

Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 4 2016

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Sydorenko V.G., Komarov O.S., Sushko B.S., Romanov A.K., Isaeva E.V., Isaev D.S.</i> Modulation of 4-aminopyridine-induced neuronal activity and local pO ₂ in rat hippocampal slices by changing the flow rate of the superfusion medium	3
<i>Осипчук Д.В., Чернишов В.П., Чернишова Л.І., Кисіль Н.П., Донської Б.В., Матвієнко І.М., Родіонов В.П., Маковська Ю.А.</i> Знижена відповідь натуральних кілерних лімфоцитів на стимуляцію Toll-подібного рецептора 3 у дітей, які часто хворіють	12
<i>Ziablitshev S.V., Pishchulina S.V., Kolesnikova S.V., Boris R.N., Yuzkiv Ya.S.</i> Disorders of carbohydrate metabolism in experimental brain injury	18
<i>Колесова Н.А., Натрус Л.В., Брюзгіна Т.С., Литвиненко В.І., Сухарева Н.М., Чухрай С.М.</i> Патологічні зміни серця за умов моделювання судомного синдрому різної етіології	23
<i>Уретій С.І., Коцюруба А.В., Кон'як Б.С.</i> Підвищення рівня спряження конститутивних NO-синтаз і вмісту гемоглобіну в еритроцитах старих тварин залізовмісним фітопрепаратом	31
<i>Малєєва Г.В., Булдакова С.І., Брежестовський П.Д.</i> Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів під дією гінкголевої кислоти	40
<i>Лісуха Л.М., Березовський В.Я.</i> Вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії на серцево-судинну систем дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях	46
<i>Соколенко В.Л.</i> Вплив психоемоційного навантаження на показники імунної системи в осіб, що проживали на територіях, забруднених радіонуклідами	53
<i>Гавриленко Т.І., Рижкова Н.О., Пархоменко О.М.</i> Залежність вмісту мієлопероксидази плазми крові від функціонального стану нейтрофілів у хворих на гострий інфаркт міокарда	60

<i>Фекета В.П., Глеба Л.А., Паламарчук О.С., Савка Ю.М., Ківежді К.Б.</i> Варіабельність серцевого ритму у здорових осіб за умов діафрагмального дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку	66
---	----

<i>Єфіменко Н.В., Сибірна Н.О.</i> Вплив системи L-аргінін – NO на про- та антиоксидантну рівновагу в еритроцитах щурів за умов алкогольної інтоксикації	76
---	----

ОГЛЯДИ

<i>Єгорова О.В., Максимюк О.П., Фісюнов О.І., Кришталь О.О.</i> Потенціалкеровані кальцієві канали: класифікація та фармакологічні характеристики (частина І)	84
--	----

<i>Гарматіна О.Ю.</i> Інсуліноподібний фактор росту 1 за умов судинної патології головного мозку	95
---	----

ЮВІЛЕЇ

Рибальченко Володимир Корнійович. До 75-річчя з дня народження	103
--	-----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ

<i>Березовський В.Я.</i> ІХ Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини»	105
--	-----

РЕЦЕНЗІЯ

Рецензія на монографію Н.О. Сибірної, А.І. Шевцової, Г.О. Ушакової, І.В. Бродяк та І.Ю. Письменецької “Основи глікобіології” за ред. проф. Н.О. Сибірної. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2015. - 492 с. – (Серія “Біологічні студії”)	109
---	-----

Modulation of 4-aminopyridine-induced neuronal activity and local pO_2 in rat hippocampal slices by changing the flow rate of the superfusion medium

V.G. Sydorenko, O.S. Komarov, B.S. Sushko, A.K. Romanov, E.V. Isaeva, D.S. Isaev

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

The brain slice preparation is the most frequently used tool for testing of pharmacological agents on the neuronal excitability. However, in the absence of blood circulation in vitro, the tissue oxygenation strongly depends on the experimental conditions. It is well established that both hypoxia as well as hyperoxia can modulate the neuronal network activity. Thereby changes in tissue oxygen level during experiment may affect the final result. In the present study we investigated the effect of oxygenation on seizure susceptibility in the hippocampal slice preparation using 4-aminopyridine (4-AP) model of ictogenesis in immature rats. We found that changing the medium perfusion rate in the range of 1-5 ml/min greatly affects the tissue oxygenation, amplitude and frequency of 4-AP-induced synchronous neuronal activity. The decrease in the flow rate as well as substitution of the oxygen in the extracellular medium with nitrogen causes a strong reduction of 4-AP-induced synchronous neuronal discharges. Our results demonstrate a significant linear correlation between the power of 4-AP-induced neuronal activity and the oxygen level in slice tissue. Also we demonstrated that the presence of medium flow is a necessary condition to support the constant level of the slice oxygenation. These data suggest that the oxygen supply of the brain slice strongly depends on experimental protocol and could modulate in vitro neuronal network excitability which should be taken into consideration when planning epilepsy-related studies.

Key words: brain slices; synchronous neuronal activity; oxygen; local field potential.

INTRODUCTION

Acutely isolated brain slices have been introduced for the study of seizure-like activity several decades ago [1] and remained a widely used research object [2,3]. The tissue oxygenation and energy supply in the brain slice preparation differ from that in the intact brain, where vascular system supplies oxygen and nutrients to nervous cells to support its normal activity [4,5]. Due to the absence of the functional vascular system in the brain slices, oxygen delivery to the neuronal tissue is limited by its diffusion from the extracellular environment and may depend on experimental conditions [6].

For testing of pharmacological agents on neuronal excitability in the brain slice preparation researchers most frequently use a

submerged chamber. In this type of chamber the oxygen tension strongly depends on oxygen concentration at the “medium-slice” border and decreases with the distance from the slice surface. Recent studies reported that the ability of neuronal network to generate of the pharmacologically-induced gamma oscillation (30-100 Hz) in submerged slices depends on the flow rate [7]. High-resolution measuring of a local partial pressure oxygen (pO_2) *in vitro* during gamma oscillations shows more than 2-fold increase in the oxygen consumption rate compared with a spontaneous asynchronous neuronal network activity [8]. Slow diffusion of the oxygen into tissue may lead to the strong decreasing the oxygen level in the slice core. Lower oxygenation resulted in the decrease of the local field potentials and spontaneous

network activity as well as in the significant modulation of short-term synaptic plasticity [8]. On the other hand, hypoxia and anoxia conditions may play a substantial role in the induction of synchronic network oscillation and may cause “hypoxia-induced” epileptiform seizures in the newborns that occur in various conditions [9,10]. Unlike adults, in newborns these seizures are often refractory to medical treatment and may lead to epileptogenesis. The mechanisms underlying the increased seizure susceptibility of the immature brain to hypoxia are not clear.

The aim of the present study was to investigate the effect of perfusion rate and the level of oxygen in extracellular environment on pharmacologically induced synchronous neuronal activity in submerged brain slices dissected from immature rats. To induce the epileptiform activity we used the specific antagonist of voltage-gated potassium channel, 4-aminopyridine (4-AP), which was shown to reliably induce prolonged seizures-like activity in brain slices and frequently used as a tool for testing potential therapies of pharmacoresistant seizures in acute slice preparation.

METHODS

Hippocampal slices preparation.

All procedures used in this study were approved by the Animal Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology. Briefly, Wistar rat pups at postnatal day 10-12 were anesthetized with inhalation of isoflurane and decapitated. The brain was removed and placed in the ice-cold oxygenated (95% O_2 /5% CO_2) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) of the following composition (in mM): NaCl 126; KCl 3.5; $CaCl_2$ 2.0; $MgCl_2$ 1.3; $NaHCO_3$ 25; NaH_2PO_4 1.2; and glucose 11 (pH 7.4). Sagittal hippocampal slices (500 μm) were cut using a vibroslicer (NVSL, World Precision Instrument) and kept before recordings for at least an hour at room temperature (22-24°C) in a submerged chamber containing oxygenated ACSF.

Electrophysiological recordings.

Extracellular field potential recordings were performed using patch pipettes made from borosilicate glass capillaries and filled with ACSF. Pipette resistance was ranged from 1-3 M Ω . Recordings were made from CA1 pyramidal cell layer of hippocampus. Signals were amplified using AC differential amplifier (A-M Systems, Carlsborg, WA) (bandpass 0.1 Hz -1kHz; $\times 100$), digitized (10 kHz) online with an analogue-to-digital converter (NI PCI-6221, National Instruments, Austin, TX) and stored on a computer using WinWCP 4.05 (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, UK).

Oxygen Measurements.

Oxygen was measured 100-150 μm above the slice surface or within slice tissue using Clark-style microelectrodes fabricated in our laboratory from glass capillary tube (outer diameter 1.5 mm), platinum wire ($\sim 10 \mu m$ diameter) and home-made polarographic amplifier. Before each experiment the oxygen sensor was calibrated in the recording chamber. The oxygen sensor was polarized by square pulses (at -800 mV, duration 1 s, and frequency 0.1 Hz). Changes in the pO_2 was determined as the difference in the current amplitude recorded in the oxygen-saturated ACSF (bubbled with 95% O_2 /5% CO_2), oxygen-free ACSF (bubbled with 95% N_2 /5% CO_2) and oxygen-free 1 mM Na_2SO_3 dissolved in non-bubbled ACSF at 2 ml/min medium flow rate. During experiments, ACSF bubbling with 95% N_2 /5% CO_2 was used to substitute the oxygen from medium. Changes in the medium flow rate did not affect the oxygen level in the recording chamber (Fig. 1A). In all experiments the oxygen-current amplitude was normalized to the current amplitude measured in oxygen-saturated ACSF at 2 ml/min flow rate.

The oxygen electrode was positioned in hippocampal CA1 region at the proximity to field potential recording electrode (Fig. 1B). Fig 1C demonstrated that the level of oxygen is gradually decreased with the immersion of

oxygen electrode into slice tissue. At 2 ml/min medium flow the relative oxygen level at 100 μm depth was $21 \pm 5\%$, which corresponds to normoxic conditions. So all recordings of the electrical activity and pO_2 was performed at this depth.

Statistical analyses

Off-line analysis of the recordings was performed using Clampfit 9.5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and Origin 8.0 (Microcal corp, Northampton, MA) software. Data are presented as mean \pm SE. Datasets were compared by investigator “blinded” to experimental conditions. Statistical analysis was performed using paired Student’s t-test. Pearson’s product–moment correlation coefficient was used to estimate dependence between two variables.

Power spectrum of synchronous network oscillations were calculated by fast Fourier

transformation (Bartlett window, FFT bin size 0.1 Hz) for 60 s data segments each at three perfusion rate: a) 2 ml/min (control condition), b) 5 ml/min and c) 1 ml/min. In experiment with a constant flow rate and non-perfusion chamber, 60 s data segments were analyzed at 10 min (control condition) and 30 min after 4-AP application. For comparison of power spectrum at different perfusion rate, the sum of the power of the bins from 1 to 30 Hz was calculated and normalized to the control conditions.

RESULTS

Epileptiform activity was induced by application of 4-AP and both field potentials and slice oxygen levels were measured in pyramidal CA1 region of hippocampus in slices prepared from P10–12 rats. 4-AP (50 μM) applied at 2 ml/min perfusion rate evoked synchronous neuronal

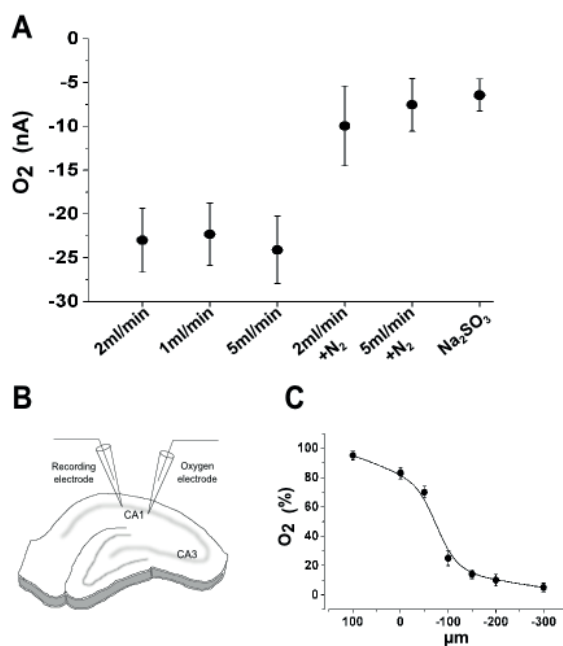


Fig.1. Dependence of the oxygen level on the flow rate and slice depth. (A) Measurement of oxygen level in the submerged-type slice chamber at different perfusion rates in ACSF saturated with 95% O₂/5% CO₂, ACSF saturated with 95% N₂/5% CO₂ or 1 mM Na₂SO₃ dissolved in 0.9 % NaCl. (B) Schematic illustration showing position of recording and oxygen electrodes on the hippocampal slice. (C) Oxygen depth profile in the hippocampal slice tissue recorded at 2 ml/min perfusion rate. Values are \pm SEM

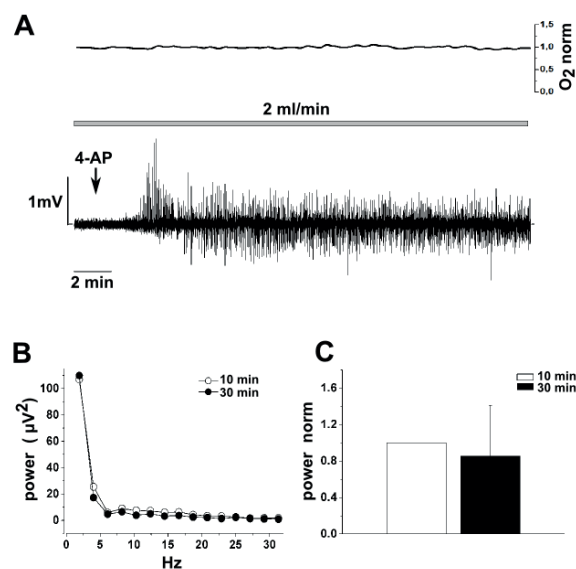


Fig.2. Synchronous network oscillations induced by 4-AP and oxygen level in hippocampal CA1 pyramidal region of slices maintained in a submerged-type chamber. (A) Original recording of 4-AP-induced synchronous neuronal activity (bottom) and oxygen level (top) at 2 ml/min perfusion rate. (B) Power of synchronous oscillations presented on A at the frequency band between 0 and 30 Hz (60 sec segment) at 10 min and 30 min after application of 4-AP. (C) Cumulative histogram of power spectrum of synchronous activity under constant perfusion rate at 10 min and 30 min after application of 4-AP. Values are \pm SEM

discharges within a few minutes (Fig. 2A, bottom trace). The level of slice oxygenation did not change during the recording (Fig. 2A, top trace). The stability of synchronous oscillations was estimated using power spectrum analysis (Fig. 2B). Cumulative data from 6 recordings demonstrates that synchronous neuronal activity became stable within a few minutes after application of 4-AP: the power of synchronous oscillations at the frequency band between 0 and 30 Hz at 10 min and 30 min after application of 4-AP was not significantly different (Fig. 2C, $n = 6$, $P = 0.08$, paired Student's t -test).

Figure 3 demonstrates the level of slice oxygenation and 4-AP-induced synchronous activity in slice perfused at different flow rates. At 1, 2 and 5 ml/min medium flow rate, the average power of synchronous discharges was $97.1 \pm 17.2 \mu\text{V}$, $104.8 \pm 23.7 \mu\text{V}$ and $156.1 \pm 28.1 \mu\text{V}$, respectively ($n = 10$). There was a significant difference in the power of synchronous neuronal

activity recorded at 2 ml/min and 5 ml/min perfusion rate (Fig. 3C, $P = 0.009$, paired Student's t -test). The decrease of the perfusion rate from 2 ml/min to 1 ml/min did not result in the change of the power of synchronous discharges (Fig. 3C, $P = 0.37$, paired Student's t -test). Figure 3D demonstrates the level of slice oxygenation at the different rates of medium perfusion. We observed an insignificant decrease of the slice oxygen level at 1 ml/min flow rate ($67 \pm 19\%$, $n = 10$, $P = 0.054$, paired Student's t -test) and the increase of the level of slice oxygenation to $226 \pm 35\%$ at 5 ml/min ($n = 10$, $P = 0.012$, paired Student's t -test) compared to the slice oxygen level recorded at 2 ml/min flow rate.

To test whether the presence of a medium flow is a necessary condition to support the constant level of the slice oxygenation, the experiment presented in Fig. 2A was performed in the modified submerged type chamber,

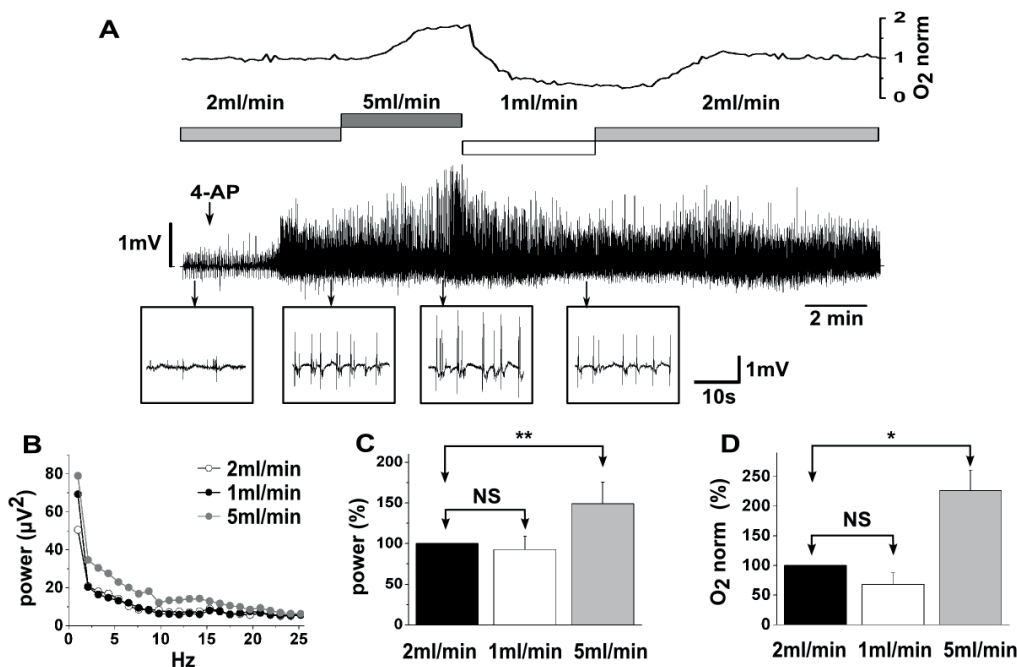


Fig. 3. Synchronous network activity and oxygen level recorded in pyramidal CA1 region strongly depend on the perfusion rate. (A) Raw recording of 4-AP-induced synchronous network oscillations (bottom) and oxygen level (top) at 1, 2 and 5 ml/min perfusion rate (indicated by horizontal bars). Inset boxes indicate the field potential recordings on expanded scales. (B) Power spectrum of field potentials presented on A at the frequency band between 0 and 30 Hz at different flow rates. The average power of synchronous activity (C) and level of slice oxygenation (D) at different flow rates. Values are \pm SEM. Statistical comparisons were performed using Student's t -test * $P < 0.05$

which provides a saturation of the medium by oxygen without a flow superfusion (Fig. 4A). Modified submerged-type slice chamber has no perfusion ports for extracellular solution. Oxygen saturated gas mixture comes directly to the chamber through holes in the tube located around the perimeter of the chamber. Slices were placed on the nylon mesh which provides a better slice oxygenation. The slices were dipped in oxygen-saturated ACSF containing 50 μM 4-AP. The level of oxygen in these experiments was measured in the medium at a distance of 100–150 μm above the slice surface and at 100 μm slice depth. While the level of oxygenation in the medium during recording was constant, the oxygen level in the slice was gradually decreased ($n = 5$, $P = 0.03$, paired Student's t -test, Fig. 4B, C). The power of synchronous network oscillations induced by application of 4-AP also decreased during recording time (Fig. 4D). An average power of synchronous neuronal discharges was significantly different at 10 min

and 30 min after application of 4-AP (Fig. 4E, $n = 5$, $P = 0.0006$, paired Student's t -test).

Next we examine the effect of 4-AP on neuronal network activity in anoxic conditions. The simple hypoxia (anoxia) in hippocampal slices was achieved by substitution of oxygen-saturated (95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2) for oxygen-free (95% $\text{N}_2/5\%$ CO_2) gas mixture. Oxygen deprivation led to the rapid decrease in the 4-AP-induced neuronal activity recorded at 2 ml/min flow rate. In the condition of oxygen deprivation, the increase of the perfusion rate to 5 ml/min resulted in a further drop of the power of synchronous neuronal activity (Fig. 5A). An average power of synchronous neuronal activity was significantly lower at 2 ml/min in oxygen-zero ACSF (Fig. 5B, dark-gray, $n = 6$, $P = 0.003$, paired Student's t -test) compare to the recordings in oxygen-saturated conditions. Changing the medium flow rate from 2 ml/min to 5 ml/min in oxygen-zero ACSF led to further decrease in the power of synchronous activity (Fig. 5B, light-gray, $n = 5$,

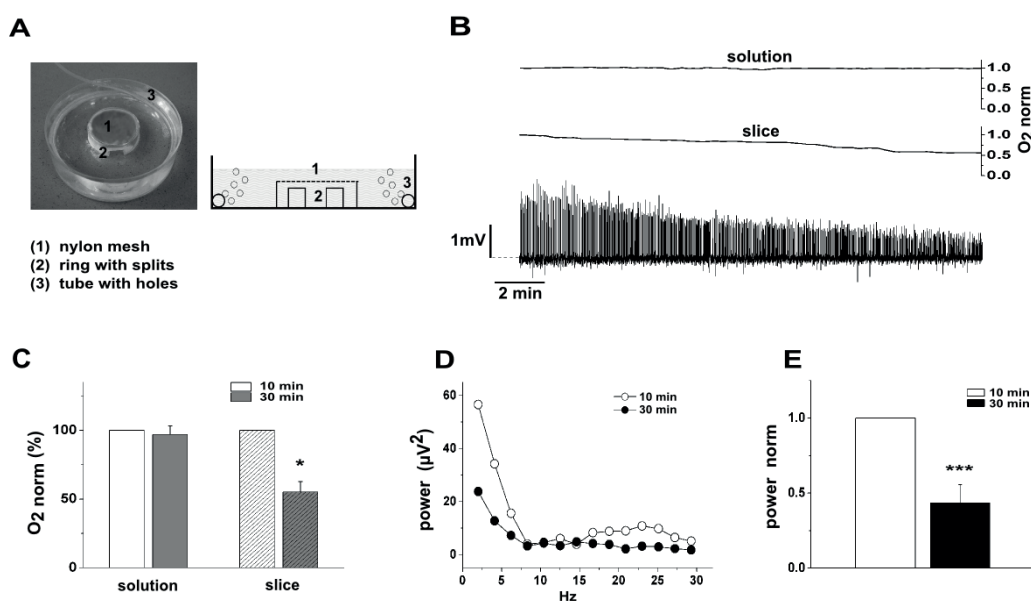


Fig. 4. 4-AP-induced synchronous neuronal activity and oxygen level recorded in hippocampal CA1 pyramidal cell layer in a non-perfusion slice chamber. (A) Modified submerged-type slice chamber. (B) 4-AP-induced synchronous network oscillations (bottom trace) and oxygen level measured in external medium at 100–150 μm above the slice surface (top trace “solution”) and at 100 μm slice depth (middle trace “slice”). (C) Cumulative histogram of the oxygen level in the medium and in slice recorded at 10 min and 30 min after 4-AP application. (D) Power spectrum for the recording presented on B at the frequency band between 0 and 30 Hz at 10 min and 30 min (1 min segment) after 4-AP application. (E) Average power of induced synchronous activity at 10 and 30 min after application of 4-AP

$P = 0.0045$, two-sample Student's t -test). Fig. 5C demonstrates the summary of in-slice changes of pO₂ in this set of experiments. Oxygen deprivation at 2 ml/min flow rate led to a significant reduction of the slice oxygen level ($n = 6$, $P = 0.0008$, paired Student's t -test). The change of the medium flow rate from 2 ml/min to 5 ml/min in oxygen-free medium led to further reduction of slice oxygenation level ($n = 5$, $P = 0.0006$, two-sample Student's t -test). Fig. 5D shows a strong linear correlation between the power of 4-AP-induced synchronous neuronal activity and measured oxygen level in slices ($R = 0.91$, Pearson's correlation).

DISCUSSION

Our results demonstrated that 4-AP-induced seizure-like neuronal activity and the oxygen level in submerged hippocampal slices strongly

depend on the perfusion rate.

It was reported previously, that the ability of neuronal network to generate of the pharmacologically-induced high frequency oscillation in submerged slices depends on extracellular medium flow rate [8]. The seizure-like synchronous neuronal activity is an energy-intensive process and requires significant energetic substrate consumption. Decrease of the oxygen level during electrophysiological recording of high frequency oscillation in brain slice may reflect both activity-dependent oxygen consumption and limitation of oxygen diffusion into the slice tissue [11,12]. Studies of neuronal function *in vivo* performed under normobaric conditions suggest that the ambient atmosphere contains 21 % oxygen at a pressure of 750 Torr or 1 atmosphere absolute (1 ATA; "normobaric normoxia"). Under this condition pO₂ in brain tissue measured by a polarographic

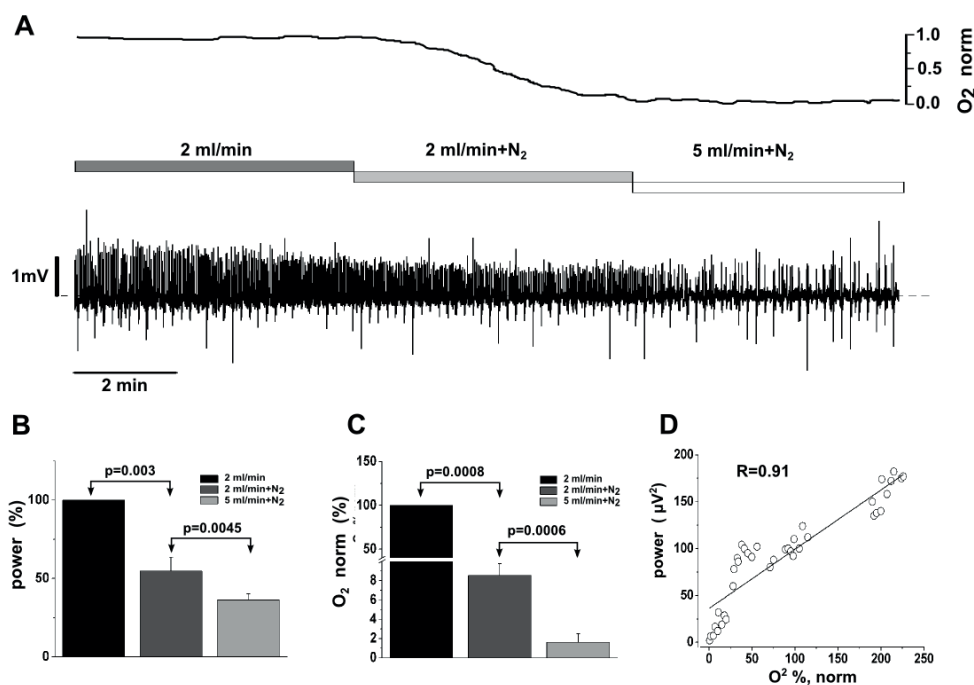


Fig. 5. Synchronous neuronal activity and oxygen level recorded in hippocampal CA1 pyramidal cell layer in the conditions of oxygen deprivation. (A) Field potential recording of the 4-AP-induced synchronous activity (bottom) and oxygen level (top) at 2 ml/min flow rate in oxygen-saturated medium (95% O₂/5% CO₂) and at different flow rates in oxygen-free medium (95% N₂/5% CO₂) (flow rate indicated by horizontal bars). The average power spectrum of synchronous neuronal discharges (B) and oxygen level (C) at 2 ml/min flow rate in oxygen-saturated ACSF (black) and at 2 ml/min (dark grey) and 5 ml/min (grey) in oxygen-free ACSF. (D) Relationship between the power of synchronous neuronal activity and slice oxygen level

or magnetic resonance method was 10-60 Torr that is markedly different from that used for brain slices (100-700 Torr) [7,12]. Actually the pO_2 at normobaric pressure in the superfusion medium in the brain slice experiments is hyperoxic compared to the intact brain and mimics pO_2 in neuronal tissue *in vivo* during “hyperbaric hyperoxia” administered pressure (> 1 ATA) of 100 % O_2 . In our recordings the oxygen depth profile reflects the dynamic of oxygen diffusion into slice tissue (Fig. 1C) and demonstrates a gradual decrease of the oxygen concentration, when oxygen electrode moved away from upper surface. Our data shows that normobaric hyperoxygenated ASCF (95% O_2 /5% CO_2 at normal atmospheric pressure) at flow rate 2 ml/min provides constant normoxic conditions at 100-150 μm depth of slice. These results are close to previous studies investigating the oxygen profile in the brain slice tissue under various perfusion rate and oxygen concentrations [7,13]. In contrast, in the conditions of the absence of medium flow in the recording chamber we observed progressive reduction in the pO_2 as well as decrease in the power of 4-AP-induced synchronous neuronal activity.

In the intact brain the blood circulation system delivers oxygen to neurons via sophisticated mechanism of the vascular-neuronal interaction. Neurons, glial cells and vessels create the “neurovascular units” which regulate a neuronal activity and neuronal plasticity. In the acute brain slice preparation oxygen has to diffuse into the tissue due to the absence of active transport. The balance between the diffusion flow of oxygen into the tissue and amount of oxygen consumed by cells is required to keep a steady state conditions [14, 15].

At a laminar medium flow, the concentration border layer with a low diffusion gas gradient is formed on the slice surface. Based on the kinetic equation:

$$r = kC, \quad (I)$$

where r is a reaction rate, k - reaction rate constant and C is chemical concentration, the

rate of oxygen transport r_O from medium to cells in brain slices can be expressed as:

$$r_O = (K_d K_{DBL} / K_d + 1/K_{DBL})C \quad (II)$$

where K_d is a diffusion coefficient into tissue and K_{DBL} is a diffusion coefficient across border layer. From the equation II, the total oxygen diffusion coefficient (K_{total}) expresses as:

$$1/K_{total} = 1/K_d + 1/K_{DBL} \quad (III)$$

In our experiments K_d was constant. Also the presence of oxygen-saturated medium in the chamber without a flow superfusion could not support a constant level of in-tissue oxygenation (Fig. 4B). We suggest that the maintaining of the optimal medium flow is required to provide the balance between oxygen delivery and oxygen consumption during a high frequency neuronal activity.

