 зарубіжних країн.

Загалом, характеризуючи Героя України, доктора медичних наук, професора, академіка НАМН України, Заслуженого працівника науки та техніки України, ректора Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова – Василя Максимовича Мороза як педагога, вченого, керівника та просто справжню людину, підсумовуючи його напрацювання, можна стверджувати, що він є представником державних діячів, які творчо, попри всі негаразди, шукають шлях до швидкого засвоєння та втілення в життя найкращих світових досягнень розвитку вищої медичної школи, виховання сучасних молодих спеціалістів, раціонального використання досвіду минулих поколінь.

Сьогодні Василь Максимович повний сил та енергії, працює над втіленням нових ідей.

Бажаємо ювілярові міцного здоров’я, щастя, удачі, невичерпної енергії, творчої наснаги.





### **Життєвий та творчий шлях Макаренка Миколи Васильовича,**

доктора біологічних наук, професора, заслуженого діяча науки і техніки України  
(до 80-річного ювілею)

Народився Микола Васильович 6 лютого 1937 р. в селі Охіньки Чернігівської області. В цьому ж селі закінчив семирічну школу, а в с. Переволочна – десятирічну. Два роки працював завідувачем Охінківської сільської бібліотеки та заочно вчився в Ніжинському технікумі підготовки культурно-освітніх працівників. З 1956 по 1959 рр. – служба в ВМФ. В 1959 р. вступив і в 1963 р. з відзнакою закінчив Черкаський державний педагогічний інститут ім. 300-річчя возз'єднання України з Росією.

Після закінчення вузу М.В.Макаренко склав екзамени в аспірантуру Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН УРСР (директор – академік О.Ф.Макаренко) у лабораторію вищої нервової діяльності та типів нервової системи (керівник – учень академіка І.П.Павлова проф. В.О.Трошихін).

В 1966 р. після дострокового закінчення аспірантури та захисту кандидатської дисертації Президією АН був направлений на роботу в Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, де отримав посаду молодшого наукового

співробітника, і пропрацював в Інституті до 2011 р, займаючи різні посади: до 1969 р. – молодшим науковим співробітником в лабораторії В.О.Трошихіна, з 1969 по 1973 рр. – у лабораторії оживлення відділу гіпоксичних станів (завідувач – акад. М.М.Сиротинін), з 1973 по 1994 рр. – в лабораторії фізіології вищої нервової діяльності людини (з 1980 по 1994 рр. – її завідувачем), а з 1994 і до середини 2011 р. – провідним науковим співробітником відділу фізіології головного мозку.

У різні роки займав посади професора кафедри фізіології в Черкаському, Херсонському, Волинському університетах; посади старшого, провідного чи головного наукового співробітника у Військово-гуманітарному інституті, НДІ проблем військової медицини, Головному медичному управлінні СБУ, НДЦ (гуманітарних проблем) ЗС України, Українській військово-медичній академії, Національному НДІ оборонних технологій і воєнної безпеки України.

Напрямок наукової діяльності умовно можна розподілити на такі етапи. Перший – це вивчення вікових змін властивостей основних нервових процесів у дрібних лабораторних тварин за різних умов ендокринної і гуморальної регуляції (при гіпо- та гіперфункції залоз внутрішньої секреції). Другий – з'ясування ролі індивідуально-типологічних властивостей в компенсаторних реакціях на швидкість замикання тимчасових умовно-рефлекторних зв'язків та швидкості відтворення умовнорефлекторного стереотипу, серцево-судинної та дихальної систем у післяреанімаційний період собак після різних строків та видів клінічної смерті. Останній (третій) етап охоплює період близько 40 років діяльності і включає два вектори. Один із них – вивчення формування та становлення психофізіологічних функцій людини в онтогенезі, під час якого встановлено закономірності та особливості розвитку властивостей основних нервових процесів та сенсомоторної реактивності різного ступеня складності.

Нерівномірність формування різних за складністю психофізіологічних функцій дала змогу сформулювати концепцію структурно-функціональної гетерохронії розвитку, стабілізації і інволюції механізмів мозкової діяльності людини. Другий вектор – прикладний, який включає аспекти фізіології вищої нервової діяльності та диференціальної психофізіології і спрямований на вивчення індивідуальних відмінностей між людьми та їх роль в професійній діяльності і на цій основі розробка науково-обґрунтованих критеріїв і методик для професійного психофізіологічного відбору та профорієнтації, методик оцінки функціонального стану людини в різних умовах трудової діяльності, контролю і профілактики виникнення несприятливих зрушень у нервовій системі та їх корекції.