It was shown previously, that neuronal activity and synaptic transmission are suppressed following transient cerebral ischemia [16]. Other studies report, that transient ischemia lead to the synaptic potentiation and increases of the spontaneous firing rate recorded in CA1 region of anesthetized animals [17]. The global hypoxia induces seizures in P10-12 rats *in vivo*. Also the increased seizure susceptibility was observed in hippocampal slices obtained from the hypoxia-treated rats [10]. In our experiments we did not see seizure-like activity under hypoxia conditions. Moreover, reducing PO_2 in the tissue linearly decreases the intensity of epileptic discharges (Fig. 5D). The mechanism of hypoxia-induced epileptiform discharges is not clear, but likely involves changes in the transmembrane ion conductivity, the release of the reactive oxygen species and disturbance of the mitochondrial redox state. We suggest that under our experimental conditions a low oxygen level does not affect these mechanisms.

By contrast, it was shown that hyperoxia leads to the activation of population spikes and synchronous interictal discharges in CA1 hippocampal region [18]. Oxygen-induced plasticity may play a substantial role in the pathogenesis of CNS. For example, the oxygen toxicity-induced seizures in rats occur during the inhalation of 3 ATA of 100% O_2 for several

hours [19]. Also increasing the neural tissue pO_2 from the normoxic range (10 – 45 Torr) to 240 Torr or more caused tonic-clonic seizures in cats [20]. Our data support these findings and show that the increase in the perfusion rate resulted in the rapid rise of PO_2 and increase in the synchronous neuronal activity.

In summary, we suggest that severity of the pharmacologically-induced seizure-like activity *in vitro* is determined by the tissue oxygen level that is a complex function which depends on experimental conditions, including ambient pO_2 , perfusion flow rate and position of the recording electrode in the slice tissue. Based on our kinetic model, future electrophysiological experiment on submerged brain slices addressing the synchronous epileptiform activity should take into account a slow rate of oxygen equilibration in tissue for correct interpretation of results.

**В.Г. Сидоренко, О.С. Комаров, Б.С. Сушко,
А. К. Романов, О. В. Ісаєва, Д. С. Ісаєв**

ЗМІНА ШВИДКОСТІ СУПЕРФУЗІЇ ПРИЗВОДИТЬ ДО МОДУЛЯЦІЇ ІНДУКОВАНОЇ 4-АМІНОПІРИДИНОМ НЕЙРОННОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЛОКАЛЬНОГО ВМІСТУ КИСНЮ В ЗРІЗАХ ГІПОКАМПА ЩУРІВ

Із використанням 4-амінопіридинової (4-АР) моделі іктогенезу у незрілих щурів ми вивчали вплив оксигенації на здатність зрізів гіпокампа генерувати епілептиформну активність. Виявлено, що зміна швидкості перфузії в діапазоні 1-5 мл/хв призводила до модифікації амплітуди і частоти 4-АР-індукованої синхронної активності нейронів, а також до змін вмісту кисню у зовнішньому клітинному середовищі. Зниження швидкості потоку, а також видалення кисню з позаклітинного розчину з використанням азоту, призводило до швидкої редукації вмісту кисню в нервовій тканині і викликало значне зниження потужності синхронних нейронних розрядів. Показано позитивну лінійну кореляцію між потужністю 4-АР-індукованої епілептиформної активності нейронів і вмістом кисню. Також виявлено, що наявність перфузії є необхідною умовою для підтримки постійного рівня оксигенації зрізу. Отримані результати дають змогу стверджувати, що спосіб постачання кисню до тканин зрізів мозку залежить від експериментального протоколу і може модулювати *in vitro* нейронну мережеву збудливість, що слід брати до уваги при плануванні експериментів, пов'язаних з дослідженням епілепсії.

Ключові слова: зрізи мозку; синхронна нейронна активність; кисень; локальний польовий потенціал.

**В.Г. Сидоренко, А.С. Комаров, Б.С. Сушко,
А.К. Романов, Е.В. Исаева, Д.С. Исаев**

ИЗМЕНЕНИЕ СКОРОСТИ СУПЕРФУЗИИ ПРИВОДИТ К МОДУЛЯЦИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ 4-АМИНОПИРИДИНОМ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ И ЛОКАЛЬНОГО УРОВНЯ КИСЛОРОДА В СРЕЗАХ ГИПОКАМПА КРЫС

Мы изучали влияние оксигенации на способность срезов гиппокампа генерировать эпилептиформную активность с использованием 4-аминопиридиновой (4-АР) модели иктогенеза у молодых крыс. Показано, что изменение скорости перфузии в диапазоне 1-5 мл/мин приводило к модуляции амплитуды и частоты 4-АР-индуцированной синхронной активности нейронов, а также к изменениям уровня кислорода. Снижение скорости суперфузии, также как и вытеснение кислорода из внеклеточного раствора азотом, приводило к быстрому снижению уровня кислорода в нейронной ткани и вызывало значительное снижение мощности 4-АР-индуцированных синхронных нейронных разрядов. Показано положительную линейную корреляцию между мощностью 4-АР-индуцированной активности нейронов и уровнем кислорода в ткани среза. Также продемонстрировано, что наличие суперфузии является условием для поддержания постоянного уровня оксигенации среза. Результаты данной работы позволяют предположить, что транспорт кислорода к тканям срезов мозга зависит от экспериментального протокола и может модулировать возбудимость нейронной сети *in vitro*, что следует учитывать при планировании экспериментов, связанных с исследованиями эпилепсии.

Ключевые слова: срезы мозга; синхронная нейронная активность; кислород; локальный полевой потенциал.

REFERENCES

1. Yamamoto C, McIlwain H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media *in vitro*. *J Neurochem*. 1966 Dec;13(12):1333–43.
2. Isaeva E, Lushnikova I, Savrasova A, Skibo G, Holmes GL, Isaev D. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2010 Dec;32(11):1889–96.
3. Isaeva E, Romanov A, Holmes GL, Isaev D. Status epilepticus results in region-specific alterations in seizure susceptibility along the hippocampal longitudinal axis. *Epilepsy Res*. 2015 Feb;110:166–70.
4. Vanzetta I, Grinvald A. Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science*. 1999;286(5444):1555–8.
5. Foster KA, Beaver CJ, Turner DA. Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices.

- Neuroscience. 2005;132(3):645–57.
6. Turner DA, Foster KA, Galeffi F, Somjen GG. Differences in O₂ availability resolve the apparent discrepancies in metabolic intrinsic optical signals in vivo and in vitro. *Trends Neurosci.* 2007;30(8):390–8.
 7. Kann O, Huchzermeyer C, Kovács R, Wirtz S, Schuelke M. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex i gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain.* 2011;134(2):345–58.
 8. Ivanov A and Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics.* 2013;3:1–13.
 9. Dzhalal V, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. Neuronal mechanisms of the anoxia-induced network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol.* 2001;536(2):521–31.
 10. Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, Belin TR, Burchfiel JL. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol.* 1991;29(6):629–37.
 11. Galeffi F, Somjen GG, Foster KA, Turner DA. Simultaneous monitoring of tissue PO₂ and NADH fluorescence during synaptic stimulation and spreading depression reveals a transient dissociation between oxygen utilization and mitochondrial redox state in rat hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(2):626–39.
 12. Masamoto K, Omura T, Takizawa N, Kobayashi H, Katura T, Maki A, et al. Biphasic changes in tissue partial pressure of oxygen closely related to localized neural activity in guinea pig auditory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(9):1075–84.
 13. Mulkey DK, Henderson R a, Olson JE, Putnam RW, Dean JB. Oxygen measurements in brain stem slices exposed to normobaric hyperoxia and hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol.* 2001;90(5):1887–99.
 14. Huxley VH, Kutchai H. The effect of the red cell membrane and a diffusion boundary layer on the rate of oxygen uptake by human erythrocytes. *J Physiol.* 1981;316:75–83.
 15. Bassom AP, Ilchmann A, Voss H. Oxygen diffusion in tissue preparations with Michaelis-Menten kinetics. *J Theor Biol.* 1997;185(1):119–27.
 16. Furukawa K, Yamana K, Kogure K. Postischemic alterations of spontaneous activities in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 1990;530(2):257–60.
 17. Gao TM, Xu ZC. In vivo intracellular demonstration of an ischemia-induced postsynaptic potential from CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus. *Neuroscience.* 1996;75(3):665–9.
 18. Garcia AJ, Putnam RW, Dean JB. Hyperbaric hyperoxia and normobaric reoxygenation increase excitability and activate oxygen-induced potentiation in CA1 hippocampal neurons. *J Appl Physiol.* 2010;109(3):804–19.
 19. Simon AJ, Torbati D. Effects of hyperbaric oxygen on heart, brain, and lung functions in rat. *Undersea Biomed Res.* 1982;9(3):263–75.
 20. Torbati D, Mokashi A, Lahiri S. Effects of acute hyperbaric oxygenation on respiratory control in cats. *J Appl Physiol.* 1989;67(6):2351–6.

Received 14.12.2015

Знижена відповідь натуральних кілерних лімфоцитів на стимуляцію Toll-подібного рецептора 3 у дітей, які часто хворіють

Д.В. Осипчук¹, В.П. Чернишов¹, Л.І. Чернишова², Н.П. Кисіль³, Б.В. Донської¹, І.М. Матвієнко⁴, В.П. Родіонов⁴, Ю.А. Маковська⁴

¹ ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», Київ;

² Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика, Київ;

³ Національна дитяча спеціалізована лікарня «ОХМАТДИТ», Київ;

⁴ ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», Київ;

e-mail: dariia_osypchuk@ukr.net

Досліджували активацію натуральних кілерних (НК) лімфоцитів, опосередковану Toll-подібним рецептором 3 (ТЛР3), у дітей, що часто хворіють, та у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями. Показником активації був CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з лігандом ТЛР3. У дітей, що часто хворіють, спостерігався вірогідно нижчий цей показник - $36,3 \pm 4,4\%$ порівняно зі здоровими дітьми ($56,5 \pm 4,9\%$) та групою дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями ($55,9 \pm 4,4\%$). Також зниженим був активаційний потенціал НК-клітин - $24,9 \pm 4,5\%$, котрий вираховували як різницю між відсотковим вмістом CD69⁺ НК-лімфоцитів після інкубації та спонтанним значенням (без додавання активатора). Аналіз кореляційних взаємозв'язків показав, що активація НК-лімфоцитів, опосередкована ТЛР3, не залежить від віку. Таким чином, здатність до активації НК-лімфоцитів, опосередкованої ТЛР3, не залежить від віку і є зниженою у дітей, що часто хворіють. Це може сприяти підвищеній чутливості до вірусних інфекцій та їх бактеріальних ускладнень.

Ключові слова: натуральні кілерні лімфоцити; Toll-подібні рецептори.

ВСТУП

Toll - подібні рецептори (ТЛР) - компоненти вродженого імунітету, які розпізнають широкий спектр висококонсервативних структурних або секретованих компонентів патогенів, так званих патогенасоційованих молекулярних патернів (ПАМП), що є необхідними для їх життєдіяльності [1]. ТЛР розпізнають вірусні, бактеріальні та грибові ПАМП у структурі мікроорганізмів та ініціюють вроджений та набутий імунітет. Активація ТЛР індукує транскрипцію антимікробних генів, цитокінів і хемокинів [2].

ТЛР експресуються на всіх імунних клітинах організму, зокрема і на НК-лімфоцитах [3–6]. Останні беруть участь в імунному захисті, безпосередньо, елімінують вірусинфі-

ковані та злоякіснотрансформовані клітини та активують інші ланки імунної системи завдяки секреції цитокінів – інтерлейкіну – 12 (ІЛ-12) та інтерферону-γ (ІФН-γ) [7]. На НК-лімфоцитах людини експресуються майже всі ТЛР [7–9], зокрема ТЛР3, який відноситься до окремої групи внутрішньоклітинних ТЛР - ключових компонентів протівірусної імунної відповіді. Він розпізнає та зв'язується з дволанцюговою РНК (длРНК), що є обов'язковим проміжним продуктом реплікації РНК-вмісних вірусів. Стимуляція ТЛР3, активує НК-лімфоцити, що призводить до секреції цитокінів, підвищення клітинного лізису вірусинфікованих і пухлинних клітин. Продемонстровано, що стимуляція НК - лімфоцитом синтетичним аналогом длРНК - poly I:C, який є лігандом ТЛР3, індукує

© Д.В. Осипчук, В.П. Чернишов, Л.І. Чернишова, Н.П. Кисіль, Б.В. Донської, І.М. Матвієнко, В.П. Родіонов, Ю.А. Маковська

секрецію ІФН- γ , та прозапальних цитокінів - ІЛ-6 та ІЛ-8, котрі є важливими регуляторами імунної відповіді. Також у відповідь на стимуляцію ТЛР3 НК-клітини підвищують експресію маркера активації CD69 [8,9]. Тобто розпізнавання вірусів через ТЛР3 допомагає НК-клітинам відігравати фундаментальну роль у першій лінії захисту організму проти вірусних інфекцій. Відкриття ТЛР та виявлення їх на НК-лімфоцитах дало змогу припустити, що ці клітини здатні не лише елімінувати вірусінфіковані та пухлинні клітини, а також відповідати безпосередньо на інвазію бактеріальних та інших патогенів, розпізнаючи ПАМПП. Взаємодія цих клітин з лігандами ТЛР у місцях інфекції з подальшим синтезом прозапальних медіаторів та активацією набутої ланки імунітету робить їх важливим компонентом у боротьбі як з вірусними, так і бактеріальними патогенами [10-13].

Мета нашої роботи дослідити здатність до активації НК-лімфоцитів у відповідь на стимуляцію ТЛР3 у дітей з частими респіраторними та інвазивними бактеріальними інфекціями.

МЕТОДИКА

Визначення відповіді НК-лімфоцитів на стимуляцію ТЛР3 проводили у 71 дитини. Серед них: діти з інвазивними бактеріальними інфекціями, віком від 4 міс до 16 років ($n=28$); діти, які страждали від частих респіраторних інфекцій або часто хворіли, віком від 1 до 13 років ($n=25$) та здорові віком від 3 до 13 років (перша група здоров'я) в яких не спостерігалось гострих, рекурентних або хронічних захворювань та які протягом попередніх 3 міс не мали інфекційних захворювань, а також не отримували лікування антибактеріальними та імуномодулювальними препаратами з будь-якої причини (контрольна група, $n=18$). На обстеження дітей та використання результатів експерименту було отримано згоду батьків.

Для дослідження проводили забір венозної крові в об'ємі від 500 мкл до 2 мл. Цільну периферичну кров (по 100мкл) інкубували 20 год у CO₂-інкубаторі ("Revco", Швейцарія) у середовищі RPMI-1640 при 37°C з додаванням та без додавання синтетичного аналога дЛРНК - poly I:C - 50мкг/мл («Sigma-Aldrich», США). Клітини мітили FITC-, PE- та PE-Cy5 –кон'югованими моноклональними антитілами до поверхневих маркерів - CD69, CD56 та CD3 («BD Bioscience», США). Відсотковий вміст НК-лімфоцитів та експресію CD69 на цих клітинах після інкубації вимірювали на проточному цитометрі FACScan за допомогою програмного забезпечення CellQuest software («BD Bioscience», США). Рівень спонтанної експресії CD69 вимірювали на зразках, що культивувались у відсутності poly I:C. Результати представлено у вигляді відсоткового вмісту CD69⁺ НК-лімфоцитів. Статистичну обробку проводили за допомогою програми GraphPad Prism 6.0, для дослідження вірогідності використовували метод статистичного аналізу one-way Anova. Коефіцієнти кореляції визначали за методом Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відсотковий вміст НК-лімфоцитів значно варіював у межах груп, проте не було вірогідної статистичної різниці між ними. У дітей, що часто хворіли, він становив - $11,4 \pm 1,1\%$, у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями - $8,8 \pm 1,7\%$, у здорових $8,2 \pm 1,1\%$.

Експресія маркера активації CD69 на НК-лімфоцитах відрізнялася між групами. Найвищий рівень спонтанної експресії спостерігався у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями - $20,6 \pm 3,3\%$ НК-лімфоцитів мали фенотип CD69⁺ (рисунк). Цей показник був вищий порівняно з групою дітей, що часто хворіли - $11,4 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$). У контролі вміст активованих НК-лімфоцитів сягав $15,3 \pm 2,9\%$ та статистично не відрізнявся від значень у інших групах

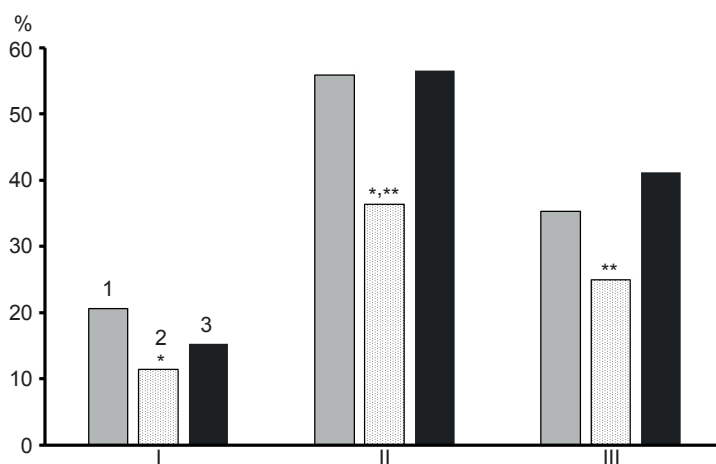
(рисунок). НК-лімфоцити є невід'ємним і важливим компонентом імунної системи, тому загальний стан активації імунної системи та гострого запалення, внаслідок бактеріальної інвазії, міг відобразитися на них підвищеним вмістом активаційного маркера у групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями. Також на поверхні цих клітин містяться рецептори і до бактеріальних антигенів, що дає їм можливість безпосередньо розпізнавати бактерії та брати активну участь у перебігу інфекції.

Інкубація з poly I:C призводила до значного зростання експресії маркера активації на НК-лімфоцитах. У дітей, що часто хворіли, цей показник сягав нижчого значення - $36,3 \pm 4,4\%$, ($P < 0,05$) порівняно з контролем - $56,5 \pm 4,9\%$ та значеннями у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями - $55,9 \pm 4,9\%$ (див. рисунок).

Для детальнішої оцінки здатності НК-лімфоцитів активуватися при інкубації з poly I:C ми вираховували приріст маркера CD69 на цих клітинах як різницю між відсотковим вмістом CD69⁺ НК-лімфоцитів після та до інкубації з poly I:C. У контрольній групі - $41,2 \pm 4,5\%$ НК-лімфоцитів набули фенотипу CD69⁺ після активації poly I:C (див. рисунок). Значно нижче значення приросту було в

групі дітей, що часто хворіли - $24,9 \pm 4,5\%$ ($P < 0,05$ порівняно із контролем). Рівень приросту в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями становив $35,4 \pm 12,9\%$ та статистично не відрізнявся від значень у інших групах (див. рисунок). Таким чином, у групі дітей, що часто хворіють, спостерігався найнижчий приріст активаційного маркера CD69, лише $24,9 \pm 4,5\%$ НК-лімфоцитів почали експресувати цей маркер після інкубації з poly I:C.

Зважаючи на значну різницю у віці дітей, ми дослідили чи є взаємозв'язок віку та рівня спонтанної експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C, приростом активаційного маркера та кількістю цих клітин у кожній групі (таблиця). Між віком дітей та досліджуваними показниками не виявлено кореляційних взаємозв'язків у жодній з груп дітей. Зміни в імунній відповіді, опосередкованій активацією ТЛР, відбуваються до першого року та в похилому віці. В період від 1-го року життя до похилого віку (65 років) відсутні суттєві відмінності в реакціях вродженого імунітету (на прикладі синтезу цитокінів), зумовлених активацією ТЛР [14]. Наші результати також підтверджують описані дані - активація НК-лімфоцитів, опосередкована



Зміни експресії активаційного маркера CD69 на НК-лімфоцитах до інкубації з poly I:C(I), після інкубації(II) та їх різницею(III): 1 – діти з інвазивними бактеріальними інфекціями, 2 – діти, що часто хворіють, 3 – контрольна група. * $P < 0,05$ – порівняно з групою дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями; ** $P < 0,05$ – порівняно з контрольною групою дітей

активацією ТЛР3, не залежить від віку. Це дає можливість порівнювати різні вікові групи при дослідженнях функціональної активності ТЛР.

Згідно з нашими результатами, діти, що часто хворіють, мають низький спонтанний рівень експресії маркера активації CD69 та знижену здатність до активації після інкубації з агоністом ТЛР3 – poly I:C. Як відомо, активація ТЛР3 на НК-клітинах призводить до підвищення клітинного лізису вірусінфікованих та пухлинних клітин, секреції прозапальних цитокінів, які є регуляторами імунної відповіді (ІФН- γ), та хемоатрактантами (ІЛ-6 та ІЛ-8) [8–10]. У рамках захисних реакцій вродженого імунітету слизових оболонок від інфекцій, відбувається активна міграція нейтрофілів, НК-лімфоцитів, макрофагів та індукується синтез прозапальних цитокінів і хемокінів. Вдале завершення інфекції великою мірою

залежить саме від вчасного надходження лейкоцитів і продукції хемокінів у місці інфікування [13,15,16]. Наступна відповідь набутого імунітету вже є першочерговою в усуненні вірусів і репарації пошкоджених у результаті інфекції тканин. Можна припустити, що знижена активаційна здатність НК-лімфоцитів і як можливий наслідок знижена секреція прозапальних цитокінів, у дітей, які часто хворіють, є однією з причин їх чутливості до вірусних інфекцій, що також створює сприятливі умови для бактеріальних ускладнень. Heltzer і співавт. [17] продемонстрували знижену секрецію прозапальних цитокінів імунними клітинами у відповідь на стимуляцію ТЛР у дітей, хворих на грип, порівняно зі здоровими. Така знижена запальна відповідь у гострий період захворювання, може зменшувати пошкодження індуковані вірусом, тим не менше, ці зміни можуть зберігатись і після

Взаємозв'язок віку дітей та показників активації НК-лімфоцитів і їх відсотковим вмістом

Показник	Коефіцієнт кореляції Пірсона	Вірогідність
Діти з інвазивними бактеріальними інфекціями (n=28)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	0,19	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	0,22	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	0,11	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	0,08	>0,05
Діти, які часто хворіють (n=25)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	-0,32	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	-0,15	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	-0,14	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	-0,31	>0,05
Контрольна група (n=18)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	0,22	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	0,14	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	-0,05	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	0,01	>0,05

завершення вірусної інфекції, створюючи умови для повторних вірусних захворювань та розвитку бактеріальних ускладнень.

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано знижену здатність до активації НК-лімфоцитів, опосередкованої ТЛР3, у групі дітей, котрі часто хворіють, що може призводити до підвищеної чутливості до вірусних інфекцій та наступних бактеріальних ускладнень.

2. Діти з інвазивними бактеріальними інфекціями мають високий рівень як спонтанної експресії маркера активації на НК-лімфоцитах, так і високий рівень активаційного потенціалу останніх, що може свідчити про активну участь НК-лімфоцитів у перебігу бактеріальної інфекції.

3. Показано відсутність кореляційних взаємозв'язків віку дітей та показників активації НК-лімфоцитів і їх відсоткового вмісту.

Д.В. Осипчук, В.П. Чернышев, Л.И. Чернышева, Н.П. Кисель, Б.В. Донской, И.Н. Матвиенко, В.П. Родионов, Ю.А. Маковская

СНИЖЕННЫЙ ОТВЕТ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ НА СТИМУЛЯЦИЮ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 3 У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

В этой работе мы исследовали активацию НК-лимфоцитов, опосредованную стимуляцией Toll-подобного рецептора 3 (TLR3), у часто болеющих детей и детей с инвазивными бактериальными инфекциями. Показателем активации использовали уровень экспрессии маркера активации CD69 на НК-лимфоцитах после инкубации с лигандом TLR3. В часто болеющих детей наблюдался достоверно сниженный уровень экспрессии маркера активации - $36,3 \pm 4,4\%$ по сравнению с контролем ($56,5 \pm 4,9\%$) и детьми с инвазивными бактериальными инфекциями ($55,9 \pm 4,4\%$). Также сниженным был показатель активационного потенциала НК-лимфоцитов - $24,9 \pm 4,5\%$, который вычисляли как разницу между процентным содержанием $CD69^+$ НК-лимфоцитов после инкубации и спонтанным значением (без добавления активатора). Анализ корреляционных взаимосвязей показал, что активация НК-лимфоцитов, опосредованное TLR3, не зависит от возраста. Таким образом, способность к активации НК-лимфоцитов, опосредованной TLR3, не зависит от возраста и является

пониженной у часто болеющих детей. Снижена активация НК-лимфоцитов может способствовать повышенной чувствительности к вирусным инфекциям и их бактериальным осложнениям.

Ключевые слова: натуральные киллерные лимфоциты; Toll-подобные рецепторы.

D.V. Osypchuk¹, V.P. Chernyshov¹, L.I. Chernysheva², N.P. Kissel³, B.V. Donskoi¹, I.M. Matvienko⁴, V.P. Rodionov⁴, Yu.A. Makovska⁴

REDUCED RESPONSE OF NATURAL KILLER LYMPHOCYTES TO TOLL-LIKE RECEPTOR 3 STIMULATION IN CHILDREN WITH RECURRENT INFECTIONS

In this study, we examined the activation of natural killer (NK)-lymphocytes mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3), in the group of children with recurrent infections and the group of children with invasive bacterial infections. We examined level of CD69 (marker of activation) expression on NK - lymphocytes after incubation with TLR3 ligand. There was a significant decrease in the level of an activation marker - $36,3 \pm 4,4\%$ in the group of children with recurrent infections, compared with a control group of healthy children ($56,5 \pm 4,9\%$) and the group of children with invasive bacterial infections ($55,9 \pm 4,4\%$). Also, decreased was an activation potential of NK-lymphocytes - $24,9 \pm 4,5\%$ which was calculated as the difference between the percentage of $CD69^+$ NK - lymphocytes after incubation and spontaneous value (without the addition of activator). There were no correlations between markers of TLR3 mediated activation of NK-cells and the age. Thus, the ability to activate NK - lymphocyte mediated by TLR3, independent of age and reduced in the group of children with recurrent infections. Reduced activation of NK-lymphocytes may contribute to increased susceptibility to viral infections and bacterial complications.

Key words: NK-cells; TLR; Toll-like receptors.

¹Laboratory of Immunology, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

²Department of Children Infectious Diseases and Children's Immunology, Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kiev, Ukraine

³Department of septic surgery, National Children's Specialized Hospital «OHMATDYT», Kiev, Ukraine

⁴Department of health child's problems and premorbid states, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

REFERENCES

1. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;

- 226:10–8.
2. Berezhnaia NM, Sepiashvili RI. Physiology of Toll-like receptors--regulators of natural and acquired immunity. *Fiziol Zh.* 2011;57(5):26-9.
3. Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008;15(1):138-46.
4. Ingerslev HC, Ossum CG, Lindenstrem T, Nielsen ME. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout. *PLoS One.* 2010;5(2):e9304.
5. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.
6. Sun J C, Lanier L L. NK cell development, homeostasis and function:Parallels with CD8 T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 645–57
7. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol.* 2006;241:102–12.
8. Wulff S, Pries R, Wollenberg B. Cytokine release of human NK cells solely triggered with Poly I:C *Cell Immunol.* 2010;263(2):135-7
9. Moore TC, Kumm PM, Brown DM, Petro TM. Interferon response factor 3 is crucial to poly-I:C induced NK cell activity and control of B16 melanoma growth. *Cancer Lett.* 2014;346(1):122-8.
10. Tyler C. Moore, Phyllis M. Kumm, Deborah M. Brown, Thomas M. Petro. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Natural Killer (NK) Cells in Antibacterial Innate Immunity: Angels or Devils? *Mol Med.* 2012;30:270-85
11. Adib-Conquy M1, Scott-Algara D2, Cavaillon JM1, Souza-Fonseca-Guimaraes F TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals *Immunol Cell Biol.* 2014 Mar;92(3):256-62.
12. Dong Z, Wei H, Sun R, Hu Z, Gao B, Tian Z. Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J Hepatol.* 2004;41(6):966-73.
13. Sarris M, Masson JB, Maurin D, Van der Aa LM, Boudinot P, Lortat-Jacob H, Herbomel P. Unni AM, Bondar T. Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol.* 2012;22(24):2375-82.
14. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity.* 2012;37(5):771-83.
15. Medzhitov R. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:1686–91.
16. Zeng R, Li C, Li N, Wei L, Cui Y. The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine.* 2011;53(1):1-7.
17. Heltzer ML, Coffin SE, Maurer K, Bagashev A, Zhang Z, Orange JS, Sullivan KE. Immune dysregulation in severe influenza. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):1036-43.

*Матеріал надійшов
до редакції 22.12.2015*

Disorders of carbohydrate metabolism in experimental brain injury

S.V. Ziablitsev, S.V. Pishchulina, S.V. Kolesnikova, R.N. Boris, Ya.S. Yuzkiv

Bogomolets National Medical University, Kyiv, e-mail: zsv1965@gmail.com

In experimental heavy closed brain injury (mortality in five days – 86%) it is shown that from the first hours the violations of carbohydrate metabolism in the form of triad were formed: the marked hyperglycemia (3.3-3.6 times), hyperinsulinemia (2.4-3.2 times) and insulin resistance (HOMA-indexes increased to 8.0-11.7 times). These changes were caused by a decrease in tissue sensitivity to insulin and were accompanied by decrease in functional activity of the pancreatic β -cells. In total it is possible to consider these changes as a pentad of the typical disorders of carbohydrate metabolism at brain injury.

Key words: brain injury; glucose; insulin; violations of carbohydrate metabolism.

INTRODUCTION

Rate of anthropogenic disasters is increasing and cerebral trauma is one of important reasons of mortality [1-3]. Tissue damage and cellular disorders are observed as a result of brain injury: edema, intracranial hemorrhage, hematoma, axonal destruction [4, 5]. Disorders of circulation, immunosuppression, accumulation of toxins, metabolic disturbances worsen clinical course [6, 7]. Posttraumatic axonal injury is caused by increased proteolysis, expression of calpain mRNA, disorders of retrograde axonal transport [8, 9]. Neuroendocrine system is affected too. Pathochemical disorders of brain next: total intensification of metabolism → formation of energy deficiency → development of cellular intoxication → formation of secondary structural disorders [10]. The hypermetabolic syndrome develops in different extremal states and in patients with cerebral trauma also [11]. Secretion of catecholamines, glucocorticoids and angiotensin is stimulated by trauma and stress [12]. Oxygen necessity of brain increase, but disorders of circulation, accumulation of lactate, formation of acidosis lead to hypoxia [13]. Activation of glycolysis and gluconeogenesis, formation of tissue tolerance to insulin, hyper-

glycemia are observed [14, 15]. Level of hyperglycemia correlate with severity of injury [16]. Brain is insulin-independent tissue, glucose entry to neurons is implemented by transporters GLUT-1, GLUT-3 and GLUT-5, therefore brain is more sensitive to hypoglycemia and hypoxia, than are organs [17, 18]. Hyperactivation of central regulatory systems is first non-specific reaction of the body after some hours of brain injury, a rise in adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, vasopressin and insulin has been found. The research investigates the carbohydrate metabolism in experimental brain injury.