Протягом цього етапу розроблено низку методичних прийомів і апаратів для експрес-діагностики властивостей основних нервових процесів, сенсомоторної сфери, психофізіологічних і вегетативних функцій, особистісних властивостей людини. Це прилади ПНН-3-01 (прилад нервової напруги), ПНДО (прилад нейродинамічних обстежень), комп'ютерні системи «Славутич», «Прогноз», «Діагност-1», які нині застосовуються в різних країнах світу для вирішення як теоретичних проблем, так і в прикладних цілях. На методики з діагностування індивідуально-типологічних властивостей та рівня сенсомоторної реактивності людини отримано патенти на винахід. Створена та запроваджена в практику автоматизована методика виявлення психофізіологічного напруження операторів керування рухомими об'єктами.

М.В. Макаренком запропонована та науково обґрунтована нова типологічна властивість нервової системи людини – функціональна рухливість основних нервових процесів. Вона характеризується максимальною швидкістю чи максимальною кількістю переробки розумової інформації різного ступеня складності з диференціювання позитивних і так званих негативних умовних сигналів у заданому ліміті часу

і є інтегральним показником всіх швидкісних можливостей нервової системи: сприйняття сигналу, його аналізу, прийняття рішення на його виконання, видачі команди і її реалізація в ефektorних реакціях, що зумовлене не тільки швидкісними процесами у периферичній нервовій системі, а, що саме важливо, особливостями функціонування центральних коркових структур, їх аналітико-синтетичною діяльністю. Методика з виявлення цієї властивості пройшла апробацію на надійність та валідність, генетичну зумовленість (близнюковим методом) і вважається загально визнаною.

На льотчиках випробувачах та льотчиках цивільної авіації, радіотелеграфістах, операторах десантних кораблів та наземних транспортних засобів, операторах енергосистем та спецконтингенту, курсантах військово-морських та авіаційних училищ, спортсменах різних видів спорту і кваліфікації та студентах вузів, учнях середньої школи, технікумів і ліцеїв доказано, що функціональна рухливість та сила основних нервових процесів є базовими властивостями в забезпеченні сомато-вегетативних і психомоторних функцій, а також навчальної, професійної та спортивної діяльності. Саме ці властивості є найбільш імовірною фізіологічною передумовою у відмінностях між людьми.

Результати наукової діяльності представлені більш ніж у 360 працях, в т.ч. 6 монографіях з проблем реанімації, професійного відбору, психофізіології операторської праці та методик вивчення індивідуальних психофізіологічних відмінностей між людьми, онтогенезу психофізіологічних функцій; 2 брошурах з питань розвитку радянської космонавтики та відбору першого загону космонавтів; у 10 патентах на винахід і авторських свідоцтвах; 9 раціоналізаторських пропозицій. Під його керівництвом підготовлено 10 докторів і 26 кандидатів наук, які працюють в різних країнах світу. За монографію «Психофизиологические функции человека и операторский труд» Президія академії наук України в 1992 р. присудила йому звання

лауреата премії імені О.О.Богомольця.

Громадська діяльність – академік Аеро-космічної Академії, член Президії Українського товариства фізіологів ім. І.П.Павлова, член редколегії та редакційних рад журналів «Физиология человека РАН», «Фізіологічний журнал НАН України», «Гуманітарний вісник Збройних Сил України», «Збірник наукових праць МО Військового гуманітарного інституту Національного університету оборони», а також наукових вісників різних державних університетів України. Був членом спеціалізованої вченої ради з захисту докторських і кандидатських дисертацій Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця, при Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка, Інституті психології ім. Г.С.Костюка НАПН України, в Національному університеті оборони України; член Наукової ради НДЦ гуманітарних проблем ЗС України, член Президії бюро Федерації космонавтики України та ін. В 2001 р. в Охніківській середній загальноосвітній школі за власні кошти заснував благодійно-заохочувальний фонд Миколи Макаренка, метою якого є розвиток благодійництва, утвердження гуманізму та милосердя в суспільстві, сприяння розвитку освіти та науки, виявлення серед школярів талановитої творчої молоді.