METHODS

Experiment was made on 75 white males' rats with 195 ± 10 g weight. Brain injury was modeled by one stroke on cranium. Lethality was 86% during first five days after trauma. Preparation animals to experiment, anesthesia and vivisection were made according to European Convention for Protection of Animals (Strasbourg, 1986). Control group included 15 animals. Examination of animals after trauma showed presents of subperiosteal, subdural and epidural haematomas, brain crushing area and detritus, edema. Therefore animals had moderate closed

cerebral injury with undisplaced skull fracture. Levels of glucose and insulin in the blood were examined after 3, 24, 48 and 72 hours after trauma. Neurological deficiency was examined by Todd number (1981) in L.A. Shalyakin (1987) and A.Y. Eutoshenko (1989) modification [14].

Concentration of hormones was made by immunoassay method. Indexes of insulin resistance (HOMA-IP), function of β -cells (HOMA- β -cells) and sensitiveness for insulin (QUICKI) were calculated by next formulas:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glucose}(0) \times \text{insulin}(0)}{22,5},$$

$$\text{HOMA-}\beta\text{-cells} = \frac{\text{insulin}(0) \times 20}{(\text{glucose}(0) - 3,5)},$$

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\lg \text{insulin}(0) + \lg \text{glucose}(0)},$$

where glucose – concentration of glucose in blood (mmol/l), insulin – concentration of insulin in blood (pmol/l). Indexes of insulin resistance, function of β -cells and sensitiveness for insulin were explored. The study results were processed using the method of multiple comparisons in the program of the statistical analysis MedCalc v.15.11.0 (MedCalc Software bvba, 1993-2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Level of glucose increased after traumatic injury in all periods of investigation (Table 1). Maximal augmentation was observed after 3 and 24 hours after trauma (in 3.7 and 3.3 times, $P < 0.05$ in both cases).

Increased level of glucose after trauma was marked by other writers [14, 15]. This fact was explained by catabolic hormones (catecholamines, glucocorticoids) rising and glycogenolysis and gluconeogenesis activation, first of all in the liver. Launching of this reaction

had central disposition, because brain had need of glucose.

At rest the brain uses 60% of glucose, of which 40% of glucose is used by Na^+/K^+ -ATPase pump. Entrance of glucose is realized by facilitated diffusion with GLUT-3 transporters to neurons and with GLUT-1 to glia cells. This process is independent from insulin concentration in contrast to skeletal muscles, myocardium, fat tissue. Therefore activation of glucose formation by neuroendocrine factors and glucose utilization by brain is powerful defense reaction on traumatic injury. That is way computation of base indexes of influence insulin on glucose level is very important (Table 2).

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) is most well-known index for determination of insulin efficiency (Mathews et al., 1985). The higher level of HOMA-IP index insulin accompanied with the lower sensitiveness to insulin and than higher insulin resistance. Disorders of insulin effects are caused by pathological states as a result of abnormal insulin synthesis (pro-receptor level), decrease amount and affinity of receptors (receptor level), reduction molecules of glucose transporter in peripheral tissue GLUT-4 (transport of glucose level), disturbances of signal transmission and phosphorylation (post-receptor). The main causes of less sensitivity to insulin are disorders of signal transmission and phosphorylation. The HOMA-IP index increased after 3 hours ten times ($P < 0.05$) and after 24 hours eight times ($P < 0.05$) at traumatic period. After that HOMA-IP index decreased gradually, but stayed more, than control level two-three times ($P < 0.05$) (Table 2). The dynamics of insulin and glucose levels in the blood were same (Table 1 and Figure 1).

Table 1. Levels of glucose and insulin in blood after brain injury ($M \pm m$)

Index	Control	Time after trauma				
		3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days
Glucose, mmol/l	4.93 \pm 0.51	18.12 \pm 1.75*	16.25 \pm 1.08*	7.51 \pm 0.86*	8.94 \pm 0.99*	8.28 \pm 0.81*
Insulin, pmol/l	18.5 \pm 2.0	58.7 \pm 4.6*	44.9 \pm 3.7*	40.2 \pm 4.1*	28.6 \pm 3.0*	22.8 \pm 2.5

* $P < 0.05$ in comparison medium level with control group

Table 2. Dynamics of insulin indexes (M±m)

Index	Control	Time after trauma				
		3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days
HOMA-IR	4.05±0.42	47.27±5.61*	32.43±3.22*	13.42±1.84*	11.36±1.15*	8.39±0.99*
HOMA-β-cells	258.70±21.25	80.31±4.21*	70.42±5.04*	200.55±19.57	105.12±9.85*	95.46±5.41*
QUICKI	0.51±0.09	0.33±0.09	0.35±0.08	0.40±0.08	0.41±0.07	0.44±0.10

* P<0.05 in comparison medium level with control group

Probable reason of hyperglycemia is a rise of catabolic hormones. Estimation of HOMA-IP index dynamics allowed seeing this process in convincing aspect. The level of this index increased ten times after 3 hours after trauma, that is why formation of posttraumatic hyperglycemia was caused by insulin resistance.

Thereby, hyperergic reaction of neurohormonal system with catabolic action generated formation of hyperglycemia at first time after trauma and as a result – formation insulin resistance and hyperinsulinemia such as secondary reaction. These data are confirmed with clinical investigations and experiment revealed that brain injury is accompanied with carbohydrates metabolism disorders: hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance. But there is a question – what is a cause of insulin resistance? More frequent cause of less sensitivity to insulin is disorders of signal transmittion and phosphorylation at postreceptor (intracellular)

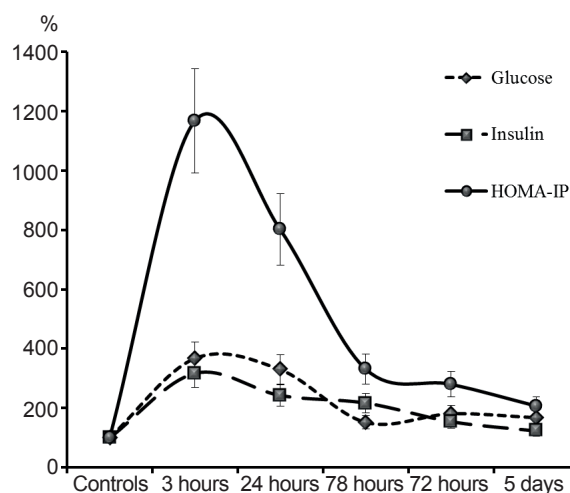


Fig. 1. Glucose, insulin and HOMA-IP index after trauma (the control level is 100%)

level. Probably, glucocorticoides and catecholamines inhibited phosphorylation of glucose in hexokinase reaction.

Next index is HOMA-β-cells, this index show function of β-cells in pancreas. The level of HOMA-β-cells decreased – 27-41% from control (P<0.05), but after 48 hours it increased to 78%, probably, activation of β-cells in pancreas was a reason. Reduction of HOMA-β-cells and simultaneous multiple augmentation of insulin in blood are very interesting. Possible explanation is disorders of insulin metabolism by target cells as a result of insulin resistance and accumulation of this hormone in blood. HOMA-β-cells is calculate such as ratio of insulin level to glycemia, because there is correlation between concentrations of insulin and glucose. Possible causes of normalization of HOMA-β-cells index are increment of insulin or reduction of glucose.

Period of 48 hours after trauma is critical, the level of glycemia was less in this time, than at other periods, thereby it was a reason return HOMA-β-cells to norm. Estimation of HOMA-β-cells index revealed mechanisms of disorder of carbohydrate metabolism humoral regulation: posttraumatic hyperglycemia, insulin resistance and hyperinsulinemia are accompanied with functional reduction of β-cells activity.

Dynamics of sensitivity to insulin at post-traumatic period was analyzed by QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index). Reduction of QUICKI was observed during all periods of experiment from 64% after 3 hours after trauma to 86% after 5 days after trauma. It confirmed, that increment of insulin level is a result of target cells sensitivity reduction and hormone degradation abatement. Pentology of

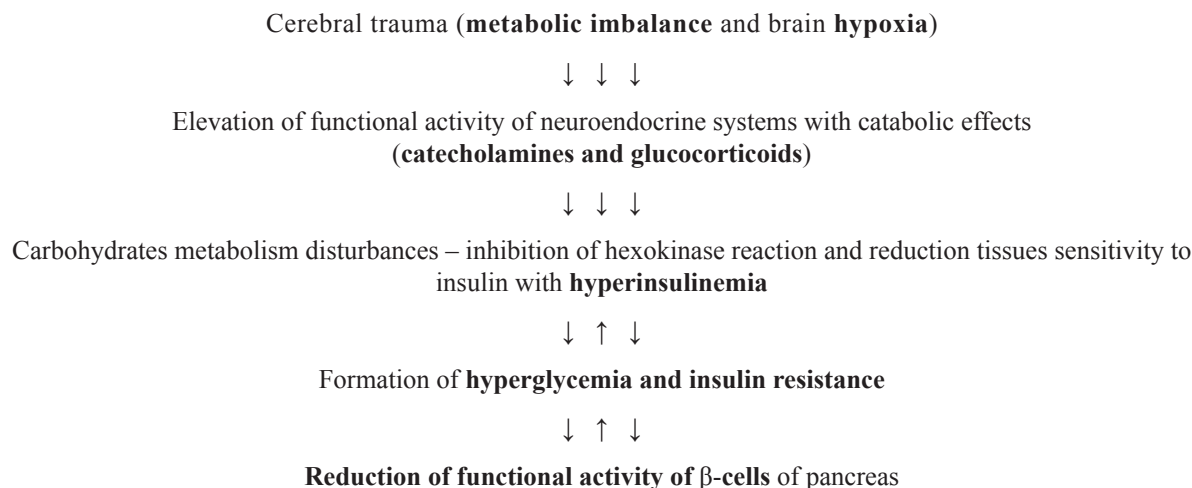


Fig. 2. Interrelation of neurohormonal regulation disorders of carbohydrates metabolism at cerebral trauma

typical carbohydrates metabolism disorders are hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance, reduction of tissues sensitivity to insulin, reduction of functional activity of β -cells of pancreas (Figure 2).

CONCLUSION

Disturbances of carbohydrates metabolism are formed from first hours after cerebral trauma: hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance. These changes are caused by reduction tissues sensitivity to insulin and functional activity β -cells impairment. Thereby, all these reaction formed pentalogy of typical carbohydrates metabolism disorders at cerebral trauma.

С.В. Зяблицев, С.В. Пищулина, С.В. Колесникова, Р.М. Борис, Я.С. Юзьків

ПОРУШЕННЯ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ

В експерименті з моделювання важкої закритої черепно-мозкової травми (летальність за 5 діб – 86 %) показано, що вже з перших годин формувалися розлади вуглеводного обміну у вигляді триади типових порушень: виражена гіперглікемія (у 3.3-3.6 раза), гіперінсулінемія (у 2.4-3.2 раза) та інсулінорезистентність (НОМО-індекс був підвищений в 8.0-11.7 раза). Ці зміни було зумовлено зниженням чутливості тканин до інсуліну, що супроводжувалося пригніченням функціональної активності β -клітин підшлункової залози. У сукупності це можна було

враховувати як пентаду типових порушень вуглеводного обміну при черепно-мозковій травмі.

Ключові слова: черепно-мозкова травма; глюкоза; інсулін; порушення вуглеводного обміну.

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

С.В. Зяблицев, С.В. Пищулина, С.В. Колесникова, Р.Н. Борис, Я.С. Юзькив

НАРУШЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

В эксперименте по моделированию тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы (летальность за 5 суток – 86%) показано, что уже с первых часов формировались нарушения углеводного обмена в виде триады типовых нарушений: выраженная гипергликемия (в 3.3-3.6 раза), гиперинсулинемия (в 2.4-3.2 раза) и инсулинорезистентность (НОМА-индекс был повышен в 8.0-11.7 раза). Эти изменения были обусловлены снижением чувствительности тканей к инсулину и сопровождалась подавлением функциональной активности β -клеток поджелудочной железы, что в совокупности можно было считать пентадой типовых нарушений углеводного обмена при черепно-мозговой травме.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; глюкоза; инсулин; нарушения углеводного обмена.

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев, Украина

REFERENCES

1. Akang EE, Kuti MA, Osunkoya AO, et al. Pattern of fatal head injuries in Ibadan – a 10 year review. Med Sci Law.

- 2002; 42(2). 160-6.
2. Augustine A Adeolu, Orhorhoro OI, Malomo AO, Shokunbi MT. Relationship between injury severity, random blood glucose and management outcome in a cohort of Nigerian patients with head injury. *J Neurosci Rural Pract.* 2015; 6(2). 216-20. doi: 10.4103/0976-3147.153230 PMID: PMC4387814.
3. Lu J, Marmarou A, Choi S, et al. Impact and Abic Study Group. Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 2005; 95. 281–285.
4. Kummer TT, Magnoni S, MacDonald CL, et al. Experimental subarachnoid haemorrhage results in multifocal axonal injury. *Brain.* 2015; Jun 26. pii: awv180.
5. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007; 99(1). 4-9. doi: 10.1093/bja/aem131.
6. Liesz A, Roth S, Zorn M, et al. Acquired Immunoglobulin G deficiency in stroke patients and experimental brain ischemia. *Exp Neurol.* 2015; 271. 46-52. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.021.
7. Sahuquillo J, Poca MA, Amoros S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des.* 2001; 7(15). – 1475-503.
8. Greer JE, McGinn MJ, Povlishock JT. Diffuse traumatic axonal injury in the mouse induces atrophy, c-Jun activation, and axonal outgrowth in the axotomized neuronal population. *J Neurosci.* 2011; 31. 5089-105. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5103-10.2011.
9. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2013; 246. 35-43. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.013.
10. Foley N, Marshall S, Pikul J, et al. Hypermetabolism following moderate to severe traumatic acute brain injury: a systematic review. *J Neurotrauma.* 2008; 25(12). 1415-31. doi: 10.1089/neu.2008.0628.
11. Frankenfield D. Energy expenditure and protein requirements after traumatic injury. *Nutr Clin Pract.* 2006; 21(5). 430-7.
12. Timaru-Kast R, Wyszkon S, Luh C, et al. Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma. *Crit Care Med.* 2012; 40(3). 935-44. doi: 10.1097/CCM.0b013e31822f08b9.
13. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2010; 14. 2381-92. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x.
14. Elskyy VN, Ziablitshev SV. Design of brain injury [in Russian]. Donetsk; published by “New world”. 2008; 140 p.
15. Liu-DeRyke X, Collingridge DS, Orme J, et al. Clinical impact of early hyperglycemia during acute phase of traumatic brain injury. *Neurocrit Care.* 2009; 11(2). 151-7. doi: 10.1007/s12028-009-9228-6.
16. Salim A, Hadjizacharia P, Dubose J, et al. Persistent hyperglycemia in severe traumatic brain injury: an independent predictor of outcome. *Am Surg.* 2009; 75(1). 25-9.
17. McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, et al. Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 2001; 904(1). 20-30.
18. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490(1-3). 13-24.

Received 03.03.2016

Патологічні зміни серця за умов моделювання судомного синдрому різної етіології

Н.А. Колесова, Л.В. Натрус, Т.С. Брюзгіна, В.І. Литвиненко, Н.М. Сухарева, С.М. Чухрай

Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету ім.О.О. Богомольця, Київ; e-mail:Lnatrus@mail.ru

На щурах лінії Вістар проведено комплексне дослідження за допомогою гістохімічних, патоморфологічних, електронно-мікроскопічних і біохімічних методів з відтворенням електрошокової (n=30) та коразолової (n=20) моделей судомного синдрому, визначено основні механізми ушкодження міокарда. Вперше встановлено, що патологічні зміни серця за електрошокового (ЕШСС) та коразолового (КСС) судомного синдромів мають однонаправлений характер, але за першого ступінь їх проявів більша. Показано, що структурним підґрунтям становлення патології міокарда є поєднана зміна мікросудин і скоротливого міокарда з основним акцентом на розвитку контрактурних змін кардіоміоцитів та спазму міжм'язових капілярів, що зумовлює погіршення кровообігу та зменшення постачання кисню до робочих клітин. Структурні зміни міокарда розвиваються на фоні енергетичних зсувів, які гістохімічно виявляються вірогідним зниженням у кардіоміоцитах активності сукцинатдегідрогенази (з $2,65 \pm 0,03$ в контролі до $2,15 \pm 0,02$ од. за ЕШСС та до $2,25 \pm 0,02$ од. за КСС) та підвищенням –лактатдегідрогенази (з $2,20 \pm 0,01$ в контролі до $2,55 \pm 0,01$ од. за ЕШСС та до $2,45 \pm 0,01$ од. за КСС), що відображає розвиток у міокарді ознак тканинної гіпоксії. Біохімічно встановлене також зростання розпаду та зниження синтезу АТФ (на 43% за ЕШСС та на 41% за КСС). Усе це свідчить про наявність за відтворення електрошокової та коразолової моделей судомного синдрому гіпоенергетизму. Отримані результати комплексних досліджень дають змогу вважати, що адекватне раціональне лікування і профілактика судомного синдрому (великої та малої епілепсії) вимагає не тільки підбору антиконвульсантів, але і медикamentозної корекції найбільш порушених ланок енергетичного обміну за допомогою антигіпоксантів і антиоксидантів.

Ключові слова: електрошоковий та каразоловий судомний синдроми; серце; метаболізм; структура; патогенез.

ВСТУП

Розвиток епілептичних нападів зумовлений спонтанною локальною або генералізованою нестабільністю мембран кіркових нейронів, що може бути спричинено успадкованими чи вторинно набутими особливостями метаболічних процесів: дисбалансом збуджувальних і гальмівних нейротрансмітерів. В експериментальних умовах епілептична реакція, або ситуаційно зумовлені судомні напади, виникають за різних причин, найважливішими з яких є: подразнення головного мозку електричним

© Н.А. Колесова, Л.В. Натрус, Т.С. Брюзгіна, В.І. Литвиненко, Н.М. Сухарева, С.М. Чухрай

струмом, інтоксикації (отруєння), механічна черепно-мозкова травма, гостра гіпоксія тощо. Вважають, що провідним патогенетичним чинником цієї реакції є набряк мозку [1-4].

Клінічно виділяють 2 варіанти перебігу захворювання: велика і мала епілепсії. Велика епілепсія характеризується потужними нервовими розрядами в усіх ділянках головного мозку, напад продовжується не більше ніж 5 хв; свідомість при цьому глибоко порушена (кома). Мала епілепсія охоплює таламокортикальну активуючу систему мозку. У хворого

розвиваються судомні скорочення м'язів, зазвичай в ділянці голови, особливо мигання очей; судомний напад характеризується короткотривалим (декілька секунд) відключенням свідомості [3,5].

Показано, що в експериментальних умовах великий епілептичний напад відповідає електрошоковому судомному синдрому (ЕШСС), а малий – коразоловому (КСС). Стан внутрішніх органів в таких ситуаціях мало досліджений, що утруднює оцінку механізмів розвитку цієї патології і розробку адекватних лікувальних фармакологічних схем [6,7]. Незважаючи на існуючий інтерес до досліджень, присвячених проблемі судомного синдрому, багато аспектів патогенезу, діагностики, перебігу та фармакологічної корекції цієї патології вивчені недостатньо. Створення моделей судомних станів, адекватних клінічному еквіваленту, нині розглядається як один з найбільш перспективних шляхів, що дає змогу не тільки наблизитися до розуміння патофізіологічних механізмів епілептогенезу, але й розробити на їх основі способи раціональної терапії. Проте в літературі практично відсутні дані щодо об'єктивізації патології в життєво важливих органах і, особливо, серці під час нападу судом від функціональної активності якого залежить життєдіяльність організму в цілому.

Мета нашої роботи – вивчити механізми розвитку патології серця за ЕШСС і КСС.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою 170-200 г. Електрошокову модель відтворювали (n=30) дією електричного струму силою 50 мА впродовж 0,5 с раз на тиждень протягом 3 міс, коразолову модель (n=20) – введенням коразолу (пентілентетразол, «Sigma», США) внутрішньоочеревинно в дозі 80 мг/кг одноразово. Про модель судили за наявністю клінічних ознак судомного синдрому: ЕШСС – розвитку клоніко-тонічних судом зі втратою

свідомості і за КСС – розитком орально-лицьових судом і окремих посмикуваннях скелетної мускулатури тулуба без втрати свідомості.

Гістохімічне вивчення активності окисно-відновних ферментів у міокарді проводили на кріостатних зрізах свіжозамороженої тканини серця товщиною 10 мкм. Досліджували активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) за Нахласом і співавт., лактатдегідрогенази (ЛДГ) за Гессом, Скарпеллі і Пірсом, а також НАД-Н ДГ та НАДФ-Н ДГ за Фарбером. Активність ферментів вивчали напівкількісним методом. Гістохімічні методи та контролю до них взяті з посібника Пірс [8]. Патоморфологічне та електронно-мікроскопічне дослідження проведені за загальноприйнятими методиками.

Вміст аденілових нуклеотидів у міокарді щурів визначали методом високовольтного електрофорезу на папері з наступною спектрофотометрією при довжині хвилі 260 та 290 нм. На підставі отриманих результатів розраховували показники, які характеризують стан енергетичного обміну: суму аденілових нуклеотидів АТФ, АДФ і АМФ, співвідношення АТФ/АДФ, аденілатний енергетичний заряд Аткинсона (АЕЗ) за формулою $АЕЗ = (АТФ + 1/2 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$; індекс фосфорилування (ІФ) за співвідношенням $ІФ = АТФ / (АДФ + АМФ)$; порівнювальний коефіцієнт (Кпор.) за формулою $Кпор. = (АТФ + АМФ) / АДФ$ [9,10]. Вірогідність отриманих результатів оцінювалася за критерієм t Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічне вивчення змін у серці щурів після відтворення ЕШСС протягом 3 міс показало розвиток у міокарді комплексу патологічних процесів. У різних відділах міокарда виявлявся вогнищевий набряк саркоплазми і ядер кардіоміоцитів, розпушення міофібрил. Поперечна посмугованість

саркоплазми кардіоміоцитів у таких локусах слабо або зовсім не контурується. В деяких ділянках виявляються ознаки контрактурних змін кардіоміоцитів, котрі часто поєднуються з пікнотичними змінами ядер, які зменшені в розмірах і гіперхромні.

Спостерігалось локальне нерівномірне розширення просвітів міжм'язових капілярів і заповнення їх елементами крові. Але на більшій площі гістологічних зрізів серця капіляри спазмовані, не містять формених елементів крові, що може бути підґрунтям ішемізації міокарда і розвитку в ньому гіпоксії.

Моделювання ЕШСС не викликало в міокарді особливих клітинних реакцій, за виключенням вогнищового помірного збільшення кількості тканинних базофілів навколо мікросудин. Частина тканинних базофілів знаходилася в стадії дегрануляції, що може свідчити про напруженість у серці за ЕШСС місцевих регуляторних систем.

Міжм'язова сполучна тканина в деяких місцях розпушена, помірно набрякла. Мікроскопічно виявляється також ознаки незначного вогнищового збільшення кількості колагенових волокон, які розподіляються переважно навколо міжм'язових мікросудин.

Вказані структурні зміни міокарда поєднуються з метаболічними порушеннями, зокрема – енергетичного обміну (табл. 1, рис. 1).

Так, активність СДГ у кардіоміоцитах правих і лівих відділів серця вірогідно знижується з $2,65 \pm 0,03$ до $2,15 \pm 0,02$ од. При цьому відбувається зменшення кількості темно-синіх зерен диформазау, нерівномір-

не збільшення їхніх розмірів (див. рис. 1, а, б). Водночас підвищується активність ферментів гліколізу, про що свідчить збільшення в саркоплазмі кардіоміоцитів зерен кінцевого продукту гістохімічної реакції, а також лінійного диформазау з $2,2 \pm 0,04$ од. у контролі, до $2,55 \pm 0,01$ од. у дослідних тварин (див. рис. 1, г, д). Встановлене підвищення в кардіоміоцитах активності ЛДГ в умовах погіршеного кровопостачання в кардіоміоцити кисню можна розцінювати як розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій при зниженні тканинного дихання. Таке підвищення рівня гліколізу спричинює лише незначне зниження активності метаболічних шляхів термінального окиснення, що документується зниженням активності НАД-Н ДГ з $2,70 \pm 0,03$ од. в контролі до $2,60 \pm 0,02$ од. в експерименті. Порівняльний аналіз механізмів розвитку ушкодження серця за ЕШСС та КСС показав, що за умов виникнення судом різної етіології основні механізми розвитку збігаються, але ступінь енергетичних зсувів і структурних змін вища за відтворення ЕШСС, хоча різниця і не вірогідна (рис. 1, в, е).

Деталізація патологічних змін у серці за ЕШСС і КСС проведена за допомогою методу електронної мікроскопії. Ультраструктурний аналіз показав, що під впливом судом, що моделювалися, міокард зазнає змін, які мають різну ступінь структурних порушень. Ділянки зі значними змінами чергуються з менш зміненими. Найбільш характерною особливістю ультраструктури кардіоміоцитів є їх перескорочення (рис. 2). Ознаками цього є зменшені розміри та округла або витягнута, залежно від площини зрізання, форма цих

Таблиця 1. Гістохімічний показник активності (од.) окисно-відновних ферментів в міокарді щурів з моделлю електрошокового та коразолового судомного синдрому ($M \pm m$; $n=7$)

Група тварин	Сукцинатдегідрогеназа	Лактатдегідрогеназа	НАД-Н ДГ
Контроль	$2,65 \pm 0,03$	$2,20 \pm 0,01$	$2,70 \pm 0,03$
Електрошоковий судомний синдром	$*2,15 \pm 0,02$	$*2,55 \pm 0,01$	$2,60 \pm 0,02$
Коразоловий судомний синдром	$*2,25 \pm 0,02$	$*2,45 \pm 0,01$	$2,65 \pm 0,02$

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

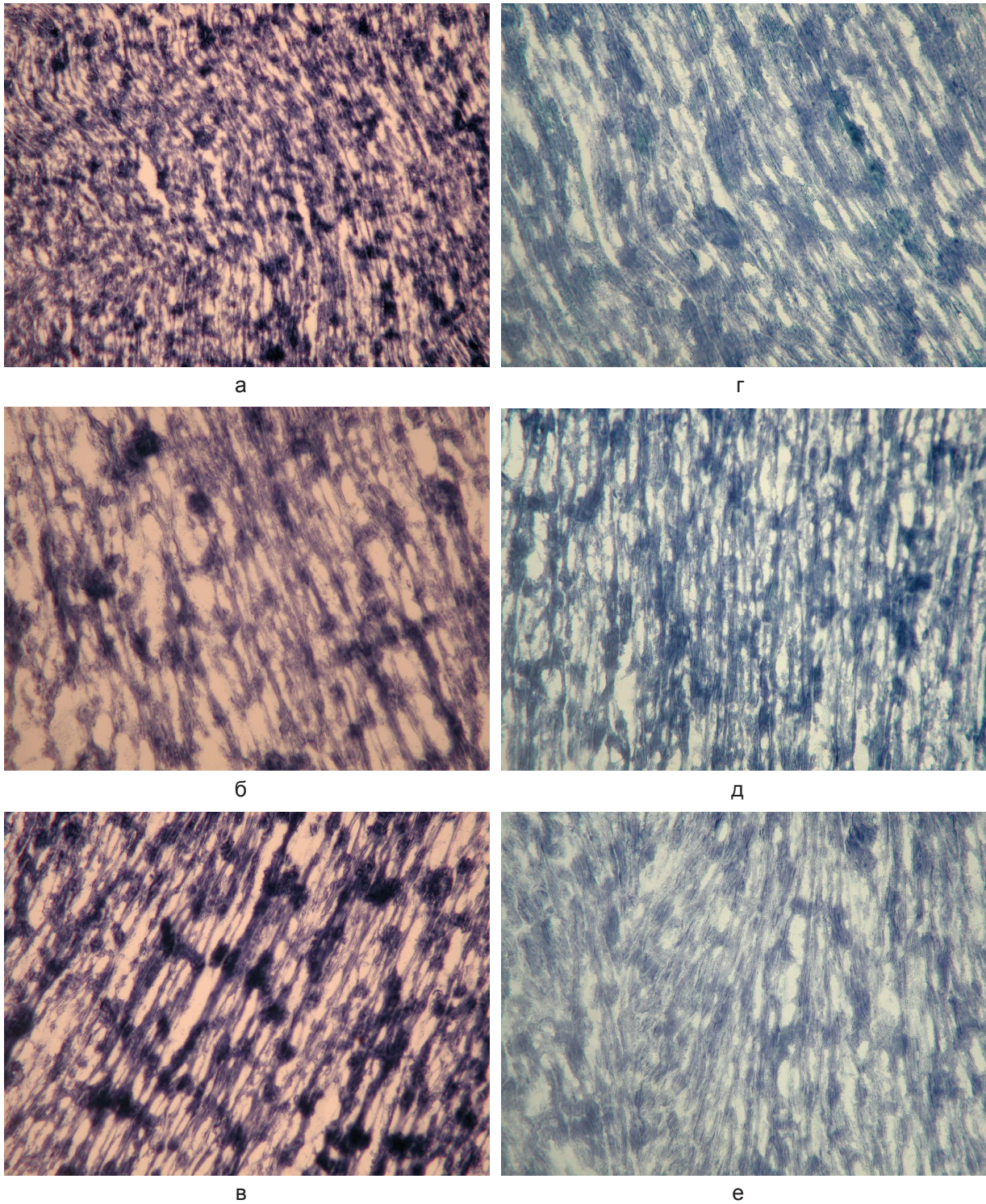


Рис. 1. Зміни активності ферментів дихання та гліколізу в кардіоміocyтах лівого шлуночка серця щурів за електрошокового та коразолового синдромів:

а, б, в – сукцинатдегідрогеназа; г, д, е – лактатдегідрогеназа; а, г – контроль, б, д – електрошоковий судомний синдром, в, е – коразоловий. Зб.: а, б, в, д – об. 10, ок. 10; г, е – об. 20, ок. 10

клітин, складчастість їх сарколемальної поверхні, стан міофібрилярного апарату. В кардіоміоцитах спостерігаються порушення типової будови саркомерів, які набувають різної поширеності і виразності. Більшість саркомерів мають зменшені розміри, внаслідок зближення Z-ліній. Навіть у межах однієї клітини можна спостерігати ділянки нерівномірно скорочених саркомерів і саркомерів з дилатованими міофібрилами. Подекуди ділянки Z-ліній, де кріпляться актинові міофібрили, потовщені, деструктуровані, як і самі міофібрили.

Зазнають змін і вставні диски, в яких відмічається збільшення довжини десмосомальних контактів при зменшенні відстані між ними, тобто зменшується протяжність простих контактів. У кардіоміоцитах без ознак перескорочення порушується паралельний хід міофібрил, їх розходження та локальний лізис. Усе це свідчить про суттєві порушення скорочувальної функції в міокарді лівого шлуночка. Слід відмітити, що всі ці зміни відбуваються на фоні ушкоджень в енергетичному апараті кардіоміоцитів – мітохондріях, в яких розвивається патологія мембран, особливо внутрішніх (див. рис.2).

Просвіт багатьох кровоносних мікросудин заповнений форменими елементами крові та коагульованою плазмою, що є ознакою розвитку гіпоксичного стану в міокарді. Ендотеліоцити мозаїчні за ультраструктурою, внаслідок появи клітин з підвищеною електронною щільністю, в яких не можливо розрізнити органели, що є проявом апоптозу. Витонченість периферичних ділянок ендотеліоцитів є компенсаторною реакцією, спрямованою на зменшення шляхів трансцитозу.

Аналіз отриманих результатів ультраструктурних досліджень за двох моделей показав, що направленість і характер субклітинних змін міокарда однакові, однак ступінь їх прояву менша за відтворення КСС. Це також свідчить про більшу ймовірність зворотного розвитку патологічних змін міокарда за цієї моделі, котра, як відомо, в клініці відображає зміни, що характерні для малої епілепсії.

Паралельно з гістохімічним вивченням енергетичного обміну в серці дослідних тварин були також впроваднені біохімічні дослідження, які показали, що через 3 міс після моделювання ЕШСС у серці щурів відмічено значне зниження АТФ (на 43%) і суми аденілових нуклеотидів (на 28%) порівняно з інтактною групою та зниження

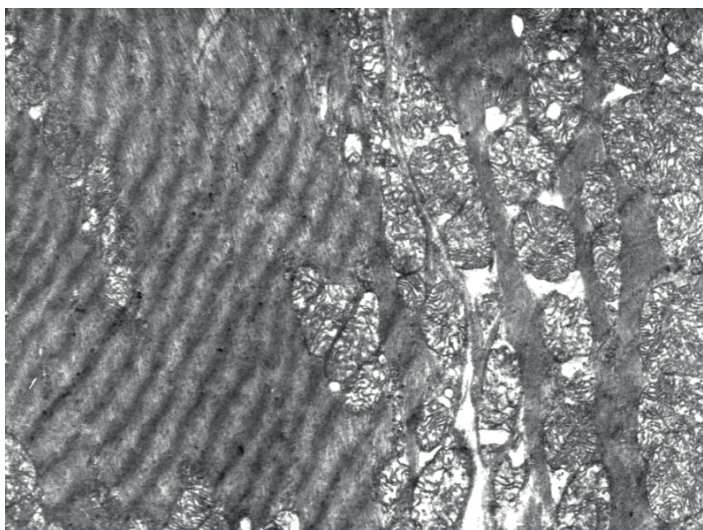


Рис. 2. Контрактурні зміни кардіоміоцита та деструкція крист мітохондрій лівого шлуночка за електрошокового судомного синдрому. Електронна мікрофотографія. 36.: 18000

АДФ (на 21%) і суми аденілових нуклеотидів (на 16%; табл. 2).

Проведені порівняльні біохімічні дослідження показали, що в серці щурів після відтворення моделі коразолових судом вірогідно знижується вміст АТФ (на 41%), АДФ (на 49%), АМФ (на 58%) і суми аденілових нуклеотидів (на 48%) порівняно з інтактною групою тварин. Розрахункові показники не відрізнялися від контролю.

Аналіз проведених досліджень свідчить, що за моделювання коразолових судом спостерігається послаблення енергоутворювальної функції мітохондрій кардіоміоцитів і депресія в них енергообміну, яка характеризується, перш за все, суттєвим зниженням вмісту АТФ. Концентрація АДФ і АМФ у серці щурів також була зниженою після відтворення патологічного процесу. Отримані результати свідчать про наявність синдрому гіпоенергетизму при ЕШСС та КСС і узгоджуються з даними інших авторів про пригнічення енергетичного обміну в тканинах мозку щурів з генералізованими нападами судом, що викликаються дією електричного подразника [10] та в плазмі крові у хворих на епілепсію [11].

Дезорганізація енергетичного обміну відіграє істотну роль у патогенезі епілепсії. Енергозабезпечення епілептичного нападу,

ліквідація його наслідків, а також запуск природних протиепілептичних систем можуть призвести до виснаження енергетичних запасів організму. Отримані нами результати узгоджуються з даними Dubenko і співавт. про те, що в плазмі крові у хворих на епілепсію виявлено пригнічення енергетичного обміну, яке проявляється зниженням інтенсивності окисно-відновних процесів, пригніченням процесів окисного фосфорилування і виснаженням запасів АТФ, активацією менш ефективних шляхів вироблення енергії і активацією вільнорадикального окиснення [11]. Дані інших авторів також свідчать, що у щурів епілептична активність, яка супроводжується генералізованими нападами судом, що викликаються дією електричного подразника, призводить до зниження синтезу АТФ у тканинах мозку. Зазначені зміни найбільш істотно виражені в корі великих півкуль [13].

Порівняльний аналіз результатів комплексного дослідження ЕШСС і КСС показав, що в серці дослідних тварин спостерігається депресія енергообміну. Це може свідчити про роз'єднання окиснення і фосфорилування в дихальному ланцюзі мітохондрій і наступному пригніченні енергосинтезувальних процесів; а також, можливо, порушення збалансованості процесів окисного фосфорилування та гліколізу.

Таблиця 2. Вміст аденілових нуклеотидів у міокарді щурів з моделлю електрошокового та коразолового судомного синдрому ($M \pm m$)

Аденілові нуклеотиди	Контроль (n=8)	Судомний синдром	
		електрошоковий (n=10)	коразоловий (n=6)
АТФ, ммоль/кг	2,35±0,42	1,35±0,15*	1,38±0,09*
АДФ, ммоль/кг	1,84±0,16	1,44±0,12	0,94±0,09*
АМФ, ммоль/кг	1,47±0,15	1,24±0,13	0,62±0,06*
Сума АТФ, АДФ і АМФ, ммоль/кг	5,66±0,39	4,06±0,18*	2,94±0,17*
АТФ/АДФ	1,30±0,13	1,05±0,14	1,61±0,18
Аденілатний енергетичний заряд Аткінсона	0,57±0,02	0,63±0,09	0,63±0,02
Індекс фосфорилування	0,71±0,07	0,58±0,09	0,92±0,07
Порівняльний коефіцієнт	2,19±0,21	1,92±0,15	2,35±0,30

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Таким чином, епілепсія – це полісистемне захворювання і його лікування вимагає не тільки адекватного підбору антиконвульсантів, але і медикаментозної корекції найбільш порушених ланок обміну та підтримки основних показників гомеостазу організму. Отримані результати свідчать про спільність направленості і характеру енергетичних і структурних змін у міокарді за ЕШСС і КСС, що в клініці відповідає великій та малій епілепсії і вимагає відповідного підходу до комплексного її лікування.

ВИСНОВКИ

Патологічні зміни серця за ЕШСС і КСС мають однонаправлений характер, але ступінь їх проявів більша за першого.

Структурним підґрунтям становлення патології міокарда є поєднана зміна мікросудин та скоротливого міокарда з основним акцентом на розвитку контрактурних змін кардіоміоцитів та спазму міжм'язових капілярів, що зумовлює погіршення кровообігу та зменшення постачання кисню до робочих клітин.

Структурні зміни міокарда розвиваються на фоні енергетичних зсувів, які гістохімічно виявляються вірогідним зниженням в кардіоміоцитах активності СДГ та підвищенням – ЛДГ, що відображає розвиток у міокарді ознак тканинної гіпоксії. Біохімічно встановлене також зростання розпаду та зниження синтезу АТФ. Усе це свідчить про наявність за відтворення електрошокової та коразолової моделей судомного синдрому гіпоенергетизму.

Адекватне раціональне лікування і профілактика судомного синдрому (великої та малої епілепсії) вимагає не тільки підбору антиконвульсантів, але і медикаментозної корекції найбільш порушених ланок енергетичного обміну за допомогою антигіпоксантів і антиоксидантів.

Н.А. Колесова, Л.В. Натрус, Т.С. Брюзгіна, В.І. Литвиненко, Н.М. Сухарева, С.М. Чухрай

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕРДЦА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

На крысах линии Вистар проведено комплексное исследование с помощью гистохимических, патоморфологических, электронно-микроскопических и биохимических методов с воспроизведением электрошоковой ($n = 30$) и коразоловой ($n = 20$) моделей судорожного синдрома определены основные механизмы повреждения миокарда. Установлено, что патологические изменения сердца при электрошоковом и коразоловом судорожном синдромах (ЭШСС и КСС) имеют однонаправленный характер, но степень их проявлений больше при первом. Структурной основой развития патологии миокарда является параллельное изменение микрососудов и сократительного миокарда с основным акцентом на развитии контрактурных изменений кардиомиоцитов и спазма межмышечных капилляров, что обуславливает ухудшение кровообращения и уменьшение снабжения кислородом рабочих клеток. Структурные изменения миокарда развиваются на фоне энергетических сдвигов, гистохимически выявляющихся достоверным снижением в кардиомиоцитах активности сукцинатдегидрогеназы (с $2,65 \pm 0,03$ ед. в контроле до $2,15 \pm 0,02$ ед. при ЭШСС и до $2,25 \pm 0,02$ ед. при КСС) и повышением – лактатдегидрогеназы (с $2,20 \pm 0,01$ ед. в контроле до $2,55 \pm 0,01$ ед. при ЭШСС и до $2,45 \pm 0,01$ ед. при КСС), что отражает развитие в миокарде признаков тканевой гипоксии. Биохимически установлено также рост распада и снижение синтеза АТФ (на 43% при ЭШСС и на 41% при КСС). Все это свидетельствует о наличии гипознергетизма. Полученные результаты комплексных исследований позволяют считать, что адекватное рациональное лечение и профилактика судорожного синдрома (большой и малой эпилепсии) требует не только подбора антиконвульсантов, но и медикаментозной коррекции наиболее нарушенных звеньев энергетического обмена с помощью антигипоксантов и антиоксидантов.

Ключевые слова: электрошоковый и коразоловый судорожный синдромы; сердце; метаболизм; структура; патогенез.

N. Kolesova, L. Natrus, T. Bryuzhina, V. Lytvynenko, N. Suhareva S. Chukhrai

PATHOLOGICAL CHANGES DEVELOPMENT IN THE HEART WITH UNDERLYING CONVULSIVE SYNDROME MODEL OF VARIOUS ETIOLOGIES

The basic mechanisms of myocardial damage were determined experimentally in case of electroconvulsive ($n = 30$) and corazole ($n = 20$) induced seizures in Wistar rats by

histochemical, pathological, electron microscopy and biochemical methods.

It has been founded that pathological changes in the myocardium underlying with electroconvulsive and corazole induced seizures have unidirectional origin; nevertheless electroconvulsive model has more intensity. It has been shown that structural base of myocardial pathology development results in parallel changes of microvessels and contractile myocardium with the main focus on development of contractile changes of cardiomyocytes and intramuscular capillaries spasm, which causes blood flow impairment and reducing supply of oxygen to the working cells. Structural changes in the myocardium develop due to energy shifts which have been elucidated by confirmed decrease SDG in cardiac activity (control $2,65 \pm 0,03$ act. Units; electroconvulsive model $2,15 \pm 0,02$ act. Units; and corazole model $2,25 \pm 0,02$ act. Units), and increased - LDH (control $2,20 \pm 0,01$ act. Units. electroconvulsive model $2,55 \pm 0,01$ act. Units; corazole model $2,45 \pm 0,01$ act. Units.) histochemically, showing evidence of hypoxia progression in the myocardium tissue. It has been also shown processes of increasing degradation as well as reducing synthesis of ATP biochemically (43% electroconvulsive model and 41% corazole model). All this results indicate the presence of hypoenergetics in case of electroconvulsive and corazole experimental models of seizures. The received results of complex researches allow considering that adequate and rational treatment and prevention of seizures (large and small epilepsy) requires anticonvulsants choose as well as drug correction of the most affected parts of energy metabolism via antihypoxants and antioxidants administration. Key words: electroconvulsive and corazole convulsive syndromes; heart; metabolism; structure; pathogenesis.

Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of O.O.Bogomolets National Medical University, Kyiv

REFERENCES

1. Shprakh VV, Synkov AV, Synkova HM. Cerebrogenic disorders of rhythm and conduction of heart in patients with epilepsy. Zhurn nevrol v psykhyatrii im. S.S. Korsakova 2000; 9:16-20. [Russian].
2. Tiqaran S, Molqaard H, McClelland R., Jaffe AS. Evidence of cardiac ischemia during seizures in drug refractory epilepsy patients. Neurology. 2003; 3:492-5.
3. Braun T, Kholens H, Epilepsy. Clinical manual. Translation from English. 2006; Moscow; "BINOM". [Russian].
4. Hafurov BH, Abdurakhmanova ND, Cardiovascular disorders in patients with various clinical forms of epilepsy. Int. Nevroloi J. 2009; 7:29-33. [Russian].
5. Eriksson AS, Knutsson E, Nergardh A, The effect of lamotrigine on epileptiform discharges in young patients with drug-resistant epilepsy. Epilepsia. 2001; 2: 230-6.
6. Sereda PI, Kolesova NA, Arshynnikova LL, Antonenko LI, The basic mechanisms of myocardial pathology development in case of experimental convulsive syndrome. Naukovyi visnyk NMU im. O.O.Bohomoltsia. 2011; 3: 32-38. [Ukrainian].
7. Kolesova NA, Khaitovych NV, Arshynnikova LL, Antonenko LI, Metabolic and structural changes of heart and erythrocytes in white rats with corazole induced seizures. Naukovyi visnyk NMU im. O.O.Bohomoltsia. 2013; 1: 9-14. [Ukrainian].
8. Pyrs E, Histochemistry, theoretical and applied. 1962; Moscow. [Russian].
9. Bazarnova MA, Clinical laboratory diagnostics: practical lessons of clinical biochemistry. 1994; Kyiv. [Ukrainian].
10. Hubskey YuY, Frantsuzova SB, Maidannyk VH, Arshynnikova LL, Informational letter "Method of determination of adenylic nucleotides in the cellular elements of peripheral blood" on the issue of "Biological and medical chemistry". 1987; Kiev. [Russian].
11. Dubenko AE, The state of activity of organ-specific enzymes in patients with epilepsy. Zhurnal psykhyatrii i medytsynskoi psykholohii. 1999; 1: 41-46. [Russian].
12. Dubenko AE, The role of energy metabolism disorders in the development of epileptic encephalopathy. Zhurnal psykhyatrii i medytsynskoi psykholohii. 2000; 1: 92-4. [Russian].
13. Pohodaeva VK, Tumanova LN, Oxidative phosphorylation in the cortex and brainstem in phases and electroconvulsive audiogenic seizures in rats. Ukr. biokhimichni zhurnal. 1974; 2:107-112. [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 08.09.2015*

Підвищення рівня спряження конститутивних NO-синтаз і вмісту гемоглобіну в еритроцитах старих тварин залізовмісним фітопрепаратом

С.І. Уретій¹, А.В. Коцюруба², Б.С. Коп'як²

¹Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України, Київ;

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: kopyak@biph.kiev.ua

In vivo досліджували дію залізовмісного препарату Урфугем на вміст гемоглобіну в крові старих щурів. Для встановлення біохімічних механізмів дії препарату визначали показники оксидативного і нітрозативного стресу, рівні спряження конститутивних NO-синтаз (cNOS) і вміст сірководню (H_2S) в плазмі та еритроцитах, вміст негемового заліза в плазмі і чутливість еритроцитів до кислотного гемолізу. Встановлено високі рівні надлишкового синтезу NO в крові старих тварин внаслідок реутилізації нітрат-аніона (NO_3^-) нітратредуктазою і *de novo* синтезу NO індукційною NOS (iNOS), які не знижувалися препаратом. Вірогідно, дія останнього підвищувала рівень спряження cNOS у плазмі та еритроцитах, знижувала вміст гемоглобіну в еритроцитах та підвищений у них за старіння вміст H_2S , а також знижувала стійкість останніх до кислотного гемолізу. Зафіксовано і зниження в еритроцитах при дії препарату швидкості генерації супероксидного аніон-радикала ($*O_2^-$) і вмісту стабільного пероксиду водню (H_2O_2), які у старих тварин значно перевищували контрольні значення. Дія урфугему не спричинявала зниження високих рівнів генерації гідроксильного радикала ($*OH$) і пулів стабільного метаболіту оксиду азоту (NO_3^-) в еритроцитах. Отримані результати вказують на те, що причиною підвищення проникливості протона (H^+) в еритроцити, яким викликається їх кислотний гемоліз, за дії препарату може бути зміна співвідношення рівнів оксидативного і нітрозативного стресу в них, збільшення у бік останнього. Таким чином, генерація токсичного $*OH$ у крові старих тварин здійснюється не за рахунок класичної реакції Фентона за наявності Fe^{2+} , а внаслідок утворення і розпаду пероксинітриду.

Ключові слова: гемоглобін; еритроцити; кислотний гемоліз; оксидативний і нітрозативний стрес; препарат; старі щури.

ВСТУП

Раніше ми показали [1], що еритроцити старих щурів мають підвищену проникність для протона внаслідок можливої активації кальцій-протонного обмінника (т.з. Ca^{2+} -АТ-Фази плазматичної мембрани), це у свою чергу може викликати їх кислотний гемоліз при зниженні рН крові. Однією з причин зниження стійкості до кислотного гемолізу є наявність у еритроцитів старих тварин оксидативно/нітрозативного стресу, тобто підвищеної генерації супероксиду (O_2^-) і надлишкового оксиду азоту (NO) [2]. Відомо, що при гемолізі еритроцитів звільняється АТФ

© С.І. Уретій., А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як

[3], який активує ендотеліальну NO-синтазу (eNOS) [4], але руйнування плазматичної мембрани еритроцитів (гемоліз) і звільнення гемоглобіну має за наслідок утворення газового трансмітера оксиду вуглецю (CO) через руйнування гему гемоксидазою [5], так і сприяє підвищенню синтезу гемоглобіну [6]. В еритроцитах інтенсивно синтезується не лише NO при відновленні нітрит-аніона (NO_2^-) дезоксигемоглобіном [7], але і H_2S ферментом меркаптопіруватсульфотрансферазою (MPST) [8]. Недавно встановлено, що не лише NO окиснюється в еритроцитах оксигемоглобіном до нітрат-аніона (NO_3^-)

[9], але і H_2S [10] до тіосульфату ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$) і полісульфідів $((\text{H}_2\text{S})_n)$. Тим самим еритроцити як і мітохондрії здатні здійснювати детоксикацію H_2S , високий вміст якого надзвичайно токсичний, в першу чергу внаслідок інгібування дихання в мітохондріях [11,12]. Оскільки в зрілих еритроцитах мітохондрії відсутні, очевидно саме вони як і мітохондрії інших клітин можна вважати основним місцем детоксифікації H_2S . Аналогічні припущення стосуються і NO, високий вміст якого в еритроцитах не є токсичним, а одним із основних місць-депо контрольованого ферментативного окиснення та синтезу. В механізмах реалізації регуляторних функцій NO важливу роль відіграє його взаємодія із залізом в активних центрах ферментів-мішеней розчинної гуанілатциклази, каталази, окси- і дезоксигемоглобіну тощо. [13]. Досліджуваний препарат урфугем містив залізо і аскорбінову кислоту, яка бере участь в регенерації глутатіону (відновленні окисненого глутатіону).

Метою нашої роботи було визначити вплив препарату на вміст гемоглобіну в крові, інтенсивність оксидативного і нітрозативного стресу в еритроцитах і в плазмі, яка їх оточує, а також на залежну від останнього стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 дорослих безпородних щурах віком 6 міс і 10 старих віком 24 міс. Старих щурів розділяли на дві групи по 5 тварин у кожній. Тваринам контрольної групи згодовували протягом 14 діб стандартний раціон віварію, тоді як тваринам дослідної групи замість питної води давали водний розчин залізовмісного препарату урфугем з розрахунку по 0,1мг/кг. Крім Fe^{2+} препарат містить сухий екстракт кропиви дводомної і аскорбінову кислоту. Через 14 діб тварин декапітували, забирали кров, з якої центрифугуванням виділяли еритроцити і збагачену лейкоцитами плазму. Суспензію еритроцитів крові дорослих, контрольних і дослідних

старих щурів в ізотонічному середовищі 0,14 М NaCl використовували для проведення кінетичного аналізу кислотного гемолізу [14], який детально описаний нами раніше [15].

Вміст гемоглобіну в цільній крові і негемового заліза (Fe) в плазмі крові визначали за допомогою вітчизняних клінічних тест-добірок фірми «Філісіт-діагностика» (Дніпропетровськ). В наборі для дослідження вмісту загального заліза та вільного негемового заліза використовували тріс-HCl-буфер (pH 7,4). Біохімічні показники оксидативного стресу (швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$, пули H_2O_2 , сечової кислоти, тромбоксану B2, пептидолейкотрієну C_4 , дієнових конюгатів і малонового діальдегіду, як і нітрозативного стресу (сумарну активність конститутивних (ендотеліальної і нейрональної) NO-синтаз, $\text{cNOS}=\text{eNOS}+\text{nNOS}$; активність iNOS і НАДН-залежну нітратредуктазну активність; пули NO_3^- і H_2S визначали в плазмі крові і в гемолізатах еритроцитів [16]. Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV „Про захист від жорстокого поводження” та відповідно до етичних норм і правил роботи з лабораторними тваринами. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США)

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кислотна резистентність характеризує роботу кальцій-протонного обмінника плазматичної мембрани еритроцитів за дії різних факторів у період старіння. Роботу цього обмінника оцінювали за статистично обробленими кінетичними показниками гемолізу (таблиця).

Як видно з таблиці і рис.1, стійкість еритроцитів старих тварин до кислотного гемолізу після двотижневого вживання препарату знижувалася, тобто проникність протона через плазматичну мембрану зростала. На це вказує зниження загальної тривалості гемо-

Показники кінетичних кислотних еритрограм щурів досліджених груп (М ± m)

Показник	Дорослі щури (n=10)	Старі щури	
		контроль (n=5)	препарат (n=5)
Інтегральний індекс стійкості, ум.од.	486,15 ± 32,42	246,27 ± 19,35*	159,83 ± 7,18*/**
Тривалість гемолізу, хв	13,81 ± 1,60	5,9 ± 0,37*	2,80 ± 0,27*/**
Частка лабільних клітин (гемоліз до 2,5хв), %	12,06 ± 1,38	67,38 ± 12,09*	99,35 ± 0,47*/**
Частка стабільних клітин (гемоліз після 7,5хв), %	28,1 ± 3,1	1,51 ± 0,22*	0 ± 0

лізу (від $5,9 \pm 0,37$ до $2,80 \pm 0,27$ хв) та інтегрального індексу стійкості (від $246,27 \pm 19,35$ до $159,83 \pm 7,18$ ум.од.) і, навпаки, збільшення частки лабільних «старих» еритроцитів (від $67,38 \pm 12,09$ до $99,35 \pm 0,47\%$ у сумарній популяції еритроцитів (див. таблицю). І в свою чергу свідчить про активацію роботи кальцій-протонного обмінника, т.з. Ca^{2+} -АТФази. Як відомо [2], проникність плазматичної мембрани еритроцитів для різних речовин, в т.ч. для H^+ , знаходиться під контролем активних форм кисню (АФК) і азоту (АФА), які неспецифічно окиснюють ліпідні і специфічно білкові компоненти плазматичних мембран. Ми дослідили зміни показників, що характеризують інтенсивність окисдативного і нітрозативного стресу, котрі виникають при підвищенні генерації АФК і АФА в плазмі

(див. рис.3,а, рис.4,а) і еритроцитах (рис.3,б, рис.4,б) старих щурів за дії препарату. Його вживання викликало значне зниження в еритроцитах швидкості генерації O_2^- (на 37%) і пулів H_2O_2 (на 59%; див. рис.3,б), а в плазмі крові зниження пулів H_2O_2 (на 72%) і, навпаки, підвищення пулів негемового заліза (на 68%) і ще значніше (в 3 рази) активності cNOS (конститутивного кальційзалежного de novo синтезу NO із L- аргініну (рис.4,а). Отже, активація кальцій-протонного обмінника (підвищення протонної проникливості) еритроцитів за дії урфугему призводила до зниження їх стійкості до кислотного гемолізу. При цьому підвищувався вміст негемового заліза в плазмі і змінювалося співвідношення в інтенсивності генерації АФК та АФА на користь останніх як в плазмі, так і в ери-

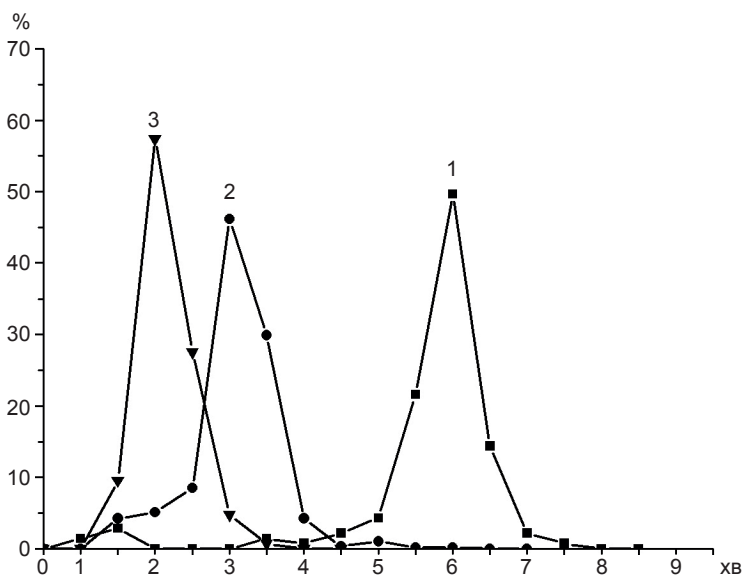


Рис. 1. Кислотні еритрограми щурів за різних умов експерименту: 1- дорослі щури, 2- контрольні старі щури, 3- старі щури, що отримували урфугем; за віссю абсцис – тривалість гемолізу, за віссю ординат – рівень гемолізу.

троцитах. Такі зміни за дії препарату мали за наслідок вірогідне (на 40%) підвищення вмісту гемоглобіну (див. рис.2,а) і індексу спряження cNOS (див. рис.2,б). Розглянемо можливий внесок кожного із вищевказаних препаратозалежних змін у підвищенні вмісту гемоглобіну. Стосовно підвищення кальцій-протонного обміну і кислотного гемолізу еритроцитів існує в медичному середовищі стала думка про те, що саме руйнування еритроцитів, через гемоліз, забезпечує максимальне посилення синтезу гемоглобіну. Причиною цього може бути також зафіксова-

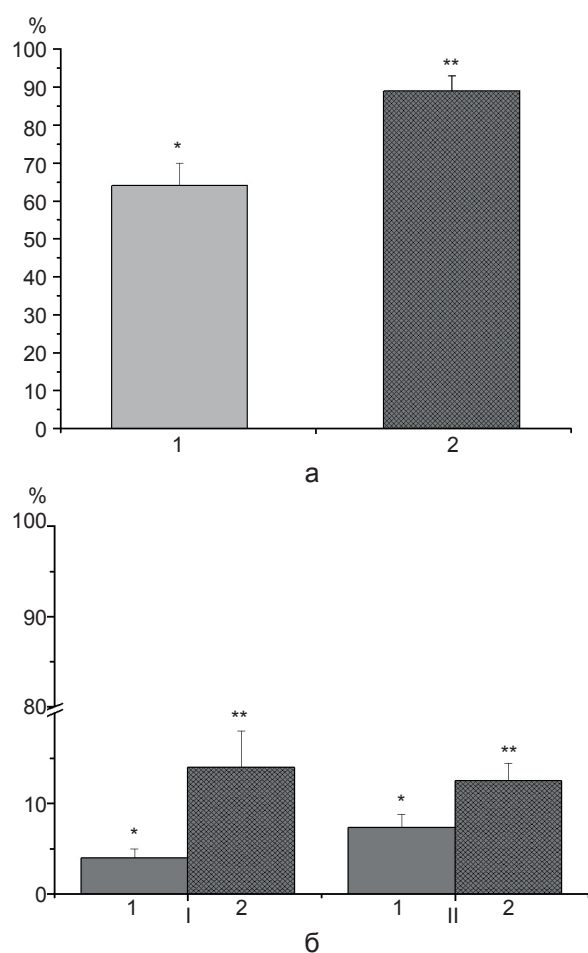


Рис.2. Дія препарату урфугему на вміст гемоглобіну в цільній крові старих щурів (а) та індекс спряженості конститутивної NO-синтази (б) в плазмі (I) й еритроцитах (II) крові: 1-контроль, 2-препарат. Лінією позначено вміст гемоглобіну у дорослих щурів (100%). * $P < 0,05$ відносно дорослих, ** $P < 0,05$ відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

не нами значне підвищення активності cNOS у плазмі крові (див. рис.4,а), але не в самих еритроцитах (див. рис.4,б) у старих щурів за дії урфугему, внаслідок можливого звільнення при їх гемолізі АТФ, який діє на ці ферменти синтезу NO через свої пуринорецептори на плазматичних мембранах лейкоцитів [17]. У разі дії препарату більш ніж у 3 рази підвищувався індекс спряження cNOS в плазмі крові старих тварин (див. рис.2,б), що свідчить про збільшення частки конститутивного кальційзалежного *de novo* синтезу NO, а не $*O_2^-$ із L-аргініну, яке здійснюють ці ферменти у неспряженому стані у старих тварин. Дія урфугему щодо спряженого стану cNOS в еритроцитах була менш ефективною (див. рис.2,б). Окисний (як оксидативний, так і, особливо, нітрозативний) стрес, який спостерігається за умов старіння [2], є його першопричиною [18], і також мішенню дії препарату. На це вказує зафіксоване зниження генерації $*O_2^-$ в еритроцитах і пулів H_2O_2 як в еритроцитах, так і в плазмі (див. рис.3,а,б). Не виключено, що причиною такого зниження швидкості генерації $*O_2^-$ є підвищення спряженості ферментів cNOS (eNOS чи/і nNOS), більш значного в плазмі крові. В свою чергу підвищення спряженими ферментами синтезу NO в плазмі може бути одним із індукторів підвищення в крові вмісту гемоглобіну (а, отже, можливо, і швидкості його синтезу *de novo*) у старих щурів за дії урфугему. Також важливою не лише в підвищенні пулів гемоглобіну, але і його функційних властивостей, які залежать від процесу глутатіонування [19], може бути роль H_2S , яка ще не з'ясована, але класичну функцію еритроцитів в світлі нових даних вже варто доповнити їх здатністю транспортувати не лише O_2 , але й газові трансмітери – NO, CO і H_2S . Ймовірно, NO транспортується еритроцитами у вигляді нітрит-аніона, здатного легко відновлюватися нітритредуктазою активністю дезоксигемоглобіну ($NO_3^- \rightarrow NO$) [7]. Можна вважати, що CO транспортується еритроцитами у вигляді гемової