За роки роботи в Інституті фізіології та в НДЦ, де нині працює на посаді провідного

наукового співробітника відділу військово-психологічних досліджень, відзначений грамотами і подяками. У 1983 р. нагороджений медаллю «В пам'ять 1500-річчя Києва», в 1988 р. рішенням Президії бюро Федерації космонавтики СРСР – медаллю імені академіка С.П.Корольова, від імені Президії Верховної Ради СРСР в 1990 р. – медаллю «Ветеран праці», в 1990 р. відповідно до постанови Державного Комітету Ради Міністрів СРСР з справ винахідництва – нагрудним знаком «Изобретатель СССР», в 1998 р. – Президентом України – медаллю Жукова, в 2004 р. за заслуги з відродження духовності в Україні та утвердження Помісної Української Православної Церкви – орденом Святого Рівноапостольного князя Володимира Великого III ступеня, Наказом Міністра оборони України в 2006 р. нагороджено медаллю «15 років Збройним Силам України» та нагрудними знаками «Науково-дослідний центр гуманітарних проблем ЗС України» і «Національний університет оборони України». Наукові праці М.В.Макаренка отримали високу оцінку – указом Президента України (2008) удостоєний звання – «Заслужений діяч науки і техніки України».

Учні, друзі, колеги та редакція «Фізіологічного журналу» сердечно вітають Миколу Васильовича Макаренка з ювілеєм і бажають міцного здоров'я і багато років плідної творчої праці.

## CONTENTS

L.A. Mys, A.Yu. Budko, N.A. Strutynska, V.F. Sagach. Pyridoxal-5-phosphate restores hydrogen sulfide syntheses and redox state of heart and blood vessels tissue in old animals	3
O.P. Khapitska, A.A. Ivanytsya, I.S. Stefanenko, L.A. Sarafinyuk, V.M. Moroz. Changes in rheographic indicators of shin in athletes of different kinds of sports	10
O. Linnik, O. Gonchar, V. Nosar, T. Drevytska, O. Kovalyov, I. Mankovska. Effect of curcumin on mitochondrial function of cardiomyocytes with doxorubicin-induced oxidative stress	17
T.M. Falalyeyeva, I.V. Leschenko, T.V. Beregova, L.M. Lazarenko, O.M. Savchuk, L.M. Sichel, O.I. Tsyryuk, T.B. Vovk, M.Ya. Spivak/ Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity	26
N.V. Grygorieva, V.V. Povoroznyuk, I. V. Gopkalova, T. V. Orlyk. Age and sex features of bone mineral density and bone mineral content indices in wistar rats	33
Ye.I. Dubovyk, V.Yu. Harbuzova, O.A. Obukhova, A.V. Ataman. Analysis of $\gamma$ -glutamyl carboxylase gene rs2592551 polymorphism association with ischemic atherothrombotic stroke	43
N.G. Grushka. The effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline on death of immune cells under immune complex-mediated injury in mice	51
A.V. Shkuropat, O.O. Tarasova. Changes of normalized spectral power of electroencephalogram rhythms of hard-of-hearing children and teenagers	60
I.L. Cheresnnyuk, O.I. Alchuk, L.I. Marynych, R.A. Kravets, A.O. Ivanitsa, O.A. Khodakovskiy Effect of NMDA-receptor blockers on the dynamics of intraocular pressure in rabbits	69
I.V. Fishchenko, D.O. Zavodovskiy, O.M. Motuzuyk, T.Yu. Matvienko, D.N. Nozdrenko. Diprospan, longidaza and their combined action against fibrosis caused by mechanical injury of the intervertebral discs in rats.	77
A.V. Tkachev, V.I. Sheremeta, O.L. Tkacheva, V.I. Rossokha. Physiological relationship of erythrocyte antigens with indicators of horse spermogram	84
N.N. Veselovskaya. Changes of lifetime morphological parameters of the retina on the background of correction of lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus	91

## REVIEWS

T.Yu. Matvienko, D.A. Zavodovskiy, D.N. Nozdrenko, I.V. Mishchenko, O.P. Motuziuk, K.I. Bogutska, Yu.P. Sklyarov, Yu.I. Prylutsky. Muscle fatigue: factors of development and ways of correction	95
--	----