групи молекул гемоглобіну, при гемолізі еритроцитів останній „виходить” в плазму, де його гемова група негайно руйнується гемоксигеназою з вивільненням CO [6]. H₂S синтезується в еритроцитах de novo ферментом MPST [8], еритроцити можуть його накопичувати з плазми (вміст H₂S в еритроцитах дорослих щурів майже втричі перевищує плазмовий 76,1±8,2 і 27,1±1,8 пмоль/мг білка відповідно) і також можуть використовувати його як для власних потреб, так і для транспортування до інших клітин-мішеней. Високий вміст H₂S в еритроцитах, згідно з нашою гіпотезою, необхідний для запобігання глутатіонування гемоглобіну, що погіршує його властивості. Такий самий процес глутатіонування призводить до неспряження мо-

лекул cNOS (eNOS чи/і nNOS), що знижує конститутивний синтез NO і, навпаки, підвищує генерацію цими ферментами *O₂⁻, викликаючи підсилення оксидативного стресу і збільшення внаслідок цього пулів окисненого глутатіону. Саме останній здійснює глутатіонування цистеїнових залишків у молекулах гемоглобіну і багатьох інших білків [20]. Таким чином, відбувається замкнене коло взаємопідсилення оксидативного стресу і глутатіонування cNOS. У разі гемоглобіну, цей процес може змінювати ферментативні активності різних його форм - тієї ж вищезгаданої нітритредуктазної активності дезоксигемоглобіну, здатності окиснювати NO до нітрат-аніона оксидазною активністю оксигемоглобіну чи генерувати не лише H₂O₂,

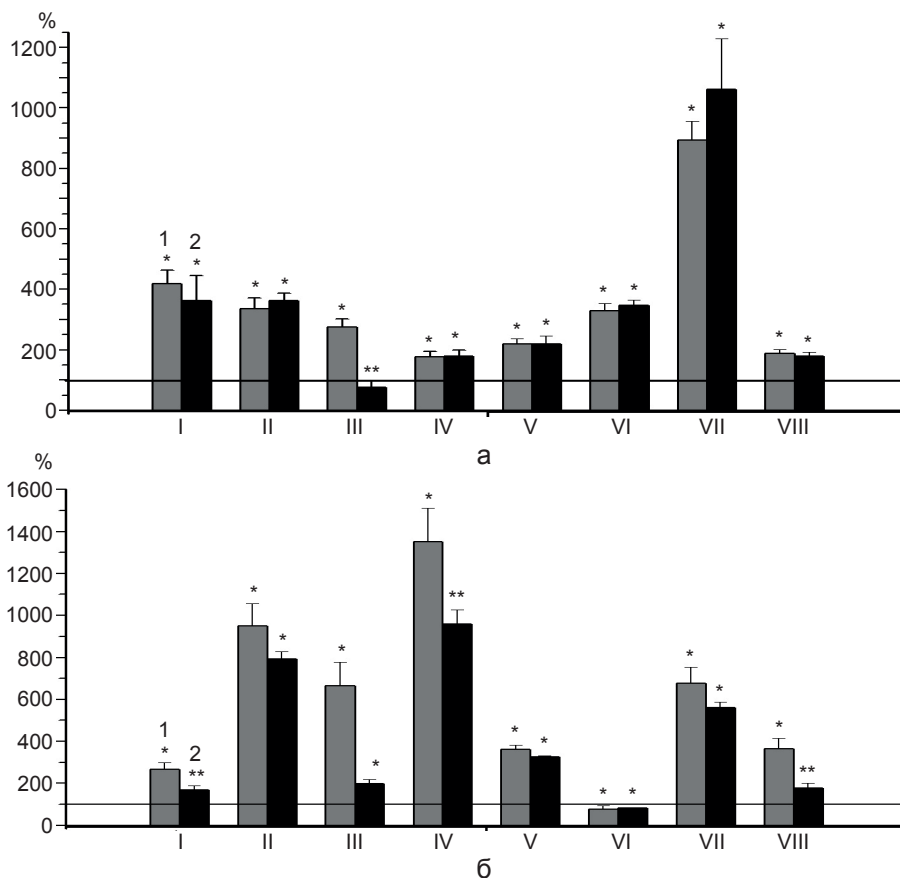


Рис.3. Дія препарату на показники оксидативного стресу в плазмі (а) і в еритроцитах (б) старих щурів; I-швидкість генерації *O₂⁻ II- швидкість генерації *OH, III- вміст H₂O₂, IV- вміст сечової кислоти, V- вміст тромбоксану B₂, VI- вміст пептидолейкотрієну C₄, VII-вміст дієнових кон'югатів, VIII- вміст малонового діальдегіду. Лінією позначено вміст показників у дорослих щурів (100%). *P<0,05 відносно дорослих, ** P<0,05 відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

про що відомо вже давно, але й тіосульфат ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$) та полісульфіди (HS_n) при окисненні H_2S в еритроцитах за участю метгемоглобіну, як встановлено недавно [10]. Механізмом захисту H_2S різних форм гемоглобіну, може бути збільшення пулів відновленого глутатіону (GSH), який перешкоджає глутатіонуванню цистеїнових залишків гемоглобіну. В свою чергу для синтезу GSH при зниженні утворення H_2S пули першого можуть збільшуватися у разі посиленого використання L-цистеїну, який є спільним попередником *de novo* синтезу і глутатіону, і H_2S , утворюючи т.з. L-цистеїновий шунт. Подібний шунт відомий для L-аргініну. Останній використовується для синтезу сечовини та *de novo* синтезу NO [21,22]. Незначне (на 30%), але

вірогідне зниження еритроцитарних пулів H_2S за дії препарату (див. рис.4,б) вказує на таку можливість. Причиною може бути зафіксоване нами підвищення кальцій-протонного обміну в цих клітинах, про що свідчить зміщення еритрограми кислотного гемолізу вліво (див. рис.1, крива 3). Відомо [23], що для запобігання значного підкислення цитозолу при підвищенні транспорту H^+ в еритроцити в обмін на вихід іонів кальцію, вони інтенсифікують „викидання” протонів у вигляді бікарбонату (HCO_3^-) або гідросульфіту (HS^-). І, нарешті, не виключено, що урфугем підвищує щойно відкритий феномен окиснення H_2S в еритроцитах метгемоглобіном до тіосульфату ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$) і полісульфідів (H_2S_n) [10]. До цього часу єдиним шляхом

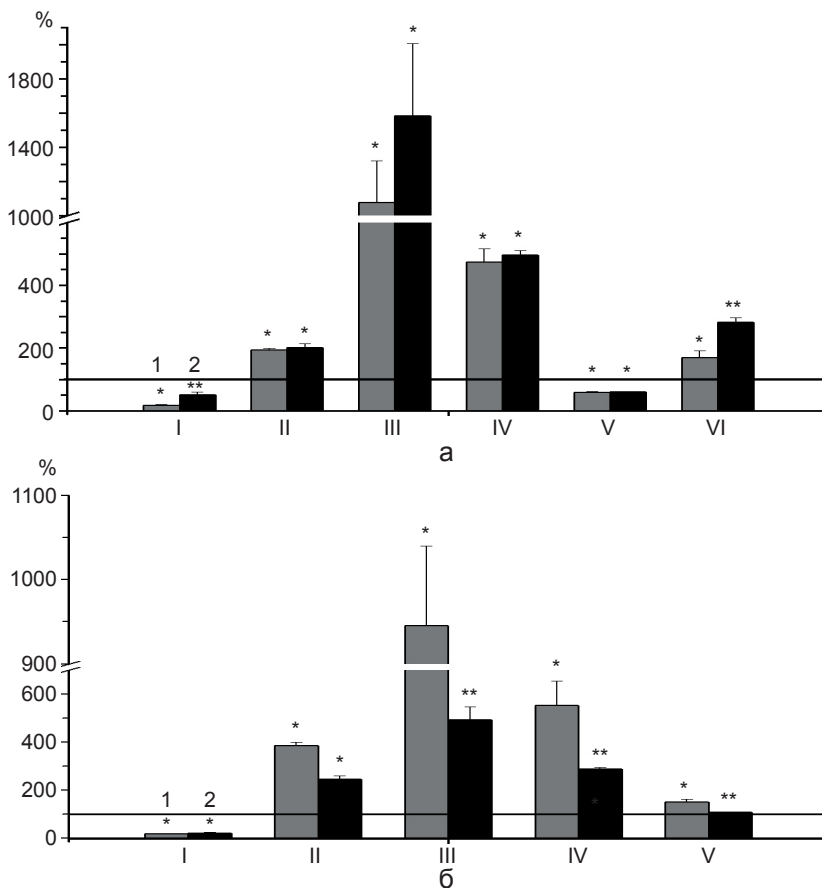


Рис.4. Дія препарату на показники нітрозативного стресу в плазмі (а) і в еритроцитах (б) старих щурів; I- активність сNOS, II— активність іNOS, III- активність нітратредуктази, IV- вміст NO_3^- , V- вміст H_2S , VI- вміст вільного негемового заліза. Лінією позначено значення показників у дорослих щурів (100%). * $P<0.05$ відносно дорослих, ** $P<0.05$ відносно контролю (старих щурів, що не отримували препарат)

окиснення H_2S вважався мітохондріальний із „скиданням” електронів у електронно-транспортний ланцюг і, в т.ч. за участю H_2S в генерації АТФ в мітохондріях. Насправді H_2S давно відомий як єдиний неорганічний субстрат дихання [24]. Полісульфіди є дуже потужними біорегуляторами [25], наявність в еритроцитах незалежного від мітохондрій шляху окиснення H_2S з утворенням H_2S_n і $H_2S_2O_3$ має надзвичайно велике значення, незважаючи на прогнозовану відсутність участі в генерації енергії, оскільки мітохондрії в еритроцитах шурів, як і людини відсутні. По-перше, тому, що саме H_2S_n опосередковують такі відомі біоефекти H_2S , як регуляція тону судин, ангиогенезу і споживання кисню; нейромедіаторна, цитопротекторна і протизапальна дія [26]. По-друге, утворення в еритроцитах $H_2S_2O_3$ при окисненні H_2S передбачає можливість ресинтезу H_2S вищевказаним ферментом його синтезу *de novo* MPST, подібно до потужного ресинтезу NO із NO_2^- в еритроцитах за дії дезоксигемоглобіном. Що стосується підвищення вмісту вільного негемового заліза залізовмісним препаратом, то цей ефект можна вважати очікуваним, тим більше він став очевидним наслідком підвищеного гемолізу еритроцитів і неминучого руйнування гему гемоксидазою звільненням заліза, білірубину та оксиду вуглецю (CO). Останній, як і NO, є потужним низькомолекулярним регулятором серцево-судинної та інших важливих систем організму, діючи через сигнальну систему розчинної гуанілатциклази (pGC—cGMP—PKG) [27, 28]. Водночас підвищення плазмових пулів заліза мало впливає на синтез гемоглобіну [29, 30]. Причиною стимуляції його синтезу не є залізо, що звільняється при руйнуванні еритроцитів, а інші фактори цього процесу. Ми вважаємо, що основними із них є звільнення АТФ і CO. Цікаво, що пули H_2S знаходяться у тісному взаємозв'язку з останніми [31]. За дії урфугему вони знижувалися в плазмі (див. рис.4,а), як було вказано раніше, а в еритроцитах (див. рис.4,б)

значно перевищували значення в плазмі. Таким чином, зафіксоване збільшення гемолізу еритроцитів за дії урфугему може призводити до звільнення у плазму всіх трьох (!) відомих нині газових трансмітерів – CO при руйнуванні гему гемоксидазою, NO внаслідок реутилізаційного синтезу в еритроцитах і синтезу в стінці судин звільненим при гемолізі АТФ, та H_2S внаслідок його виходу з еритроцитів у плазму при її руйнуванні.

ВИСНОВКИ

1. У старих шурів знижується вміст гемоглобіну в крові і, навпаки, підвищується активність кальцій-протонного обміну, що викликає прискорений кислотний гемоліз еритроцитів.

2. Залізовмісний препарат, який старі тварини вживали протягом 14 діб, підвищував як вміст гемоглобіну, так і швидкість кальцій-протонного обміну, внаслідок чого стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу знижувалася.

3. У плазмі, та в еритроцитах старих тварин спостерігається оксидативно/нітрозативний стрес, викликаний зниженням активності конститутивного *de novo* синтезу NO і, навпаки, високими рівнями генерації як АФК – малотоксичного супероксидного і токсичного *ОН, так і високими рівнями генерації надлишкового NO – шляхом індуцибельного *de novo* синтезу і внаслідок реутилізації нітрат-аніона нітратредуктазою.

4. Після вживання урфугему рівень генерації супероксидного радикала, але не токсичного *ОН-радикала в еритроцитах знижувався і, навпаки, як у плазмі, так і в еритроцитах старих тварин підвищувався рівень конститутивного *de novo* синтезу NO внаслідок підвищення спряження cNOS.

5. Високі рівні генерації токсичного *ОН-радикала в крові старих шурів зумовлюються утворенням і розпадом по радикальному шляху пероксинітриту в умовах оксидативно/нітрозативного стресу, а не по класичному шляху перетворення пероксиду водню в реакції Фентона.

С.И. Уретий, А.В. Коцюруба, Б.С. Копьяк**СНИЖЕНИЕ У СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ СТОЙКОСТИ К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ ЭРИТРОЦИТОВ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИМ ФИТОПРЕПАРАТОМ УВЕЛИЧИВАЕТ УРОВЕНЬ ГЕМОГЛОБИНА В НИХ**

In vivo проведено дослідження хронічного діяння залізо-содержащего препарату Урфугем на рівень гемоглобіну в крові старих крыс. Для установлення біохімічних механізмів можливої стимуляції його синтезу определяли показателі оксидативного і нитрозативного стресса і содержание сероводорода в плазме і в еритроцитах, негемового заліза в плазме і чутливість до кислотного гемолізу еритроцитів. Установили, що препарат достовірно підвищує содержание гемоглобіну і знижує стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу. Зафіксовано також достовірне зниження в еритроцитах швидкості генерації супероксидного аніон-радикала ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) і содержания пероксида водороду (H_2O_2), але не за рахунок зниження активності ліпідних (ліпоксигеназа і циклооксигеназа) або нуклеотидного (ксантиноксидаза) генераторів $^{\bullet}\text{O}_2^-$. Препарат не знижує високі рівні генерації гідроксильного радикала ($^{\bullet}\text{OH}$) і пулу нитрат-аніона (NO_3^-) в еритроцитах. Установлено угнетення de novo синтезу NO конститутивними NOS (cNOS) внаслідок їх несопряження і високі рівні избыточного синтезу NO як в плазме, так і в еритроцитах старих тварин за рахунок реутилізації NO_3^- нитратредуктазою і de novo синтезу NO індукційною NO-синтазою. Препарат частково відновлював конститутивний de novo синтез NO, збільшуючи сопряжение cNOS. Отримані результати вказують на те, що причиною подальшого підвищення проникності для протона (H^+) плазматическої мембрани еритроцитів уже збільшеної у старих тварин, яким викликається їх кислотний гемолиз, препаратом може бути зміна співвідношення рівнів оксидативного і нитрозативного стресса в еритроцитах в користь останнього, тобто генерація токсического $^{\bullet}\text{OH}$ не за рахунок класическої реакції Фентона в присутствіи Fe^{2+} , а за рахунок утворення і розпаду пероксинітриду. Ключеві слова: гемоглобін; еритроцити; кислотний гемолиз; оксидативний і нитрозативний стресс; залізо-содержащий препарат; старі крыси

S.I. Uretii¹, A.V. Kotsuruba², B.S. Kopyak²**REDUCING RESISTANCE TO ACID HEMOLYSIS BY IRON-CONTAINED DRUG INCREASES THE LEVEL OF HEMOGLOBIN IN THE ERYTHROCYTES OF AGING ANIMALS**

In experiments in vivo we studied the effect of chronic iron-contained drug (Urfuhem) supplementation on the level of

hemoglobin (Hb) in the blood of aging rats. To establish the biochemical mechanisms of drug action it was determined the parameters of oxidative/nitrosative stress and the hydrogen sulfide level in plasma and erythrocytes, the level of non-heme iron in plasma and erythrocytes sensitivity to acid hemolysis. It was found that in aging rats the drug significantly increases the Hb content of red blood cells and reduces its resistance to acid hemolysis. After the drug supplementation the rate of superoxide anion-radical ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) generation in erythrocytes and stable hydrogen peroxide (H_2O_2) content both in plasma and erythrocytes were down-regulated. The drug did not reduce the high levels of generation of the hydroxyl radical ($^{\bullet}\text{OH}$) and high levels of excess NO de novo synthesis by iNOS in erythrocytes but reduced the pools of nitrate anion (NO_3^-) and its reutilization for NO synthesis. After the drug supplementation the rate of constitutive NO synthesis by cNOS in aging rats plasma was up-regulated perhaps by cNOS coupling. The results indicate that the reason for increasing the permeability of the proton (H^+) in red blood cells that causes the acid hemolysis in aging rats after the drug supplementation can be change in the balance of levels of oxidative and nitrosative stress in red blood cells in favor of the latter, and that toxic $^{\bullet}\text{OH}$ generation is not at the expense of the classical Fenton reaction in the presence of iron ions (Fe^{2+}), but due to the formation and decomposition of peroxyntirite (ONOO^-).

Key words: hemoglobin; red blood cells; acid hemolysis; oxidative and nitrosative stress; iron-contained drug; old rats

¹O.O.Bogomolets national medical university, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv;

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

REFERENCES

1. Kotsuruba AV, Sharipov RR, Kopyak BS, Sagach VF. Brain focal ischemia-reperfusion causes a decreased resistance of erythrocytes from venous blood to acid hemolysis, which is prevented by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2015; 61(5):3-10. [Ukrainian].
2. Kotsuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF, Spivak NJ. Nanocerium restores the erythrocytes stability to acid hemolysis by inhibition of oxygen and nitrogen reactive species in old rats. *Fiziol Zh.* 2015; 61(1):3-9. [Ukrainian].
3. Sikora J, Orlov SN, Furuya K, Grygorczyk R. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood.* 2014; 124(13):2150-7.
4. Giebink AW, Vogel PA, Medawala W, Spence DM. C-peptide-stimulated nitric oxide production in a cultured pulmonary artery endothelium is erythrocyte mediated and requires Zn^{2+} . *Diabetes Metab Res Rev.* 2013; 29(1):44-52.
5. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(4):585-630.
6. Westphal M, Weber TP, Meyer J, von Kegler S, Van Aken

- H, Booke M. Affinity of carbon monoxide to hemoglobin increases at low oxygen fractions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(4):975-7.
- 7.Sahach VF, Doloman LB, Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Kurdanov KhA, Beslanieiev IA, Bekuzarova SA. Increased level of nitric oxide stable metabolites in the blood of highlanders. *Fiziol Zh.* 2002; 48(5):3-8. [Ukrainian].
- 8.Valentine WN, Toohey JJ, Paglia DE, Nakatani M, Brockway RA.Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol: possible regulatory role. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(5):1394-8.
- 9.Cortese-Krott MM, Kelm M.Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014; 2:251-8.
- 10.Vitvitsky V, Yadav PK, Kurthen A, Banerjee R.Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J Biol Chem.* 2015; 290(13):8310-20.
- 11.Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, et al. Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. *Nitric Oxide.* 2014; 41:79-84.
- 12.Savolainen H. High Toxicity of Hydrogen Sulfide by the Inhibition of Mitochondrial Respiration. *J Biol Chem.* 2010; 285(24): 1e9.
- 13.Cooper CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(2-3):290-309.
- 14.Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erytrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2):259-66. [Russian].
- 15.Kotsuruba AV, Kopjak BS, Sagach VF, Spivak Nja. Old rats erythrocytes stability to acid hemolysis restoring by cerium oxide nanoparticles. *Fiziol Zh.* 2014; 60(6):3-9. [Ukrainian].
- 16.Drachuk K.O., Kotsiuruba A.V., Bazilyuk, Stepanenko L.G., Sagach V.F. Propagylglycine restores endothelium-dependent relaxetion of aortic smooth muscles in old rats. *Fiziol Zh.* 2014; 60(4):3-10. [Ukrainian].
- 17.Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P,et al. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol.* 2009; 182(5):2898-908.
- 18.Fan Q, Chen M, Fang X, Lau WB, Xue L,et al. Aging might augment reactive oxygen species (ROS) formation and affect reactive nitrogen species (RNS) level after myocardial ischemia/reperfusion in both humans and rats. *Age (Dordr).* 2013; 35(4):1017-26.
- 19.Colombo G, Dalle-Donne I, Giustarini D, Gagliano N, Portinaro N, et al. Cellular redox potential and hemoglobin S-glutathionylation in human and rat erythrocytes: A comparative study. *Blood Cells Mol Dis.* 2010; 44(3):133-9.
- 20.Dafre AL, Reischl E. Hemoglobin S-thiolation during peroxide-induced oxidative stress in chicken blood. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006; 142(3-4):188-97.
- 21.Sahach VF, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Mehed' OF, Stepanenko LH. Inhibitors of arginase pathway in L-arginine metabolism as a new class of antihypertensive drugs: action of urea on oxidative and nonoxidative metabolism of L-arginine and vascular tone in chronic hypertension. *Fiziol Zh.* 2004; 50(6):9-18. [Ukrainian].
- 22.Sagach VF, Bondarenko A, Bazilyuk OV, Kotsuruba AV. Endothelial dysfunction: possible mechanisms and ways of correction. *Experimental & Clinical Cardiology.* 2006; 11(2):107-112. [Ukrainian].
- 23.Jennings ML. Transport of H₂S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 305(9):C941-50.
- 24.A. Gubern M, Andriamihaja M, Nьbel T, Blachier F, Bouillaud F. Sulfide , the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J.* 2007; 21(8):1699-1706.
- 25.Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2015; 91(4):131-59.
- 26.Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules.* 2014; 19(10):16146-57.
- 27.Hristov KL, Gagov HS, Itzev D, Duridanova DB. Heme oxygenase-2 products activate IKCa: role of CO and iron in guinea pig portal vein smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004; 25(4-5):411-21.
- 28.Ahmmmed GU, Xu Y, Hong Dong P, Zhang Z, Eiserich J, Chiamvimonvat N. Nitric oxide modulates cardiac Na(+) channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res.* 2001; 89(11):1005-13.
- 29.Schmidt A, Kolb E, Hofmann U, Gründel G, Nestler K, Schmidt U.The content of Hb in blood and the protein, Fe, Fe-binding capacity, Cu and Zn in blood plasma of low parity sows before and after oral iron administration. *Arch Exp Veterinarmed.* 1990; 44(3):439-46.
- 30.Ahiboh H, Oga AS, Yapi HF, Kouakou G, Boua KD, et al. Anaemia, iron index status and acute phase proteins in malaria (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Bull Soc Pathol Exot.* 2008; 101(1):25-8.
- 31.Clanton TL, Hogan MC, Gladden LB. Regulation of cellular gas exchange, oxygen sensing, and metabolic control. *Compr Physiol.* 2013; 3(3):1135-90.

*Матеріал надійшов
до редакції 08.02.2016*

Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів під дією гінкголевої кислоти

Г.В. Малєєва^{1,2}, С. І. Булдакова¹, П. Д. Брежестовський¹

¹Інститут системних нейронаук, Університет Екс-Марсель, Франція;

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

У дослідженні увага була зосереджена на особливостях впливу гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори, що відносяться до гальмівної системи мозку. Використовуючи метод patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» нами було проаналізовано дію гінкголевої кислоти на різні субодиниці гліцинового рецептора. Експерименти проводили на лінії клітин CHO (Chinese hamster ovary cells), що були трансфіковані кДНК (комплементарна ДНК) $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора. Іонні струми було індуковано швидкою аплікацією різних концентрацій гліцину. Гінкголева кислота викликала збільшення амплітуди струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -субодиницями, з 364 ± 49 ($n=34$) до 846 ± 134 нА ($n=34$) через 20-40 с після початку аплікації та змінювала напівефективну дозу для гліцину з 36 ± 6 (у контролі) до 17 ± 2 мкмоль/л. Однак у разі $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів потенціація, під дією гінкголевої кислоти, не спостерігалася. Наші результати демонструють, що гінкголева кислота є субодинично-специфічним модулятором $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів. Механізм її дії потребує подальшого дослідження.

Ключові слова: гліциновий рецептор; гінкголева кислота; іонні струми; patch-clamp.

ВСТУП

Аніонвибіркові гліцинові рецептори забезпечують передавання гальмівного сигналу у спинному мозку хребетних, стовбурі мозку, ретині та деяких інших частинах центральної нервової системи [1, 2]. Разом із катіонселективними нікотинним ацетилхоліновим, серотоніновим рецептором 3-го типу та аніонселективним γ -аміномасляним (ГАМК) рецепторами гліциновий рецептор належить до родини пентамерних лігандкерованих циспелетельних каналів.

Родина гліцинових рецепторів відносно невелика. За допомогою молекулярного клонування було ідентифіковано чотири α -субодиниці та одну β -субодиницю, що мають кілька сплайс-варіантів [2, 3]. Функціональні гліцинові рецептори можуть бути гомомерними – сформованими лише одним типом α -субодиниць, чи гетеромерними – сформованими α - та β -субодиницями. Од-

нак стехіометрія гетеромерних рецепторів досі остаточно не визначена, розглядається декілька варіантів: $3\alpha/2\beta$ [4, 5] та $2\alpha/3\beta$ [6]. α -субодиниці високогомологічні між собою, їх амінокислотна послідовність збігається на 80-90% [2], проте рецептори, сформовані різними субодиницями, відрізняються за кінетичними характеристиками [7], темпоральним і регіональним розподіленням рівнів експресії [1, 8, 9], а також фізіологічними функціями [10].

Завдяки своєму широкому розповсюдженню та різноманітним функціям гліцинові рецептори є потенційними мішенями для таких груп фармакологічних препаратів, як м'язові релаксанти, знеболювальні та протизапальні ліки [11]. Однак нині відомо лише кілька речовин, що мають специфічну спорідненість до певних субодиниць гліцинового рецептора [10, 12].

Екстракт *Ginkgo biloba* містить три групи активних речовин: флаваноїди (кверцетин,

камперол), терпени (гінкголіди А, В, С та білобалід) і гінкголеві кислоти [13]. Було продемонстровано, що гінкголідам властива здатність специфічно блокувати канал гліцинового рецептора [14, 15]. При цьому для гінкголіду В є характерною висока спорідненість до $\alpha 1$ - субодиниці гліцинового рецептора та гетеромерних рецепторів [16]. Решта терпенів, що входять до складу екстракту листя *Ginkgo biloba*: гінкголіди А, С та білобалід, також є блокаторами гліцинового рецептора, що проявляють слабку субодиничну специфічність [10, 15]. Гінкголеві кислоти переважно містяться у насінних покривах та листі *Ginkgo biloba* [17]. За хімічною будовою вони являють собою 2-гідрокси-6-алкілбензоїдні кислоти з насиченими чи ненасиченими алкільними залишками, кількість яких варіює від 13 до 19.

Метою нашої роботи було, використовуючи метод *patch-clamp*, встановити особливості дії ненасиченої гінкголевої кислоти (C15) на гомомерні $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -гліцинові рецептори, експресовані у лінії клітин *CHO*.

МЕТОДИ

Експерименти проведено на лінії клітин *CHO*, що були отримані з банку клітин та мікроорганізмів American Type Tissue Culture Collection («Molsheim», Франція). Усі маніпуляції із культурою виконували як описано раніше [18].

Для електрофізіологічного аналізу клітини *CHO* було трансфіковано кДНК різних субодиниць гліцинового рецептора. За добу до трансфекції клітини висаджували на покривні скельця (12-14 мм у діаметрі), розміщені в середині чашок Петрі (35 мм), з додаванням 2 мл середовища для культивування. *CHO*-клітини трансфікували кДНК $\alpha 1$ - (1 мкг/мкл) або $\alpha 2$ - (2 мкг/мкл) гліцинових рецепторів із застосуванням протоколу трансфекції для Lipofectamine 2000 («LifeTechnology», США). Для ідентифікації клітин, що експресували гліцинові рецептори, до трансфекційної сумі-

ші додавали кДНК зеленого флуоресцентного білка (GFP, 0,5 мкг/мкл). Заміну середовища культивування здійснювали через 3 год після початку трансфекції. Для запобігання спонтанній активації гліцинових рецепторів у середовище для культивування додавали стрихнін (1 мкмоль/л). Через 24 год після трансфекції флуоресцентні клітини відбирали для проведення електрофізіологічного дослідження. Використовували метод *patch-clamp* у конфігурації «ціла клітина» при 20-25°C, підсилювач ЕРС-9 («НЕКА Elektronik», Німеччина). Впродовж усього експерименту камеру, в якій містилися *CHO*-клітини, перфузували зовнішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, CaCl₂ – 2, KCl – 2,8, MgCl₂ – 4, HEPES – 20, глюкозу – 10; pH 7,4; 320-330 мосм/л. Внутрішньоклітинний розчин, яким була заповнена *patch*-піпетка, містив (ммоль/л): CsCl – 140, CaCl₂ – 6, MgCl₂ – 2, MgATP – 2, NaGTP – 0,4, HEPES Cs/OH – 10, ВАРТА/КОН – 20; pH 7,3; 290 мосм/л. Відповідно до композиції внутрішньо- та зовнішньоклітинного розчинів фіксований потенціал становив –30 мВ. Піпетки були виготовлені із боросилікатних скляних капілярів («Harvard Apparatus Ltd», США) та мали опір 5-10 МОм.

Для зміни розчинів використовували систему швидкої аплікації. Розчини подавали двома паралельними прямокутними трубками, розміром 100 мкм, що розташовувалися на відстані 40-50 мкм від досліджуваної клітини. Переміщення системи аплікації контролювали комп'ютеризованою системою зміни розчинів (SF 77A perfusion Fast-Step, «Warner», США). Тривалість аплікації варіювала від 2 до 180 с. Клітини із низьким вхідним опором (понад 150 МОм) та швидким зниженням амплітуди струму (більше ніж 30% під час повторюваних аплікацій) не враховували при аналізі результатів. Гінкголеву кислоту (C15, «HWI Analitic GmbH») спочатку розчиняли у чистому ДМСО, а потім у зовнішньоклітинному розчині до кінцевої концентрації ДМСО 0,016%.

Всі результати електрофізіологічних досліджень аналізували з використанням програмного забезпечення НЕКА Elektronik (Німеччина). ED_{50} була визначена побудовою кривих залежності амплітуди струму від концентрації агоніста (Origin 7.5, «OriginLabs», США). Для статистичного аналізу було використано тест ANOVA. Результати виражені у середніх значеннях та їх стандартних похибках середнього.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив гінголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори

Іонні струми, опосередковані $\alpha 1$ гомомерними гліциновими рецепторами, було індуковано аплікацією різних концентрацій агоніста

гліцинового рецептора – гліцину. Згідно з розробленим протоколом, 2-секундна аплікація гліцину проводилася до, під час та після аплікації гінголевої кислоти.

Аплікація гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) викликала підвищення амплітуди струмів, індукованих низькими (10 мкмоль/л) концентраціями гліцину (рис. 1, а, зліва). Амплітуда струмів, індукованих 10 мкмоль/л гліцину, в контролі становила 364 ± 49 пА та збільшувалася після аплікації гінголевої кислоти до 846 ± 134 пА ($n=34$; $P<0,01$; див. рис. 1, г). Після повернення до нормального зовнішньоклітинного розчину амплітуда гліциніндукованих струмів знижувалася (532 ± 63 пА; $n=34$), однак це значення статистично вірогідно відрізнялося від контрольного. Неповне

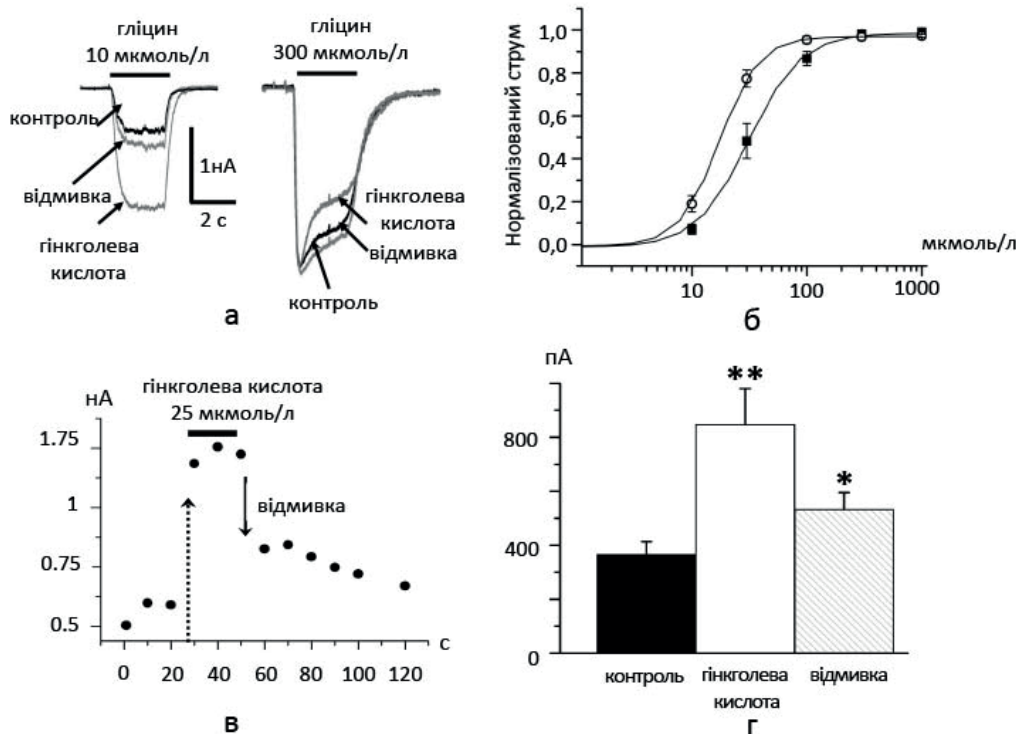


Рис. 1. Модуляція $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів під дією гінголевої кислоти: а, зліва – струми індуковані аплікацією 10 мкмоль/л гліцину в контролі, після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) та після відмивки (відповідні реєстрації позначено стрілками); справа – струми викликані аплікацією 300 мкмоль/л гліцину (фіксований потенціал -30мВ); б, криві залежності амплітуди струму від концентрації гліцину в контролі (чорні квадрати) та після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) (пусті кружечки); в, послідовні реєстрації гліциніндукованих струмів до, під час та після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л), що за тривалістю відповідає довжині чорної смужки вгорі; г, середнє значення струмів опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами (10 мкмоль/л гліцину), (пА) \pm стандартна похибка середнього в контролі (чорний стовпчик), після аплікації гінголевої кислоти (білий) та після відмивки (заштрихований). * $P<0,05$; ** $P<0,01$

відмивання гінголевої кислоти, ймовірно, пов'язане із її накопиченням у центрі зв'язування з рецептором. Варто зазначити, що гінголева кислота не підвищувала амплітуду струмів, індукованих насичуючими концентраціями гліцину ($n=9$; $P>0,1$), викликаючи лише прискорення кінетики десенситизації (див. рис. 1, а, справа).

Під час детального дослідження кривих концентраційних залежностей виявлено, що гінголева кислота змінює ED_{50} для гліцину, спричиняючи зсув кривих концентраційної залежності вліво. Середня ED_{50} змінилася з 36 ± 6 мкмоль/л ($n=9$; див. рис. 1, б) у контролі до 17 ± 2 мкмоль/л ($n=9$) за наявності 25 мкмоль/л гінголевої кислоти ($P<0,01$).

На рис. 1,б продемонстровано криву розвитку дії гінголевої кислоти на амплітуду струмів, індукованих повторюваною аплікацією (кожні 10 с) 10 мкмоль/л гліцину. Ефект гінголевої кислоти сягав свого максимуму через 5–10 с після початку аплікації і залишався стабільним протягом 0,5–1 хв. Для кінетики відмивання характерною була наявність двох фаз: швидкого зниження амплітуди більше як на 50% протягом перших 10 с і наступного повільного відновлення, майже до першопочаткового рівня, протягом 3–10 хв. Варто відмітити, що при довготривалих аплікаціях (понад 3–5 хв), гінголева

кислота викликає незворотне зниження вхідного опору мембрани.

Вплив гінголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори

Перш ніж аналізувати дію гінголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори, нами було визначено ED_{50} для гліцину, що становила 42 ± 1 мкмоль/л ($n=10$; рис. 2, а). Таким чином, значення ED_{50} для $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів є дещо вищим, ніж для $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів.

На противагу $\alpha 1$ -гліциновим рецепторам, рецептори, сформовані $\alpha 2$ - субодиницями, не зазнавали потенціації під дією гінголевої кислоти (25 мкмоль/л). Більше того, через 20–40 с після початку аплікації гінголевої кислоти амплітуди струмів, індукованих ненасичуючими концентраціями гліцину (30 мкмоль/л), демонстрували тенденцію до зменшення з 238 ± 48 до 185 ± 36 пА ($n=11$; $P>0,1$; див. рис. 2, б).

ОБГОВОРЕННЯ

У цьому дослідженні нами вперше було показано, що гінголева кислота є субодинично-специфічним модулятором гліцинових рецепторів. Під її впливом амплітуда іонних струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими

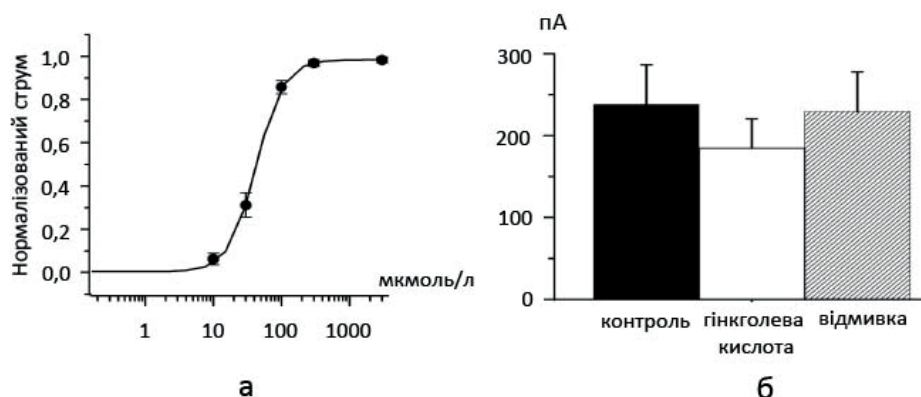


Рис. 2. Зміна амплітуди струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами під дією гінголевої кислоти: а – крива залежності амплітуди струму від концентрації гліцину; б – середнє значення струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами (30 мкмоль/л гліцину), (пА) \pm стандартна похибка середнього в контролі (чорний стовпчик), після аплікації гінголевої кислоти (білий) та після відмивки (заштрихований)

рецепторами, підвищувалася, а $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами – знижувалася. Окрім того, у разі $\alpha 1$ -рецепторів під дією гінкголевої кислоти знижувалась ED_{50} для гліцину.

Гліциновий рецептор є важливим компонентом системи швидкої гальмівної нейропередачі. Рецептори $\alpha 1$, що локалізовані в спинному мозку, відповідають за контроль моторної діяльності, $\alpha 2$ - задіяні в процесах ембріонального розвитку мозку [19] та зорового сприйняття [1], $\alpha 3$ - беруть участь у формуванні больових відчуттів [20].

Переважним місцем локалізації гліцинових рецепторів є спинний мозок, однак, останнім часом, значна увага дослідників приділена рецепторам, розміщеним у різних зонах головного мозку, зокрема в гіпокампі [21]. Було показано, що гліцинові рецептори, локалізуючись переважно екстраซินаптично, відіграють важливу роль у контролі збудливості нейрональних мереж гіпокампа. Їх активація, що здійснюється за рахунок гліцину, розчиненого у позаклітинному середовищі, змінює внутрішньоклітинну концентрацію хлору, впливаючи на генерацію потенціалів дії нейронами гіпокампа [22]. Окрім того, гліцинові рецептори можуть брати участь у розвитку епілепсії [23]. Таким чином, актуальним є пошук нових фармакологічних агентів, здатних модулювати їх роботу, особливо за умов патології. При цьому важливого значення набувають субодинично- специфічні модулятори, оскільки різні субодиниці цього рецептора відрізняються за своїми функціями та локалізацією.

Отже, нами було показано, що гінкголева кислота є нейроактивною речовиною, що здатна субодинично-специфічно модулювати роботу гліцинових рецепторів, а саме спричинювати потенціацію струмів, опосередкованих рецепторами, сформованими $\alpha 1$ -субодиницями. Механізми, що лежать в основі такої реакції гліцинових рецепторів на аплікацію гінкголевої кислоти, потребують подальшого вивчення.

**Г.В. Малеева, С.И. Булдакова,
П.Д. Брежестовский**

СУБЪЕДИНИЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ГЛИЦИНОВЫХ РЕЦЕПТО- РОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИНКГОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Используя метод *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» нами было проанализировано действие гинкголевой кислоты на различные субъединицы глицинового рецептора. Эксперименты проводили на клетках линии *CHO* (*Chinese hamster ovary cells*), трансфицированных кДНК $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц глицинового рецептора. Ионные токи были индуцированы быстрой аппликацией глицина различных концентраций. Гинкголевая кислота вызывала увеличение амплитуды токов, опосредованных $\alpha 1$ -субъединицами глицинового рецептора, с 364 ± 49 (n=34) до 846 ± 134 пА (n=34) через 20-40 с после начала аппликации и изменяла эффективную дозу для глицина с 36 ± 6 (в контроле) до 17 ± 2 мкмоль/л. Однако в случае $\alpha 2$ -глициновых рецепторов потенцияция под действием гинкголевой кислоты не наблюдалась. Наши результаты демонстрируют, что гинкголевая кислота является субъединично-избирательным модулятором $\alpha 1$ -глициновых рецепторов. Механизм действия гинкголевой кислоты требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: глициновый рецептор; гинкголевая кислота; ионные токи; *patch-clamp*.

G. Maleeva ^{1,2}, S. Buldakova ¹, P. Brejestovski ¹

SUBUNIT SPECIFIC MODULATION OF GLYCINE RECEPTORS BY GINKGOLIC ACID

Ginkgo biloba extract is a multicomponent pharmacological agent widely used in neurological disorders therapy. It was shown that ginkgolic acid, a constituent of lipophilic *Ginkgo biloba* extract, has numerous biological activities. In the present study we have focused on the features of ginkgolic acid action on $\alpha 1$ and $\alpha 2$ glycine receptors that make part of the inhibitory system of the brain. Using whole-cell configuration of patch-clamp recording we analysed effects of ginkgolic acid on different subunits of glycine receptors. Experiments were performed on cultured Chinese hamster ovary cells (*CHO* cells), transfected with $\alpha 1$ and $\alpha 2$ glycine receptor subunits. Ionic currents were induced by the fast application of different glycine concentrations. After 20-40 sec of pre-treatment with ginkgolic acid (25 μ M) currents mediated by $\alpha 1$ glycine receptors reversibly increased from 364 ± 49 pA, (n=34) to 846 ± 134 pA, (n=34). EC_{50} for glycine has changed from 36 ± 6 μ M (control) to 17 ± 2 μ M. In contrast, the application of ginkgolic acid on glycine receptors formed by $\alpha 2$ subunits did not provoke potentiation. Our results demonstrate that ginkgolic acid is a subunit specific modulator of glycine receptors. The mechanisms of the ginkgolic acid action on glycine receptors require further investigation.

Key words: glycine receptor; ginkgolic acid; ionic currents; patch-clamp.

REFERENCES

1. Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem*. 2006;97:1600–10.
2. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*. 2004;84:1051–95.
3. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:519–27.
4. Burzomato V, Groot-Kormelink P, Sivilotti LG, Beato M. Stoichiometry of recombinant heteromeric glycine receptors revealed by a pore-lining region point mutation. *Recept Channels*. 2003;9:353–61.
5. Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent J. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci*. 2012;32:12915–20.
6. Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW. Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 2012;51:5229–31.
7. Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron*. 1992;9:1155–61.
8. Malosio M, Marqueze- B, Pouey A, Kuhse J, Betz H. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 1991;10:2401–09.
9. Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S. Diversity of Glycine Receptors in the Mouse Retina : Localization of the alpha 4 Subunit. *J Comp Neurol*. 2007;500:693–707.
10. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56:303–9.
11. Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des*. 2007;13(23):2350–67.
12. Balansa W, Islam R, Gilbert DF, Fontaine F, Xiao X, Zhang H, Piggott AM, Lynch JW, Capon RJ. Australian marine sponge alkaloids as a new class of glycine-gated chloride channel receptor modulator. *Bioorg Med Chem* 2013;21:4420–25.
13. Ude C., Schubert-Zsilavecz M., Wurglics M. Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients. *Clin Pharmacokinet*. 2013; 52:727–49.
14. Kondratskaya EL, Lishko PV, Chatterjee SS, Krishtal OA. BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel. *Neurochem Int*. 2002;40:647–53.
15. Hawthorne R, Cromer B, Ng H, Parker MW, Lynch JW. Molecular determinants of ginkgolide binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem*. 2006;98:395–407.
16. Kondratskaya EL, Betz H, Krishtal OA, Laube B. The b subunit increases the ginkgolide B sensitivity of inhibitory glycine receptors. *Neuropharmacology*. 2005;49:945–51.
17. Fuzzati N, Pace R, Villa F. A simple HPLC-UV method for the assay of ginkgolic acids in Ginkgo biloba extracts. *Fitoterapia*. 2003;74:247–56.
18. Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Medina I, Bregestovski P. Genetically encoded Cl-Sensor as a tool for monitoring of Cl-dependent processes in small neuronal compartments. *J Neurosci Methods*. 2010;193:14–23.
19. Avila A, Vidal PM, Dear TN, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L. Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep*. 2013;4:738–50.
20. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR $\alpha 3$: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 2004;304(5672):884–7.
21. Brackmanna M, Zhaoa C, Schmiedenb V, Braunewell K. Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324:1137–42.
22. Chattipakorn S, McMahon L. Strychnine-sensitive glycine receptors depress hyperexcitability in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 2003;89:1339–42.
23. Eichler S, Kirischuk S, Jüttner R, Schafermeier P, Legendre P, Lehmann TN, Gloveli T, Grantyn R, Meier J. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J. Cell. Mol. Med*. 2008;12:2848–66.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.08.2015*

Вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії на серцево-судинну систем дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях

Л.М. Лісуха, В.Я. Березовський

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: lisukha_lyubov@inbox.ru

Досліджено вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) саногенного рівня на серцево-судинну систему у 120 дітей віком від 12 до 17 років, яких було розподілено на три групи. До I контрольної – ввійшло 20 осіб (практично здорові), до II групи порівняння – 50, до III основної – 50. Обстежувані II групи отримували стандартне лікування, а III – додатково до нього сеанси ПНГ. У дітей основної групи у спокої систолічний артеріальний тиск вірогідно знизився з $108,2 \pm 1,9$ до $103,8 \pm 1,1$ мм рт.ст. На 10-й хвилині ортостазу статистично значуще знизилася частота серцевих скорочень на $9,3 \text{ хв}^{-1}$, а систолічний артеріальний тиск на $8,4$ мм рт. ст. і діастолічний артеріальний тиск на $7,8$ мм рт. ст. щодо значень II групи. Вегетативне забезпечення діяльності серцево-судинної системи з нормальним типом реагування було на 34% вище відносно групи порівняння. Це свідчить про поліпшення гемодинаміки та підвищення адаптаційних можливостей автономної нервової системи. Ключові слова: переривчаста нормобарична гіпоксія; серцево-судинна система; автономна нервова система; кліноортостатична проба; артеріальний тиск; діти.

ВСТУП

Вегетативне забезпечення різних форм діяльності (ВЗД) – це здатність автономної нервової системи тривало підтримувати реакції, що виникають у відповідь на зовнішні і внутрішні подразники. Його вивчають, моделюючи фізичну, розумову, емоційну діяльність, а також проби положення тіла у просторі. Для останнього може бути застосована активна кліноортостатична проба. Відомо, що симпатична ланка (автономної нервової системи) регулює ерготропні процеси, в тому числі при психічному і фізичному навантаженні. Парасимпатична – активує трофотропні реакції. Їх взаємозв'язок зумовлений нервовими і хімічними механізмами. Регуляція серцево-судинної системи здійснюється при участі обох ланок і контролюється вищими вегетативними центрами, розташованими у корі півкуль головного мозку, мості та довгастому мозку [1 – 4].

При адаптації до переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) нормалізуються основні показники гемодинаміки. При цьому в умовах ортостазу стабілізується артеріальний тиск (АТ), частота серцевих скорочень (ЧСС), серцевий викид [5 – 7]. Рефлекторна вазоконстрикція як реакція на ортостаз може підсилюватися впливом гіпоксії на судинний тонус. Наскільки ефективно автономна нервова система регулює серцево-судинну і залежить результат гіпоксичного впливу на організм [8 – 10]. Її роль у процесі адаптації до ПНГ при патології шлунково-кишкового тракту (ШКТ) достатньо вивчена. Більшість дослідників відмічають підвищення функціональних резервів травної системи. У дорослих осіб показано також зниження впливу парасимпатичної ланки [11]. Недостатньо працю, присвячених дослідженню вегетативного забезпечення діяльності серцево-судинної системи дітей в результаті дії ПНГ [12 – 14]. Проведені раніше дослідження свід-

чать, що частота змішаного типу вегетативної дисфункції у обстежуваних, що мешкають на радіоактивно забруднених територіях і мають патологію гастродуоденальної зони, зустрічається у 79,5%, а тому крім патогенетичного лікування є потреба корекції вегетативного балансу пацієнтів [15].

Метою нашої роботи було вивчити вплив ПНГ на серцево-судинну систему і показники гемодинаміки у дітей з патологією ШКТ, що постійно проживають на радіоактивно забруднених територіях.

МЕТОДИКА

Обстежено 120 дітей віком від 12 до 17 років у ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини» НАМНУ з 2012 до 2015 р. Пацієнтів поділено на три групи: контрольна (I, n=20) до якої ввійшли практично здорові особи, котрі на час дослідження мали середні значення показників фізичного і статевого розвитку та протягом 2 міс не хворіли на гострі захворювання, проживали в «чистих» щодо радіоактивного забруднення територіях і не належали до потерпілих від чорнобильської катастрофи. Групу порівняння (II, n=50) і основну (III, n=50) – склали діти, що проживали у 2, 3, 4-й зоні за радіоактивним забрудненням [16]. Пацієнти II групи отримували стандартне лікування згідно з затвердженими протоколами МОЗ України при захворюваннях ШКТ, а III – комбіноване (стандартне відповідно до протоколів та сеанси ПНГ).

Дослідження включало клінічну оцінку стану нервової системи, інструментальне обстеження – ЕКГ (використовували прилад GE Medical System S MAC – 1200, США) та активну кліноортостатичну пробу. При проведенні останньої у горизонтальному положенні і в кінці 3-ї і 10-ї хвилин вимірювали АТ і ЧСС на променевій артерії. Використовували напівавтоматичний тонометр (Microlife, Швейцарія). Результати оцінювали за зміною систолічного артеріального тиску (САТ), діастолічного артеріального тиску (ДАТ),

пульсового артеріального тиску (ПАТ), а також ЧСС у вертикальному положенні відносно горизонтального. Крім того, на 10-й хвилині вивчали варіанти типу реагування активної кліноортостатичної проби: з надмірною активацією симпатoadреналової системи (гіперсимпатикотонічний); з недостатньою (асимпатикотонічний, гіпердіастолічний), змішані (симпатикоастенічний, астеносимпатичний). Хвилинний об'єм крові (ХОК) визначали непрямим методом Лілье-Штрандера і Цандера за формулою: $ХОК = АТ_{ред} \cdot ЧСС$, де $А_{ред} = (амплітуда АТ \cdot 100) : АТ_{ср}$; $АТ_{ср} = (САТ + ДАТ) : 2$; амплітуда $АТ = САТ - ДАТ$. Міжсистемні кардіореспіраторні відношення розраховували за допомогою коефіцієнта Хільдебранта – співвідношення ЧСС до частоти дихання [1]. Обстеження проведено до та після переривчастої дозованої саногенної гіпоксії.

Для проведення курсу сеансів ПНГ застосовано газову суміш, що складається із $11 \pm 1\%$ кисню в азоті. ПНГ проводили раз на добу за допомогою індивідуального апарата штучного гірського повітря типу «Борей». Використовували базовий режим [17]. Парціальний тиск кисню (P_{O_2}) газової суміші на I сеансі був 103 ± 5 мм рт. ст., на II і III його знижували ступінчасто. Починаючи з IV і наступні – проходили при $P_{O_2} 93 \pm 5$ мм рт.ст.

Дослідження проведене згідно з положеннями Конференції Ради Європи про права людини та біомедицини, Гельсінської декларації (у редакції 2013р.), законодавчої бази України.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel та SPSS Statistics (Version, 17). Після перевірки на нормальність розподілу застосовано параметричний критерій t Стьюдента та непараметричні критерії Вілкоксона і Манна-Уїтні. Статистично значущими вважалися відмінності результатів при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У обстежуваних дітей вегетативна дисфункція (як супутній діагноз) була встановлена

у 50% основної і 56% групи порівняння, астено-вегетативний синдром у 20 і 24%, астено-невротичний у 4 і 10% відповідно. Оцінка стану серцево-судинної системи на основі проведеної ЕКГ свідчила, що у дітей контрольної групи у 15% реєстрували неповну блокаду правої ніжки пучка Гіса. Це можна пояснити морфофункціональними особливостями та гормональною перебудовою і є в межах фізіологічної норми. У 15% пацієнтів цієї групи відмічали синусову аритмію. Дослідники вважають це результатом екстракардіальних впливів [18]. У обстежуваних групи порівняння (II) порушення ритму і провідності найчастіше зустрічалися у вигляді синдрому ранньої реполяризації шлуночків – 24%, синдрому скорочення R-Q – 10%, порушення атріовентрикулярної провідності – 20%, неповної блокади правої ніжки пучка Гіса – 20%, уповільнення провідності по правій ніжці пучка Гіса – 16%, порушення процесів реполяризації – 57%, синусова тахікардія у 16%, синусова аритмія 38%, а у основній групі (III) – у 28, 12, 32, 18, 20, 52, 20, 40% відповідно. Такі показники свідчать про розбалансування у роботі обох ланок автономної нервової системи та зниження адаптаційних можливостей серцево-судинної. Зміни фізіологічної регуляції останньої можуть бути обумовлені інкорпорацією радіонуклідів [15, 18, 19], віковою гормональною перебудовою, основним захворюванням та супутньою патологією. Після застосування комбінованого лікування з сеансами ПНГ у дітей основної групи порушення процесів реполяризації реєстрували тільки у 28%, а синусову тахікардію у 14%. У групі порівняння такі відхилення були у 48 і 12% дітей.

Після курсу сеансів ПНГ вірогідно знизилися значення АТ і ЧСС відносно групи порівняння і наблизилися до практично здорових дітей (таблиця). Ці зміни можуть свідчити про саногенний вплив гіпоксичного тренування та достатні адаптаційні реакції серцево-судинної системи у обстежуваних.

Проведення активної кліноортостатичної

проби дало змогу виявити такі варіанти ВЗД у практично здорових дітей (контрольна група): 80% – нормальний (з достатньою активацією симпатoadреналової системи), 7% – надмірний (з надмірною активацією симпатoadреналової системи), 13% – змішаний. У групі порівняння (II) – нормальний – 34%, недостатній (з недостатньою активацією симпатoadреналової системи) – 26%, надмірний – 18%, змішаний – 16%, а у основній (III) – 44, 22, 16, 18% відповідно. Після проведенного стандартного лікування відбулися зміни в II групі: 40% – нормальний, 26% – недостатній, 16% – надмірний, 16% – змішаний варіанти. У III групі, що отримувала комбіноване лікування, варіанти ВЗД стали такі: 74% – нормальний, 20% – недостатній, 16% – змішаний відповідно (рисунок). Після комбінованого лікування збільшилася кількість дітей з нормальним ВЗД і наблизилися до показників контрольної групи. Отримані результати свідчать про достатнє залучення симпатoadреналової системи у обстежуваних після гіпоксичного впливу. Це дає змогу зробити висновок, що у пацієнтів віком від 12 до 17 років, які постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях і мають патологію ШКТ (після курсу гіпоксичного тренування), збережені адаптаційні можливості симпатичного відділу автономної нервової системи. На 10-й хвилині ортостатичної проби значення ЧСС основної групи наблизилися до контролю (II). Індивідуальний аналіз показників АТ у дітей, які мали його вихідні значення понад 135 – 140 мм рт.ст. показав тенденцію до його зниження (115-120 мм рт.ст.).

Після комбінованого лікування з курсом сеансів ПНГ ХОК вірогідно збільшився в ортостазі на 7%. У групі порівняння цей показник практично не змінився. Такі зміни гемодинаміки можуть свідчити про фізіологічні наслідки дії сеансів нормобаричної гіпоксії. Коефіцієнт Хільдебранта статистично значуще збільшився з $4,74 \pm 0,12$ до $5,18 \pm 0,07$ ум. од. Отримані результати дають підставу стверджувати про активацію симпатичної ланки.

Відомо, що після одноразового гіпоксичного впливу (10% O₂, 15 хв) активується симпатична ланка автономної нервової системи на показники діяльності серця, що супроводжується істотним підвищенням ЧСС [20, 21]. Зростає активність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи [5, 22]. Норадреналін і адреналін через систему внутрішньоклітинних посередників стимулюють секрецію ключового ферменту розщеплення глікогену фосфорілази [8, 23]. При тривалому

перебуванні в умовах зниження Po₂ (проведення сеансів ПНГ) посилюється еритропоез, збільшується синтез нуклеїнових кислот і білків. У результаті підвищення кисневої ємності крові і здатності тканин захоплювати кисень, робота серця забезпечується в більш економному режимі. При цьому незначно знижується ЧСС, що пов'язано з підвищенням тону парасимпатичного відділу автономної нервової системи і зменшенням активності симпатичного [24 – 27]. У нашому

Зміна реакції дітей віком від 12 до 17 років при виконанні активної кліноортостатичної проби (M±m)

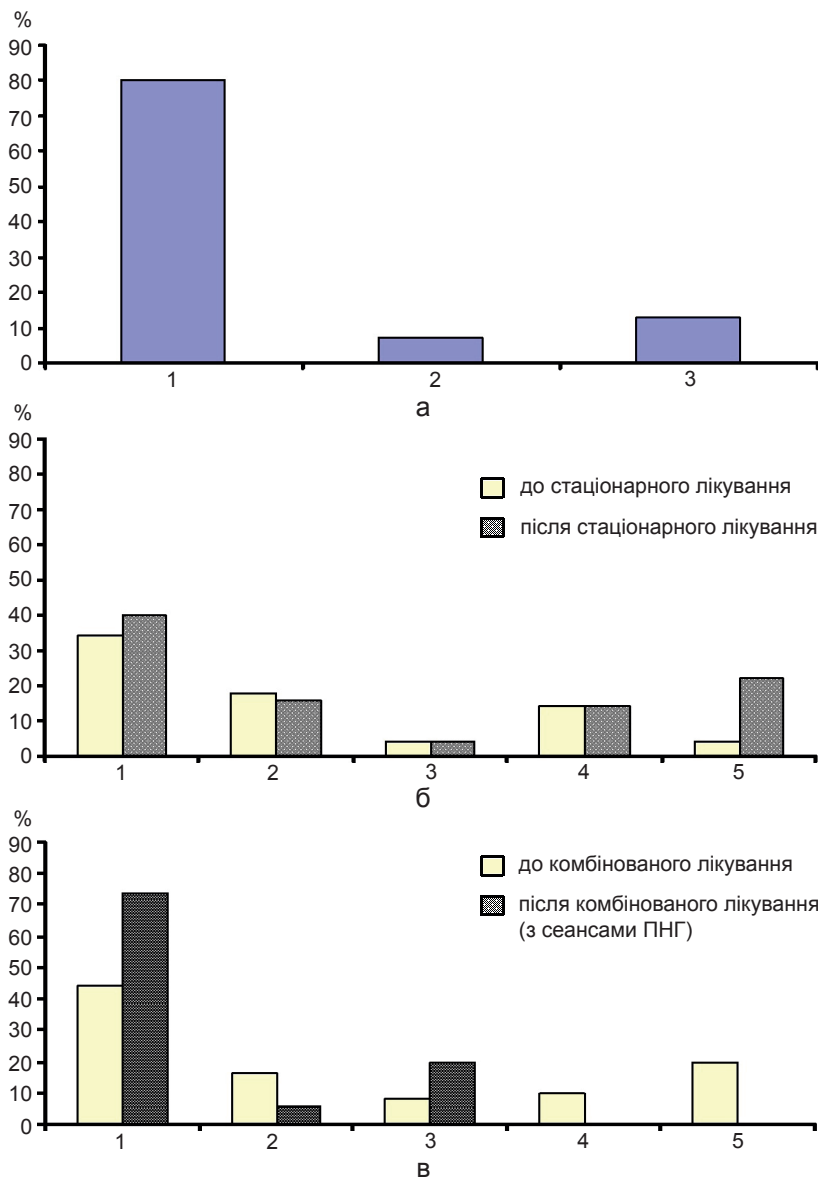
Показник	Горизонтальне положення	Вертикальне положення, 3-тя хвилина	Різниця між положеннями	Вертикальне положення, 10-та хвилина	Різниця між 3-ю і 10-ю хвилинами
Контрольна група (n=20)					
частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	65,50±2,44	85,20±2,04	+20,07	80,40±1,55	-4,8
артеріальний тиск мм рт.ст.					
систоличний	94,00±1,86	105,05±1,34	+10,8	104,00±1,41	-1,05
діастолічний	49,90±1,33	58,25±0,95	+8,33	56,75±0,97	-1,05
пульсовий	44,10±1,31	46,80±1,33	+2,47	47,25±1,09	+0,45
Група порівняння (n=50). До лікування					
частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	71,86±0,88	88,83±1,45	+16,97	85,25±1,16	-3,58
артеріальний тиск мм рт.ст.					
систоличний	100,03±1,47	116,62±1,33	+16,59	114,58±1,19	-2,04
діастолічний	57,66±1,04	63,23±1,15	+5,57	62,37±1,19	-0,86
пульсовий	50,78±1,00	53,57±0,85	+2,78	52,17±0,83	-1,40
Після лікування					
частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	71,85±0,82	89,17±1,06	+17,67	87,51±1,00	-1,66
артеріальний тиск мм рт.ст.					
систоличний	107,06±1,15*	122,62±0,89*	+15,56	115,69±0,96	-6,93
діастолічний	57,65±0,94	65,55±0,98	+7,9	61,66±1,07	-3,89
пульсовий	49,28±0,80	57,20±1,19	+7,92	54,38±0,67	-2,82
Основна група (n=50) До комбінованого лікування					
частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	75,66±1,19	93,80±1,52	+18,14	92,98±1,50	-0,82
артеріальний тиск мм рт.ст.					
систоличний	108,22±1,92	114,96±1,34	+6,67	114,08±1,18	-0,88
діастолічний	60,28±1,27	67,44±1,27	+7,16	66,14±1,22	-1,33
пульсовий	48,08±1,20	47,65±0,99	-0,43	47,94±1,08	+0,29
Після комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії					
частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	75,18±1,49	89,72±0,90	+14,54	83,68±0,81*	-6,04
артеріальний тиск мм рт.ст.					
систоличний	103,80±1,10*	111,88±0,85**	+8,96	108,28±0,70*,**	-3,6
діастолічний	57,12±1,41	63,74±0,75	+6,62	54,68±0,67**	-9,06
пульсовий	45,52±0,76	49,62±0,99**	+4,1	53,60±0,79	+3,98

*P<0,05 різниця показників у групі до і після лікування, ** P<0,05 різниця показників після лікування відносно групи порівняння

дослідженні після застосування комбінованого лікування спостерігається вірогідне зниження САТ у спокої, а ЧСС і САТ на 10-й хвилині ортостазу, що може свідчити про поліпшення та стійкість гемодинаміки.

Згідно з літературними джерелами у дітей, котрі мають патологію ШКТ, часто спостерігається перевага парасимпатичної регуляції [11, 28]. З боку серцево-судинної системи виявляють порушення ритму і про-

відності [28 – 30]. Наші дослідження дають підставу стверджувати, що після застосування комбінованого лікування з курсом сеансів ПНГ реєструється більш активне підвищення адаптаційних можливостей серцево-судинної системи, ніж у групі, яка отримувала стандартне лікування. Про це свідчать показники ЕКГ, які виявили порушення процесів реполяризації, синусової тахікардії та аритмії. Гіпоксичне тренування нормалізує вегетатив-



Варіанти реакцій на активну кліноортостатичну пробу у дітей віком від 12 до 17 років (у відсотках від загальної кількості дітей): 1 – нормальний, 2 – гіперсимпатикотонічний, 3 – астеносимпатичний, 4 – симпатикоастенічний, 5 – асимпатикотонічний; а – контрольна група, б – порівняння, в – основна група

не забезпечення діяльності серцево-судинної системи та поліпшує гемодинаміку.

ВИСНОВКИ

1. При клінічному обстеженні у 50 – 56% дітей віком від 12-17 років, що постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях і мають патологію ШКТ, виявлено вегетативну дисфункцію.

2. У дітей, які отримали комбіноване лікування (стандартне і курс сеансів ПНГ) вірогідно зменшився САТ у вихідному (горизонтальному) положенні, а на 3-й хвилині реєстрували тенденцію до його зниження. Крім того, статистично значуще зменшувалася САТ і ЧСС на 10-й хвилині ортостатичної проби, що дає підставу стверджувати про поліпшення стабільності гемодинаміки.

3. Виявлено збільшення кількості пацієнтів на 34% з нормальним типом реагування на ортостатичну пробу, котрі отримали комбіноване лікування з курсом сеансів ПНГ відносно групи порівняння (лише стандартне лікування).

4. Дітям, що постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях і мають патологію ШКТ, крім стандартного патогенетичного лікування варто застосовувати сеанси гіпоксичного тренування для поліпшення вегетативного забезпечення діяльності серцево-судинної системи.

Л.М. Лісуха, В.А. Березовский

ВЛИЯНИЕ ПРЕРЫВИСТОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ ДЕТЕЙ, КОТОРЫЕ ЖИВУТ НА РАДИОАКТИВНО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

Исследовано влияние прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) саногенного уровня на состояние сердечно-сосудистой системы у 120 детей в возрасте от 12 до 17 лет, которые поделены на три группы. В I контрольной – было 20 человек (практически здоровые), II группа сравнения – 50, III основная – 50. Обследуемые II группы получали стандартное лечение, а III – дополнительно к нему сеансы ПНГ. У детей основной группы в покое си-

століческое артеріальне тиск достовірно знизилось с $108,2 \pm 1,9$ до $103,8 \pm 1,1$ мм рт.ст. На 10-й минуте ортостаза статистически уменьшилась частота сердечных сокращений на $9,3 \text{ мин}^{-1}$ и систоліческое артеріальне тиск на $8,4$ мм рт. ст., а диастоліческое артеріальне тиск на $7,8$ мм рт. ст. относительно значений II группы. Вегетативное обеспечение деятельности сердечно-сосудистой системы с нормальным типом реагирования было на 34% выше относительно группы сравнения. Это свидетельствует об улучшении гемодинамики и повышении адаптационных возможностей автономной нервной системы. Ключевые слова: прерывистая нормобарическая гипоксия; сердечно-сосудистая система; автономная нервная система; клиноортостатическая проба; дети.

L.M. Lisukha, V.Ya. Berezovsky

INFLUENCE OF INTERMITTENT NORMOBARIC HYPOXIA ON CARDIOVASCULAR SYSTEM AND HEMODYNAMIC PARAMETERS OF CHILDREN LIVED AT RADIATION CONTAMINATED TERRITORIES

The effect of intermittent normobaric hypoxia (INH) of sanogenic level on the state of the cardiovascular system in 120 children aged from 12 to 17 years was studied. Children were divided into 3 groups. The 1st control group consisted of 20 persons (practically healthy ones), the 2nd group, a group of comparison, included 50 persons, and there were 50 persons in the 3rd group – a main group. Examined patients of two studied groups received the standard therapy, and those of the 3rd group – the seances of intermittent normobaric hypoxia additionally to standard therapy. Systolic arterial pressure was significantly decreased in the rest from $108,2 \pm 1,9$ to $103,8 \pm 1,1$ mm Hg in children of the main group. Comparing the heart rate, systolic arterial pressure and diastolic arterial pressure their statistically decreased values by $9,3 \text{ min}^{-1}$, $8,36$ and $7,84$ mm Hg were revealed at 10 minutes of orthostatic, respectively. Autonomic supplying the activity of cardiovascular system with normal type of reaction was 34 % higher than that of the comparison group. It indicates an the improvement in hemodynamics and an increase in adaptation capabilities of the autonomic nervous system.

Key words: intermittent normobaric hypoxia; cardiovascular system; autonomic nervous system; clinoorthostatic test; arterial pressure; children.

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

REFERENCES

- Wayne AM, Voznesenskaya TG, Vorobyova OV. Vegetative disorders. Clinic, diagnosis, treatment. Moscow: OOO «Medical News Agency»: 2003. [Russian].
- Fomych GM. Types of orthostatic reactions in heart rate and their clinical significance. Bul VN Karazin Khark Nat

- Univers. 2010;20:88-97. [Ukrainian].
3. Chorna YuA. Types of orthostatic reactions of arterial pressure and their clinical significance. Bull. VN Karazin Khark Nat Univers. 2010;20:98-107.[Ukrainian].
4. Belokon NA, Kuberger MB. Diseases of the heart and blood vessels in children: 2 t. Moscow: Medicine: 1987. [Russian].
5. Kolchinskaya AZ. Using the a stepped of adaptation to hypoxia in medicine. Vestn Ros Akad Scien. 1997;5:12-9. [Russian].
6. Lesova EM, Samoilov VO, Filippova EV, Savokina OV. Individual differences of hemodynamics in terms of hypoxia and orthostatic stress. Vestn Rus Milit Med Acad. 2015;1:157- 63. [Russian].
7. Lesova EM, Samoilov VO, Filippova EV, Savokina OV. Individual differences of hemodynamics in terms of hypoxia and orthostatic stress. Vestn Rus Milit Med Acad. 2015;3:109-13. [Russian].
8. Nesterov SV. Vegetative regulation of heart rhythm under condition of acute experimental hypoxia. Hum Physiol. 2005;1:82-7. [Russian].
9. Ishekov AN, Mosyagin IG. Dynamic of cardiorespiratory system indices in students during adaptation to atmospheric hypoxia in European North of Russia. Hum Ecol. 2009;1:38-41.[Russian].
10. Serebrovskaya TV, Shatilo VB. Experience of using interval hypoxia in prevention and treatment of cardiovascular diseases: Review. Circ and Hem. 2014;1-2:16-33.[Ukrainian].
11. Stepanov OG, Lysencov SP, Ozheva RS, Fateeva CA. On the role of central and vegetative nervous system in the mechanisms of hypoxic stimulation adaptation in patients with the digestive system functional disorder. New Technol. 2012;4:44-9. [Russian].
12. Tyurin IA, Korovin OA, Kontemirova MG, Anokhin AI. Effect of short-term hypoxic load on the autonomic regulation and hemodynamic parameters in children with vegetative dystonia syndrome. Vestn Russ Univer of Peopl Friendship. «Medicine» Series. 1999;2:110-14. [Russian].
13. Vlasenko AV, Long VV, Rychakov Ya, Bugun OV. Influence of normobaric hypoxic therapy on the emotional state of children and adolescents with hypertension. Bull ESSC SB RAMS. 2007;3: 29-31. [Russian].
14. Lisukha LM. Effect of intermittent normobaric hypoxia on vegetative homeostasis and hemodynamic parameters of children aged 6-11 years who live at radiation contaminated territories. Sovr Pediatr. 2015;7: 66-70. DOI: 10.15574/SP.2015.71. [Ukrainian].
15. Kondoashova VG, Kolpakov IYe, Vdovenko VYu, Stepanova YeI [et al]. Condition of vegetative homeostasis in children residents of contaminated territories with chronic gastroduodenal pathology. Hyg Local. 2013;61:258-64. [Ukrainian].
16. Medical and demographic consequences of the Chernobyl disaster in Ukraine. Chornobylinterinform. Kyiv; 2004. p. 58-75. [Ukrainian].
17. Berezovskiy VYa, Horban YM, Levashov MI, Sutkovsky AD. Technology body resistance increase using hypoxotherapy. Kyiv; 2000. [Ukrainian].
18. Chemeresyuk IG. Modern methods of diagnostics of autonomic dysfunction in children and adolescents living in an area of high background radiation and their correction in sanatorium conditions. Ukr Med Almanac. 2002;6:155-6. [Ukrainian].
19. Korol' NO, Fuzik M, Huhryanska ON. Psychological characteristics and psychosomatic disease the affected child and adolescent population. Probl of Rad Med and Radiobiol. 2011;16:126-37. [Ukrainian].
20. Krivoshchekov SG, Divert GM, Divert VE. Reaction to the trained breath-hold individuals on intermittent normobaric hypoxia. Hum Phys. 2007;33(3):75-80. [Russian].
21. Samoylov VO, Maccimov AL, Filippova, Korolyev YN [et al]. Characteristic of the individual differences of the functional status in conditions of hypoxia. Vestn Rus Milit Med Acad. 2013;3(43):1-7.[Russian].
22. Katerezi GI Current status of the study normobaric hypoxia through the prism Sanacreatology. Bul ASM Stiint viet. 2011;2(314): 61-71.
23. Kayser B, Verges S. Hypoxia energy balance and obesity: from pathophysiological mechanisms to new treatment strategies. Obes Rev. 2013;7:579 -92.
24. Nechayev AV, Aminov AS, Pozina NV, Chaychenko DV, Lyapkalo VI. Resistance to hypoxia and vestibular stability pupils and pupils of 6-14 years, the social rehabilitation center. Bul SUSU. 2007;2:120-4. [Russian].
25. Ishekov AN, Lupachev VV, Yurieva M Yu, Koubassov RV. Total serum changes and cardiovascular system at seamen during work in region beyond the arctic circle. World Scien Cult Educat. 2013;3:380 -3. [Russian].
26. Sazonova TG, Bolotova AV, Bedareva IV [et al]. Adaptation to intermittent hypoxia / hyperoxia enhances efficiency of exercise training. Intermit. and Hum. Dises. Springer, UK. 2012, Charter. P.191- 205.
27. Ishekov AN, Mosyagan IG. Parameterizes of central hemodynamic during normobaric hypoxia. The world scien educat cult. 2013;3(40):380-3.[Russian].
28. Belyaeva LM. Pediatric cardiology and rheumatology. Moscow: OOO «Medical News Agency»: 2011. [Russian].
29. Kuzmina AY. Status of the cardiovascular system in the pathology of the upper gastrointestinal tract. Treat phys. 2004;4:46-51. [Russian].
30. Boyarskaya LN, Ivanova KA, Kravets LV, Levchuk TO. Peculiarities of heart rate variability in children with gastroesophageal reflux disease. Zaporozh Med J. 2014; 2(83):39-43.[Ukrainian].

*Матеріал надійшов до
редакції 24.02.2016*

Вплив психоемоційного навантаження на показники імунної системи в осіб, що проживали на територіях, забруднених радіонуклідами

В.Л. Соколенко

Черкаський національний університет ім. Богдана Хмельницького; e-mail: sokolenko@ukr.net

Вивчали особливості показників імунної системи у мешканців території, забруднених радіонуклідами, за умов додаткового психоемоційного навантаження. Обстежено 150 осіб з відносно екологічно чистих територій (контрольна група) і 200 осіб з територій посиленого радіоекологічного контролю. Всі обстежені – студенти Черкаського національного університету віком від 18 до 24 років. Роль додаткового фактора психоемоційного навантаження відіграла зимова екзаменаційна сесія. Встановлено, що в міжсесійний період спостерігалися перерозподіл лейкограми на користь гранулоцитарних фракцій, а також зниження відносної і абсолютної кількості лімфоцитів, що експресують антигени CD3, CD5, CD4, CD16, зниження імунорегуляторного індексу $CD4^+/CD8^+$ і підвищення концентрації сироваткового імуноглобуліну G. Психоемоційне навантаження посилювало виявлені тенденції, внаслідок чого значень, нижчих від гомеостатичної норми, сягали відносна ($23,41 \pm 1,01\%$) і абсолютна кількість ($0,28 \pm 0,02 \cdot 10^9/\text{л}$) T-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+$ та імунорегуляторний індекс ($1,04 \pm 0,03$). Для цих же показників спостерігався найдовший період відновлення. Ключові слова: радіаційне забруднення; стрес; кортизол; імуносупресія; відновний період.

ВСТУП

Останнім часом досить дискусійним є питання про статус населення, котре проживає на територіях, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС. З одного боку, основний фактор забруднення цих територій – довгоживучий радіонуклід ^{137}Cs , період піврозпаду якого – 30 років [1, 2]. Таким чином, з 1986 р. пройшов час, достатній для істотного зниження радіаційного навантаження на стан здоров'я мешканців IV радіаційної зони – території посиленого радіоекологічного контролю. Слід врахувати: по-перше, пройшов лише період піврозпаду; по-друге, внаслідок еколого-географічних особливостей забруднених районів, особливостей господарської діяльності людини і певних закономірностей міграції радіонуклідів, рівень забруднення ізотопами цезію у окремих населених пунктах залишився на істотно підвищеному рівні © В.Л. Соколенко

[3]. Крім того, зважаючи на стохастичний характер радіаційного впливу на біологічні об'єкти, індуковані опромінюванням зміни в організмі мешканців територій, забруднених радіонуклідами, можуть проявитися через віддалений період у вигляді більш чи менш виражених патологій чи передпатологічних станів [4, 5]. Зокрема, чисельні обстеження ліквідаторів аварії на ЧАЕС, котрі проходили бальнеотерапію на курорті Трускавець, виявили значну й різноспрямовану варіативність дисфункцій природної резистентності організму [6]. Тобто підтверджується факт високої радіочутливості імунної системи. Такий феномен пояснюють структурно-метаболічними процесами в біологічних мембранах імунокомпетентних клітин, викликаними радіаційними чинниками [7, 8]. Оптимальна робота імунних клітин можлива лише при належному функціональному стані мембранних рецепторів, котрі визначають роль лімфоцита

у реалізації певних процесів [9, 10]. При додаткових навантаженнях, зокрема, впливі психоемоційного стресу, ризик порушень роботи імунної системи зростає [11]. Таким чином, оцінка імунного статусу мешканців територій, забруднених радіонуклідами, особливо, за умов наявності додаткових імунодепресантів, залишається актуальною.

Мета нашої роботи вивчити особливості показників імунної системи у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, за умов додаткового психоемоційного навантаження.

МЕТОДИКА

Протягом 2000-2015 рр. нами обстежено 145 осіб чоловічої статі та 205 осіб жіночої статі (обстежених у фолікулярну стадію менструального циклу), серед яких виділили групу мешканців радіаційно незабруднених районів (контрольна група, 150 осіб) та мешканців територій посиленого радіоекологічного контролю (IV радіаційна зона, щільність забруднення ґрунтів ізотопами ^{137}Cs $3,7 \cdot 10^4$ – $18,5 \cdot 10^4$ Бк/м², 200 осіб). Всі обстежені – студенти Черкаського національного університету віком від 18 до 24 років, котрі на час обстеження не мали гострих захворювань. Між показниками осіб різних статей не спостерігалось статистично вірогідної різниці, тому надалі їх розглядали як єдину сукупність.

Роль додаткового стресового фактора, що зумовив розвиток психоемоційного навантаження, відіграла зимова екзаменаційна сесія. Забори крові проводили вранці, до вживання їжі. У обстежених відбирали 10 мл венозної крові. Для частини аналізів (оцінки лейкоцитарної формули та кількості лейкоцитів) використовували капілярну кров. Перший аналіз показників імунної системи проводили у міжсесійний період, другий – після першого іспиту, третій – після останнього, четвертий – через 2 тиж відновного періоду.

Загальне число лейкоцитів підраховува-

ли в камері Горяєва, лімфоцитів – на основі кров'яного мазка (фарбування за Романовського-Гімзе). Експресію поверхневих антигенів лімфоцитами периферичної крові визначали імунофлуоресцентним методом з використанням моноклональних антитіл до поверхневих маркерів клітин імунної системи LT1, LT3 (для оцінки експресії пан-Т-клітинних маркерів CD3 та CD5), LT4, LT8, LNK16 (для оцінки експресії антигенів CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ та CD72⁺) та F(ab)₂ – фрагментів овечих антитіл до імуноглобуліну G (IgG) миші, мічених FITC («Сорбент», Росія).

Вміст Ig у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії з використанням моноспецифічних сироваток проти IgG(H), IgM(H), IgA(H), вміст кортизолу – імуноферментним методом з використанням набору «BIO-RAD» (США).

Отримані результати обробили методами варіаційної статистики з використанням програми Microsoft Excel і представляли у вигляді: середнє арифметичне \pm похибка середнього арифметичного ($M \pm m$). Вірогідність різниці між вибірками визначали за критерієм *t* Стюдента. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції (лінійної залежності) Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у обстежених з контрольної групи показники імунної системи перебували в межах гомеостатичної норми. У студентів з територій посиленого радіоекологічного контролю за умов відсутності психоемоційного навантаження спостерігався певний перерозподіл показників клітинної ланки імунітету на користь гранулоцитарних фракцій. Відносна та абсолютна кількість паличко- і сегментоядерних нейтрофілів збільшувалась, а лімфоцитів – знижувалась (таблиця). Такий ефект вважається типовою ознакою стресових реакцій помірної інтенсивності і узгоджується з даними літератури про хронічне опромінення малими дозами

[4, 11, 13]. Зростання абсолютної кількості еозинофілів на фоні відсутності їх відносного значення може бути відображенням підвищеного числа лейкоцитів у периферичній крові. Спостерігалася також певна імуносупресія Т-клітинної ланки імунітету, що проявлялася зниженням відносної та абсолютної кількості лімфоцитів, що експресують антигени CD3, CD5, CD4 та CD16. У обстежених був знижений імунорегуляторний індекс $CD4^+/CD8^+$ і підвищена концентрація сироваткового IgG (див. таблицю).

Таким чином, навіть за відсутності додаткових стресових впливів спостерігалася пригнічення окремих ланок клітинного специфічного імунітету, котре, до певної міри, компенсувалося зростанням продукції імуноглобулінів.

Зимова екзаменаційна сесія відбувалася в грудні і тривала близько 2 тиж. Враховуючи дані літератури [11], критерієм наявності додаткового психоемоційного навантаження вважали показник вмісту кортизолу у периферичній крові, а можливості адаптації організму аналізували за динамікою показників протягом сесії та наступного відновного періоду.

Встановлено, що у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, вміст кортизолу в міжсесійний період перебував на верхній межі гомеостатичної норми і був вірогідно підвищений порівняно з контролем. Цей показник вірогідно зростав після першого іспиту, зберігався підвищеним протягом сесії і на кінець відновного періоду повертався до міжсесійного значення, вірогідно вищого від контролю (див. таблицю). Раніше нами було показано, що вміст кортизолу у мешканців IV радіаційної зони демонстрував чіткий кореляційний зв'язок з активністю радіонуклідів [14].

Психоемоційне навантаження, зумовлене екзаменаційною сесією, викликало посилення тенденцій, виявлених у міжсесійний період. Зокрема, ще більше знизилися відносна та абсолютна кількість лімфоцитів на фоні

підвищення числа нейтрофілів у периферичній крові. Відносна та абсолютна кількість хелперних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+$, а також імунорегуляторний індекс у значній частини обстежених сягали значень, нижчих від гомеостатичної норми, чого не відмічалося для контрольної групи [12]. Вміст IgG, підвищений у міжсесійний період, став вірогідно нижчим як від контрольних, так і від значень, отриманих за відсутності додаткового психоемоційного навантаження (див. таблицю).

Вивчення динаміки показників протягом аналізованого періоду виявило кілька закономірностей. Зокрема, для більшості субпопуляцій Т-лімфоцитів, крім ефекторних/супресорних клітин з фенотипом $CD8^+$, які вважаються кортизолрезистентними і радіорезистентними [15, 16], відмічено тенденцію до прогресуючого зниження показників протягом періоду сесії (за середнім значенням). Число лімфоцитів з фенотипом $CD16^+$ та вміст сироваткового IgG реагували дещо інакше: від початку до кінця сесії вони поступово підвищувалися. Останній аналіз, проведений через 2 тиж після закінчення сесії, продемонстрував відновлення до міжсесійного рівня всіх показників, за винятком відносної та абсолютної кількості Т-лімфоцитів з фенотипами $CD3^+$, $CD4^+$ та імунорегуляторного індексу $CD4^+/CD8^+$ (див. таблицю).

Динаміка показників лімфоцитів з фенотипами $CD4^+$ та $CD16^+$, під час екзаменаційної сесії та відновного періоду, дає привід для формування гіпотез щодо механізмів розвитку адаптаційних чи дезадаптаційних процесів за таких умов. Хелперні Т-лімфоцити з фенотипом $CD4^+$ стимулюють запуск значного числа імунних процесів, і, при цьому, характеризуються підвищеною чутливістю до впливу іонізуючого випромінювання [7, 17-19]. Лімфоцити з фенотипом $CD16^+$ відіграють важливу роль у розпізнаванні і знищенні малігнізованих клітин [9, 15].

Зокрема, є підстави вважати, що виявлені зміни реалізуються на рівні проліфератив-

Показники імунної системи у осіб з території посиленого радіоекологічного контролю, котрі зазнали впливу психоемоційного навантаження

Показники	Контрольна група (n=150)	Дослідна група (n=200)			
		до сесії	після першого екзамену	кінець сесії	після відновного періоду
Кортизол, нмоль/л	345,51±5,93	637,15±12,09*	893,21±8,10*,**	899,1±10,21*,**	645,96±10,03*
Лейкоцити, x10 ⁹ /л	6,63±0,06	6,92±0,05*	7,05±0,15*	6,99±0,09*	6,95±0,07*
Лімфоцити, %	26,56±0,25	23,55±0,25*	20,44±0,38*,**	18,45±0,42*,**	24,12±0,42*
x10 ⁹ /л	1,81±0,03	1,65±0,03*	1,25±0,04*,**	1,21±0,06*,**	1,67±0,05*
Моноцити, %	5,68±0,28	6,10±0,22	5,61±0,22	5,99±0,31	6,00±0,25
x10 ⁹ /л	0,37±0,02	0,42±0,02	0,40±0,03	0,40±0,03	0,41±0,02
Нейтрофіли паличкоядерні, %	3,60±0,25	4,57±0,06*	7,15±0,15*,**	7,10±0,09*,**	4,61±0,08*
x10 ⁹ /л	0,25±0,02	0,31±0,02*	0,41±0,03*,**	0,41±0,03*,**	0,32±0,02*
Нейтрофіли сегментоядерні, %	62,88±0,46	65,11±0,48*	67,12±0,41*,**	67,01±0,51*,**	65,25±0,51*
x10 ⁹ /л	4,19±0,04	4,49±0,05*	6,01±0,08*,**	5,99±0,07*,**	4,55±0,06*
Базофіли, %	0,12±0,07	0,33±0,099	0,41±0,102	0,36±0,098	0,34±0,079
x10 ⁹ /л	0,01±0,005	0,02±0,008	0,02±0,009	0,02±0,009	0,02±0,009
Еозинофіли, %	1,00±0,22	2,34±0,19*	2,89±0,21*	2,55±0,20*	2,39±0,19*
x10 ⁹ /л	0,06±0,015	0,10±0,010*	0,14±0,018*	0,13±0,017*	0,11±0,012*
CD3 ⁺ , %	66,10±0,41	62,68±0,59*	54,33±1,14*,**	52,41±1,35*,**	59,99±0,99*,**
x10 ⁹ /л	1,20±0,02	1,03±0,02*	0,75±0,05*,**	0,61±0,05*,**	0,98±0,04*
CD5 ⁺ , %	71,79±0,56	65,65±0,59*	60,41±1,06*,**	61,25±0,99*,**	64,99±0,88*
x10 ⁹ /л	1,36±0,01	1,11±0,02*	0,77±0,06*,**	0,81±0,06*,**	1,09±0,06*
CD4 ⁺ , %	40,28±0,39	33,84±0,51*	27,84±1,12*,**	23,41±1,01*,**	29,45±0,97*,**
x10 ⁹ /л	0,81±0,01	0,63±0,01*	0,35±0,02*,**	0,28±0,02*,**	0,55±0,02*,**
CD8 ⁺ , %	27,56±0,38	26,81±0,31	25,99±0,48	26,17±0,39	27,54±0,42
x10 ⁹ /л	0,49±0,01	0,47±0,01	0,42±0,02	0,45±0,02	0,47±0,02
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,65±0,02	1,36±0,02*	1,15±0,02*,**	1,04±0,02*,**	1,17±0,02*,**
CD16 ⁺ , %	18,55±1,02	14,80±0,99*	10,12±1,05*,**	12,36±1,11*	14,58±1,13*
x10 ⁹ /л	0,34±0,02	0,23±0,01*	0,10±0,01*,**	0,15±0,01*,**	0,20±0,02*
CD72 ⁺ , %	9,84±0,16	10,25±0,32	9,56±0,98	10,45±1,01	11,56±1,10
x10 ⁹ /л	0,17±0,01	0,17±0,02	0,14±0,02	0,15±0,02	0,15±0,01
Імуноглобуліни, мг/мл					
G	10,01±0,17	11,44±0,41*	6,55±0,98*,**	7,89±0,85*,**	9,45±0,51**
M	1,69±0,11	1,87±0,14	1,79±0,14	1,81±0,14	1,89±0,15
A	1,81±0,08	1,68±0,08	1,64±0,09	1,65±0,08	1,70±0,08

*P<0,05 щодо контролю; ** P<0,05 щодо показників до психоемоційного навантаження

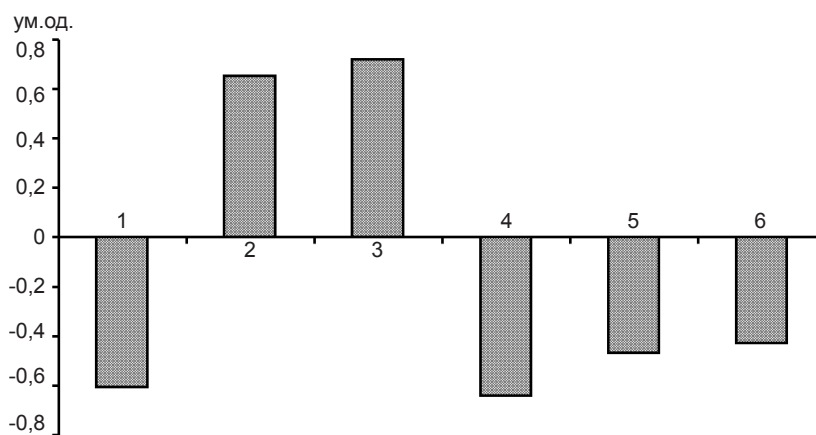
них і диференціювальних процесів у тимусі. Дійсно, зниження числа функціонально зрілих Т-лімфоцитів з фенотипом $CD3^+$ відбувається, вочевидь, за рахунок хелперної субпопуляції з фенотипом $CD4^+$ і реалізується на останніх етапах диференціювання, оскільки інший пан-Т-клітинний маркер, $CD5$, відновлюється ефективніше. Крім того, відмічено зниження експресії антигена $CD16$, що є однією з ознак цитотоксичної кілерної активності, на фоні відсутності змін кількості цитотоксичних/супресорних Т-клітин з фенотипом $CD8^+$. Такий ефект може бути свідченням зниження вмісту природних кілерів, розвиток яких не асоційований з тимусом. Антиген $CD16$ експресується і на природних кілерах (але при відсутності маркера функціонально зрілих Т-клітин $CD3$), і на цитотоксичних Т-лімфоцитах [15, 20].

Хоча В-лімфоцити з фенотипом $CD72$ вважаються стійкими до стресових чинників [5, 6], зміни продукції сироваткових IgG свідчать, що накладання хронічного опромінення малими дозами і посиленого психоемоційного навантаження викликало збої у компенсаторних механізмах, зокрема, на рівні продукції сироваткових імуноглобулінів, можливість яких пояснювалася підвищеним вмістом IgG у мешканців територій, забруднених радіонуклідами.

Для оцінки інтегративної роботи імунної системи провели кореляційний аналіз показників. Виявилось, що найчіткіше закономірності взаємодії проявилися у кінці екзаменаційної сесії на фоні максимального зростання вмісту кортизолу.

Пряма кореляційна залежність спостерігалася між відносною кількістю Т-лімфоцитів з фенотипом $CD3^+$ та субпопуляцією Т-хелперів з фенотипом $CD4^+$; субпопуляції Т-хелперів з фенотипом $CD4^+$ та імунорегуляторного індексу $CD4^+/CD8^+$ (рисунк).

Такий ефект є закономірним, оскільки хелперні Т-лімфоцити є однією з двох головних субпопуляцій функціонально зрілих Т-лімфоцитів, які, у свою чергу, формують імунорегуляторний індекс. Інша субпопуляція, ефекторні/супресорні Т-лімфоцити з фенотипом $CD8^+$ демонстрували зворотний кореляційний зв'язок з імунорегуляторним індексом, що ще раз підтверджує їх відносну стресостійкість. Крім того, стабільне число супресорної субпопуляції на фоні зниження активності Т-хелперів відобразилося негативним кореляційним зв'язком між Т-лімфоцитами з фенотипом $CD8^+$ та вмістом сироваткового IgG, продукція якого вимагає індукції з боку клітин з фенотипом $CD4^+$. Зворотний кореляційний зв'язок між відносною кількістю Т-лімфоцитів з фенотипом $CD3^+$ та



Найбільш виражені вірогідні кореляційні залежності показників імунної системи у обстежених за умов психоемоційного навантаження: 1 – нейтрофіли (%) та лімфоцити (%); 2 – $CD3^+$ (%) та $CD4^+$ (%); 3 – $CD4^+$ (%) та $CD4^+/CD8^+$; 4 – $CD8^+$ (%) та $CD4^+/CD8^+$; 5 – $CD3^+$ (%) та $CD72^+$ (%); 6 – $CD8^+$ (%) та IgG

В-лімфоцитів з фенотипом CD72⁺ відображає певну компенсацію пригнічення Т-клітинної ланки імунітету зростанням частки потенційних продуцентів антитіл. Таким чином, хоча продукція головного сироваткового Ig, за стресових умов, загальмована, гомеостатичний рівень інших Ig, зокрема, IgM (продукція якого не вимагає стимуляції з боку Т-хелперів), очевидно, забезпечується відносним зростанням кількості функціонально зрілих В-лімфоцитів.

Підтвердженням перерозподілу лейкограми на користь поліморфноядерних клітин, за умов стресової ситуації, є негативний кореляційний зв'язок між відносною кількістю нейтрофілів і відносною кількістю лімфоцитів.

Таким чином, психоемоційне навантаження, викликане екзаменаційною сесією, викликає зниження багатьох показників специфічного імунітету, найбільш виражене безпосередньо після останнього екзамену. У студентів, що приїхали з територій, забруднених радіонуклідами, показники при цьому часто виходять за межі гомеостатичної норми. Найдовше відновлюються функціонально зрілі Т-лімфоцити, зокрема, їх регуляторна субпопуляція з фенотипом CD4⁺. Додатковий короточасний стресовий чинник, поєднаний із хронічним впливом малих доз радіації, посилює залежність імуносупресії, зумовленої радіаційним забрудненням місцевості проживання обстежених, і створює підстави для регулярного моніторингу стану здоров'я населення, що зазнало комбінованого стресового впливу, а у період відновлення – для реалізації профілактичних заходів.

В.Л. Соколенко

ВЛИЯНИЕ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ

Изучали особенности показателей иммунной системы у населения территорий, загрязненных радионуклидами, в условиях дополнительного психоэмоциональной нагрузки.

Обследовано 150 лиц из относительно экологически чистых территорий (контрольная группа) и 200 лиц из территорий усиленного радиоэкологического контроля. Все обследованные – студенты Черкасского национального университета в возрасте от 18 до 24 лет. Роль дополнительного фактора психоэмоциональной нагрузки выполняла зимняя экзаменационная сессия. Установлено, что в межсессионный период наблюдались перераспределение лейкограммы в пользу гранулоцитарных фракций, а также снижение относительного и абсолютного количества лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD5, CD4, CD16, снижение иммунорегуляторного индекса CD4⁺/CD8⁺ и повышенная концентрация сывороточного иммуноглобулина G. Психоэмоциональная нагрузка вызвала усиление обнаруженных тенденций, вследствие чего значений ниже гомеостатической нормы достигали относительное (23,41±1,01%), абсолютное количество (0,28±0,02x10⁹/л) Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺ и иммунорегуляторный индекс (1,04±0,03). Для этих же показателей наблюдался самый длительный период восстановления.

Ключевые слова: радиационное загрязнение; стресс; кортизол; иммуносупрессия; восстановительный период

V.L. Sokolenko

IMPACT OF EMOTIONAL STRESS ON THE IMMUNE SYSTEM INDICES AMONG RESIDENTS OF RADIATION CONTAMINATED AREAS

The aim of this research is to study special characteristics of immune system functioning among residents of the areas contaminated with radionuclides, under conditions of additional emotional load. We examined 350 people, including a group of radiation free areas residents (control group, 150 people) and a group of residents living in the areas of enhanced radiation monitoring (IV radiation zone, the density of soil contamination with isotopes ¹³⁷Cs 1-5 Ki/km², 200 people). All examined are the students of Cherkassy State University, aged 18-24 years, at the time of research didn't have any acute diseases. The role of additional stress factor (additional emotional load) was fulfilled by winter examination session. The first analysis of immune system indices was carried out in the interval between examination sessions, the second – after the first exam, the third – after the last exam, the fourth – after two weeks recovery period. Indicators of cellular immunity were determined by immunophenotyping and dyeing on Romanowsky-Giemsa. The level of immunoglobulins in blood serum was determined by radial immunodiffusion on Mancini. The level of cortisol in blood serum was determined by immunoenzyme method. We determined that leukogram redistribution in favor of granulocyte fractions can be observed in the analyzed group in the intersession period, and also the reduction of the relative and absolute number of lymphocytes expressing antigens CD3, CD5, CD4 and CD 16. Also, all examined had

reduced immunoregulatory index $CD4^+/CD8^+$ and increased concentration of serum immunoglobulin G. Emotional stress increased earlier revealed tendencies. As a result the relative ($23.41 \pm 1.01\%$) and absolute ($0.28 \pm 0.02 \times 10^9/\mu$) number of T cells with the phenotype $CD4^+$, and immunoregulatory index (1.04 ± 0.03) reached values lower than homeostatic norm. These indicators also show the longest period of recovery. Dynamics of the analyzed indices in session and recovery periods gives a reason to believe that mechanisms of adaptation and deadaptation are better displayed for thymus-dependent cells. Additional short-term stress factor intensifies immunosuppression caused by living in radiation contaminated areas, and creates the basis for regular monitoring of health status of the population that suffered from the combined stress and for implementing preventive measures during the recovery period. Key words: radiation contamination; stress; cortisol; immunosuppression; recovery period

Cherkasy State University of Bohdan Khmelnytsky

REFERENCES

- Hoshi M, Konstantinov YO., Evdeeva TY, Kovalev AI, Aksenov AS, Koulikova NV et al. Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991-1996. *Health Phys.* 2000;79:182-6.
- Morita N, Takamura N, Ashizawa K, Shimasaki T, Yamashita S, Okumura Y. Measurement of the whole-body ^{137}Cs in residents around the Chernobyl nuclear power plant. *Radiat Prot Dosimetry.* 2005; 113: 326-9.
- Radiological situation in the territories referred to zones of radioactive contamination. Ministry of Emergencies and Protection of the Population from the Chornobyl Catastrophe of Ukraine. Ed. V.I. Kholosha. Kyiv, 2008. 49 p. [Ukrainian].
- Godekmerdan A, Ozden M, Ayar A. Diminished cellular and humoral immunity in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Arch Med Res.* 2004;35: 324-8.
- McMahon D, Vdovenko V, Karmaus W. Effects of long-term low-level radiation exposure after the Chernobyl catastrophe on immunoglobulins in children residing in contaminated areas: prospective and cross-sectional studies. *Environ Health.* 2014;13(1): 36-50.
- Prokopovych LN, Bul'ba AY. Specifics of immunotropic reactions caused by balneotherapy in Truskavets' spa among disaster fighters at ChNPP with various state of immunodysfunction. *MH&Rh.* 2005; 3(1): 57-9 [Ukrainian].
- Balogh A, Persa E, Bogdarndi EN, Benedek A, Hegyesi H, Sarfrany G, Lumniczy K. The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells. *Inflamm Res.* 2013; 62: 201-12.
- Sajjadi MR, Sheikh LV, Kuznetsova VB. Effect of ionizing radiation on development process of T-cell population lymphocytes in Chernobyl children. *Iran J Radiat Res.* 2009;7:127-33.
- Drannik GN. Clinical immunology and allergology. Odessa: Astroprint. 1999. 604 p. [Russian].
- Wang HC, Klein JR. Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor. *Crit Rev Immunol.* 2001;21(4): 323-37.
- Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological Stress and Disease. *JAMA.* 2007;298(14):1685-7.
- Sokolenko VL, Sokolenko SV. Impact of emotional stress on specific immunity in patients with various combinations of genetic blood markers. Materials of XVII Congress of Ukrainian Physiological Society with international participation. *Fiziol Zh* 2006; 52(2):114 [Ukrainian].
- Haitov RM, Leskov VP. Immunity and stress. *Rus Physiol J.* 2001; 87(8): 1060-72 [Russian].
- Sokolenko VL, Sokolenko SV. Radionuclide activity and the immune system functioning in residents of radiation contaminated areas. *Visn Dnipropetr Univ Ser Biol Med.* 2015;6(2):93-6. [Ukrainian].
- Finlay D, Cantrell DA. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 109-17.
- Hommel M, Hodgkin PD. TCR affinity promotes $CD8^+$ T cell expansion by regulating survival. *J Immunol.* 2007; 179: 2250-60.
- Jahns J, Anderegg U, Saalbach A, Rosin B, Patties I, Glasow A. et al. Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutat Res.* 2011; 709-710: 32-9.
- Kinet S, Swainson L, Lavanya M, Mongellaz C, Montel-Hagen A, Craveiro M et al. Isolated receptor binding domains of HTLV-1 and HTLV-2 envelopes bind Glut-1 on activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. *Retrovirology.* 2007; 4:31.
- Weng L, Williams RO, Vieira PL, Screatton G, Feldmann M, Dazzi F. The therapeutic activity of low-dose irradiation on experimental arthritis depends on the induction of endogenous regulatory T cell activity. *Ann Rheum Dis.* 2010;69: 1519-26.
- Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol.* 2009;39(8): 2059-64.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.01.2016*

Залежність вмісту мієлопероксидази плазми крові від функціонального стану нейтрофілів у хворих на гострий інфаркт міокарда

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

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

Метою нашої роботи було визначити залежність вмісту мієлопероксидази (МПО) в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда від стану киснезалежного метаболізму нейтрофілів, яке оцінювали за активністю мієлопероксидази, супероксид-аніона і каталази в клітинах, а також за вмістом у них перекису водню. Обстежено 19 практично здорових добровольців і 56 пацієнтів з гострим інфарктом міокарда. Отримані результати свідчать про те, що вміст МПО в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда залежить від функціонального стану нейтрофілів, який, в свою чергу, пов'язаний з клінічними особливостями хворих. Низький вміст асоціюється виключно з низькою активністю МПО нейтрофілів, а також інших кисневих радикалів. Високий вміст МПО в плазмі супроводжується низькою або високою активністю МПО нейтрофілів і є патогномонічним для хворих на гострий інфаркт міокарда.

Ключові слова: гострий інфаркт міокарда; мієлопероксидаза; нейтрофіли.

ВСТУП

Атеросклероз є хронічним запальним процесом, що характеризується акумуляцією ліпідів, запальних клітин і некротичного матеріалу в артеріальній стінці [1]. В зв'язку з цим великий інтерес учених викликає ідентифікація ключових чинників, що сприяють цьому процесу. Недавно в літературі з'явилися дані про істотну роль в атерогенезі мієлопероксидази (МПО) – ферменту, що секретується лейкоцитами [2, 3]. Найбільше її міститься в нейтрофілах – основних клітинах вродженого імунітету, складаючи близько 5% всього об'єму клітини. У нейтрофілах МПО з'являється на рівні промієлоциту в азурофільних гранулах і виділяється після активації різними агоністами [4]. Вона відноситься до чинників, вміст яких не залежить від стимуляції клітин, а цілком визначається кількістю речовини, синтезованої в процесі гранулопоезу [5, 6].

В азурофільних гранулах МПО знаходиться в неактивному стані до стимуляції нейтрофілів і у відсутності перекису водню – основного субстрату МПО, що продукується *in vivo* при «дихальному вибуху». В активованих нейтрофілах у процесі дегрануляції МПО вивільняється у фагосому разом з іншими ферментами, зокрема, з НАДФ-оксидазою, що продукує супероксид-аніон – O_2^- . Він високореактивний, але нестабільний і швидко перетворюється на H_2O_2 спонтанно або за наявності супероксиддисмутази. Перекис водню має низький окисний потенціал і не дає оптимального антимікробного ефекту. Реакцію його розкладання на воду і молекулярний кисень каталізує каталаза. Надалі перекис водню в комбінації з МПО формує ферментно-субстратний комплекс, який окиснює іони галогенів (Cl^- , I^- , Br^-) і утворює високореакційні агенти, зокрема гіпохлорну кислоту (HOCl) [7, 8]. Ці фактори ініціюють

перекисне окиснення ліпідів і викликають модифікацію білків. Утворені хлораміни є довгоживучими та забезпечують пролонгацію окисдантної активності пероксидазної системи і проникнення МПО-залежних окисдантів у біологічні рідини на тривалі дистанції в умовах, коли більш реактивні продукти швидко видаляються [9].

При гострому запаленні МПО виділяється фагоцитами в кровоносне русло і може визначатися на ендотеліальній поверхні, всередині ендотеліальних клітин і в субендотеліальному просторі. Тут вона може реагувати з перекисом водню, що утворилася за допомогою судинної НАДФ-оксидази, модулюючи NO-залежний сигнал. Утилізуючи атеропро-тективний NO, МПО бере участь у розвитку ендотеліальної дисфункції, акумулюючи піні-стих клітин в артеріальній стінці і, ймовірно, здатна провокувати уразливість бляшки [3, 6]. Таким чином, окисдавальні реакції, які ката-лізуються МПО, є причиною ендотеліальної дисфункції [10-12]. Крім того, МПО входить до складу нейтрофільних позаклітинних пасток що вивільняються з нейтрофілів і складаються з деконденсованого хроматину і антимікробних чинників (еластаза, МПО тощо). Їх формування відбувається через раніше невідомий вид клітинної смерті, від-мінний від некрозу і апоптозу. Для розвитку цього процесу потрібна продукція активних кисневих радикалів, у результаті накопичення яких руйнується ядерна оболонка, хроматин потрапляє в цитоплазму і деконденсуєть-ся. Далі він зв'язується з антимікробними протеїнами цитоплазми і гранул, до яких відноситься МПО, і виходить з клітини. Крім бактерій, вірусів, грибків, паразитів, антитіл та імунних комплексів, утворенню нейтро-фільних позаклітинних пасток сприяють також тромбоцити, що активують нейтрофі-ли через toll-подібні рецептори. Скупчення нейтрофілів і формування нейтрофільних позаклітинних пасток індують масивну ко-агуляцію, сприяючи утворенню тромбів [13].

Дані літератури свідчать про виснаження

МПО нейтрофілів у хворих на гострий ін-фаркт міокарда в перші 4 год після больового нападу, що не спостерігається у пацієнтів з іншою патологією (стабільна стенокардія, артрити, гострий перелом кістки) [14 – 15]. Нами раніше також було показано зниження функціональної активності нейтрофілів при різних клінічних формах ішемічної хвороби серця [16 – 19].

При цьому реєструється високий вміст МПО в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда, що вважають поганою прогностичною ознакою при цьому звхо-руванні [10, 20, 21]. У разі спостереження за хворими впродовж подальших років вста-новили, що вищий ризик смерті і ускладнень спостерігався у пацієнтів з високим вмістом МПО.

Метою нашої роботи було визначити за-лежність вмісту МПО в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда від стану кисне-залежного метаболізму нейтрофілів.

МЕТОДИКА

Обстежено 19 практично здорових добро-вольців і 56 пацієнтів з гострим коронар-ним синдромом з елевацією сегменту ST на електрокардіограмі під час надходження в стаціонар до початку планової медикамен-тозної терапії. У всіх хворих при подальшому спостереженні був діагностований гострий інфаркт міокарда із зубцем Q. Середній вік цих пацієнтів становив $55,5 \pm 1,5$ років.

Киснезалежний метаболізм нейтрофілів оцінювали в супернатантах чистої популяції клітин у стандартній концентрації 1×10^6 /л за активністю МПО, супероксид-аніона і каталази в нейтрофілах і вмісту в них пе-рекису водню. Активність МПО визначали бензидиновим методом, вміст перекису водню - за її здатністю утворювати стійкий забарвлений комплекс з солями молібдену, активність супероксид-аніона – за відновлен-ням нітросинього тетразолію, каталази – за ступенем руйнування перекису водню [22].

Концентрацію МПО в плазмі крові визначали імуноферментним методом з використанням тест-системи «eBioscience» (Австрія).

При статистичній обробці результатів використовували програму «Microsoft Excel». Вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм *t* Стюдента. Кореляційний аналіз проводили непараметричним методом з обчисленням коефіцієнта кореляції Спірмена (R).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У хворих на гострий інфаркт міокарда в цілому по групі відмічалася низька активність МПО і супероксид-аніона нейтрофілів при нормальних значеннях вмісту перекису водню і активності каталази (табл. 1). При цьому спостерігається висока пряма кореляційна залежність вмісту перекису водню з активністю МПО ($r=+0,4$) і супероксид-аніона ($r=+0,5$) у нейтрофілах, але зворотна кореляція з активністю каталази ($r=-0,5$), що відображає адекватність співвідношення кисневих радикалів між собою.

Виснаження МПО нейтрофілів у хворих на гострий інфаркт міокарда спостерігали і інші автори. Низька активність МПО в цих клітинах асоціюється з активацією тромбоцитів і утворенням тромбоцитарно-нейтрофиль-

них агрегатів [15, 23]. У більшості пацієнтів вміст МПО в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда був високим і становив $606,0 \pm 59,3$ нг/мл ($31,9$ - $1870,0$ нг/мл). Нині цей показник визначається як новий біомаркер для ідентифікації гострого коронарного синдрому [3, 20]. Показано, що МПО понад 350 мкг/л є вірогідним предиктором загальної смерті і нефатального інфаркту міокарда [24].

Оскільки основним джерелом МПО є нейтрофіли, ми порівняли концентрацію ферменту в плазмі крові і функціональний стан нейтрофілів хворих на гострий інфаркт міокарда. Активність МПО нейтрофілів була низькою у $71,4\%$ хворих, у решти пацієнтів ($28,6\%$) - нормальною або підвищеною. Водночас вміст МПО в плазмі у $82,2\%$ пацієнтів був високим, у останніх ($17,8\%$) – у межах норми. Докладніший аналіз отриманих результатів показав, що нормальний вміст МПО в плазмі спостерігався виключно у осіб з низькою активністю МПО в клітинах. Тоді як у пацієнтів з високим вмістом МПО в плазмі крові активність МПО нейтрофілів була різною (див. табл.1).

У зв'язку з цим ми розділили хворих на 3 групи. Пацієнти ($17,8\%$) з низьким рівнем МПО як в клітинах, так і в плазмі склали 1-шу групу. Найбільшою була 2-га група ($53,6\%$) – з низькою активністю МПО в нейтрофілах,

Табл. 1. Показники киснезалежного метаболізму нейтрофілів і вміст мієлопероксидази в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда

Показники	Донори	Стабільна стенокардія	Гострий інфаркт міокарда			
			Загальна група	1-ша група	2-га група	3-тя група
Активність мієлопероксидази в нейтрофілах, мккат/л	$70,1 \pm 5,9$	$55,0 \pm 3,2^*$	$47,5 \pm 4,3^*$	$20,0 \pm 3,2^{*,**}$	$27,3 \pm 2,8^{*,**}$	$99,1 \pm 8,2^{*,**}$
Активність супероксид-аніона, ммоль/л	$6,2 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,3^*$	$4,3 \pm 0,25^*$	$3,3 \pm 0,7^{*,**}$	$3,9 \pm 0,5^*$	$6,4 \pm 0,7^{**}$
Вміст перекису водню, мкг/л	$37,6 \pm 5,4$	$49,6 \pm 5,1$	$45,7 \pm 3,3$	$25,8 \pm 4,8^{*,**}$	$41,2 \pm 4,7$	$56,2 \pm 4,6^*$
Активність каталази, %	$56,7 \pm 2,6$	$56,9 \pm 2,6$	$52,6 \pm 1,8$	$67,1 \pm 4,4^{*,**}$	$58,3 \pm 2,3$	$49,1 \pm 4,1$
Вміст мієлопероксидази в плазмі крові, нг/мл	$74,5 \pm 16,3$	$263,0 \pm 38,1^*$	$606,0 \pm 59,3^{*,**}$	$85,4 \pm 5,6^{**}$	$755,9 \pm 86,7^{*,**}$	$543,7 \pm 95,7^{*,**}$

* $P < 0,05$ щодо контрольної групи, ** $P < 0,05$ щодо значень у хворих на стабільну стенокардію

але високим її вмістом в плазмі крові. Пацієнти (28,6%) з нормальною або високою активністю МПО нейтрофілів і високим вмістом МПО в плазмі ввійшли до 3-ї групи. Клінічні особливості пацієнтів у вказаних групах представлені в табл. 2.

У 1-й групі крім низької активності МПО в нейтрофілах спостерігалася і низька активність супероксид-аніона, і низький вміст перекису водню. Враховуючи клінічні особливості цієї групи обстежених така картина може свідчити про функціональну недостатність клітин, пов'язану з віком пацієнтів, наявністю хронічних захворювань в анамнезі і, в результаті, нездатності нейтрофілів реагувати на патологічний процес.

У пацієнтів 2-ї групи низька активність МПО нейтрофілів асоціюється з низьким рівнем активності супероксид-аніона, але нормальним вмістом перекису водню і активністю каталази. Водночас вміст МПО в плазмі крові був дуже високим, у 76,7% пацієнтів перевищував 300 нг/мл, а у половини з них (11 чоловік) – 1000 нг/мл. Тобто у цих пацієнтів спостерігається виснаження клітин у результаті викиду МПО в плазму. Значне збільшення цього фактора в плазмі крові можливо не тільки за рахунок МПО, котра вивільняється через екзоцитоз з нейтрофілів,

але і внаслідок утворення нейтрофільних позаклітинних пасток, що пов'язане з руйнуванням нейтрофілів. Слід зазначити, що у 63,6% пацієнтів цієї групи час надходження в стаціонар перевищував 3 год.

Пацієнти переважно молодого віку (50% пацієнтів у віці до 45 років) з наявністю супутніх захворювань запальної ланки (псоріаз, сечокам'яна хвороба, хронічний гепатит, більшою мірою – хронічні обструктивні захворювання легенів) склали 3-тю групу. Для них характерна також велика маса, у 5 чоловік вона перевищувала 100 кг. Особливістю цієї групи було висока активність в нейтрофілах не тільки МПО, але і решти чинників кисневого вибуху – супероксид-аніона і перекису водню. Активність антиоксидантного ферменту каталази була вірогідно нижче порівняно з 1-ю і 2-ю групами. Більше того, відзначається висока кореляційна залежність вмісту МПО в плазмі крові з її активністю в нейтрофілах ($r=+0,6$) і вмістом перекису водню ($r=+0,7$). Вміст МПО в плазмі крові був високим порівняно з контрольною групою, але вірогідно нижчим щодо значень у 2-й групі, і лише у 43,8% пацієнтів перевищував 300 нг/мл. Тобто в цій групі осіб не спостерігається виснаження клітин, але МПО в плазму викидається. Можливо, високий

Табл. 2. Клінічна характеристика хворих залежно від співвідношення активності мієлопероксидази нейтрофілів і її вмісту в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда

Показники	1-ша група (n=10)	2-га група (n=30)	3-тя група (n=16)
Стать			
жінки, %	40	7,7*	14,3
Чоловіки, %	60	92,3	85,7
Вік, роки	64,7±3,1	54,3±2,1*	50,8±3,6*
Маса, кг	79,2±9,0	85,5±5,8	87,4±5,0
Куріння, %	46,4	40,9	61,5
Гіпертонічна хвороба, %	100	70,8*	64,3*
Цукровий діабет, %	60	20,8*	21,4
Стенокардія в анамнезі, %	30	29,2	7,1
Гострий інфаркт міокарда в анамнезі, %	20	4,5	0*
Час надходження в стаціонар, год	3,9±1,0	4,5±0,5	3,5±0,4
Супутні захворювання за участю запальної ланки, %	10	37,5	57,1*

*P<0,05 порівняно з 1-ю групою

вміст МПО в клітинах підтримує супутній запальний процес.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що вміст МПО в плазмі крові хворих на гострий інфаркт міокарда залежить від функціонального стану нейтрофілів. Низький вміст асоціюється виключно з низькою активністю МПО нейтрофілів, а також інших кисневих радикалів. Цей факт може говорити про функціональну недостатність клітин і їх нездатності секретувати МПО в достатній кількості у відповідь на патологічний процес. Це пов'язано, ймовірно, з віком пацієнтів і супутніми хронічними захворюваннями. Високий вміст МПО в плазмі, супроводжуваний низькою активністю МПО нейтрофілів, свідчить про виснаження клітин і спостерігається у більшості пацієнтів, що є патогномонічним для хворих на гострий інфаркт міокарда. У хворих з високим вмістом МПО в плазмі і нормальною/ високою її активністю в нейтрофілах спостерігається висока активність і інших кисневих радикалів. Це пацієнти переважно молодого віку з наявністю супутніх захворювань за участю запальної ланки. Особливості окисного процесу при гострому інфаркті міокарда можуть лягти в основу патогенетичного лікування і профілактики захворювання.

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

ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Целью данной работы было определить зависимость содержания миелопероксидазы (МПО) в плазме крови больных острым инфарктом миокарда от состояния кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, которое оценивали по активности МПО, супероксид-аниона и каталазы в клетках, а также по содержанию в них перекиси водорода. Обследовано 19 практически здоровых добровольцев и 56 пациентов с острым инфарктом миокарда. Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание МПО в плазме крови больных острым инфарктом миокарда зави-

сит от функционального состояния нейтрофилов, которое, в свою очередь, связано с клиническими особенностями пациентов. Низкое содержание ассоциируется исключительно с низкой активностью МПО нейтрофилов, а также других кислородных радикалов. Высокое содержание МПО в плазме, сопровождаемое низкой или высокой активностью МПО нейтрофилов и является патогномоничным для больных с острым инфарктом миокарда.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда; миелопероксидаза; нейтрофилы.

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

DEPENDENCE OF LEVEL OF MYELOPEROXIDASE OF PLASMA OF BLOOD ON FUNCTIONAL STATE OF NEUTROPHILS AT ACUTE INFARCT OF MYOCARDIUM

The purpose of this work was to define dependence of maintenance of myeloperoxidase (MPO) in plasma of blood of patients by the acute infarct of myocardium from the state of oxygen metabolism of neutrophils, which was estimated on activity of myeloperoxidases, superoxid-anion and catalase in cells and on maintenance by peroxigens. 19 is inspected practically healthy volunteers and 56 patients with the the acute infarct of myocardium. The got results testify that maintenance of MPO in plasma of blood of patients with acute infarct of myocardium depends on the functional state of neutrophils, which, in its turn, is related to the clinical features of patients. Low maintenance is associated exceptionally with low activity of MPO of neutrophils, and also other oxygen radicals. High maintenance of MPO in plasma accompanied low or high activity of MPO of neutrophils and is pathognomonic for patients with the acute infarct of myocardium.

Key words: acute infarct of myocardium; myeloperoxidase; neutrophils.

National Scientific Center «M.D. Strazhesko Institute of Cardiology, MAS of Ukraine».

REFERENCES

1. Anogeianaki A, Angelucci D, Cianchetti E, D'Alessandro M, Maccauro G, Saggini A, Salini V, Caraffa A, Tete S, Conti F, Tripodi D, Shaik-Dasthagirisaheb YB. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011; 24(4): 817-25.
2. Gavrilenko T, Ryzhkova N, Parkhomenko O. Myeloperoxidase and its role in development of ischemic heart diseases. *Ukr Card J*. 2014; 4: 119-26. [Russian].
3. Nicholls S, Hazen S. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. *Jpn J Infect Dis*. 2004; 57: 21-22.
4. Macickova T, Pecivova J, Harmatha J, Svitekova K, Nosal R. Effect of stilbene derivative on superoxide generation

- and enzyme release from human neutrophils in vitro. *Interdiscip Toxicol.* 2012; 5(2): 71-75.
5. Hansson M, Olsson I, Nauseef W. Biosynthesis, processing and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006; 445: 214-24
 6. Klebanoff S. Myeloperoxidase: Friend and foe. *J Leuc Biol.* 2005; 77: 598-62.
 7. Doncov V, Krut'ko V, Mrikaev B, Ukhanov S. the of Active of forms of oxygen as system: value in physiology, pathology and natural senescence. *Lab ISA RAS.* 2006; 19: 50-69. [Russian].
 8. Panasenko O, Gorudko I, Sokolov A. Hypochloric of acid as predecessor of free radicals in the living systems. *Successes Biol Chem.* 2013; 53: 195-244. [Russian].
 9. Chen W, Liu N, Qi Y, Zhang Y, Deng Z, Yang J, Xie X. Changes of systemic and local myeloperoxidase and tumor necrosis factor- α in rats with myocardial injury induced by hindlimb ischemia-reperfusion. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013; 33 (5): 761-64.
 10. Alipour A, Ribalta J, Njo T, Janssen HW, Birnie E, van Miltenburg AJ, Elte JW, Castro Cabezas M. Trans-vessel gradient of myeloperoxidase in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2013; 43(9): 920-25.
 11. Kubala L, Kolarova H, Vitecek J, Kremserova S, Klinke A, Lau D, Chapman AL, Baldus S, Eiserich JP. The potentiation of myeloperoxidase activity by the glycosaminoglycan-dependent binding of myeloperoxidase to proteins of the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(10): 4524-36.
 12. Rees M., Dang L, Thai T, Dylan M, Owen D, Malle E, Shane R. Targeted subendothelial matrix oxidation by myeloperoxidase triggers myosin II-dependent de-adhesion and alters signaling in endothelial cells. *Free Rad Biol Med.* 2012; 53(12): 2344-56.
 13. Brinkman V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198(5): 773-83.
 14. Alyasin S, Amin R. Intracellular myeloperoxidase in myocardial infarction. *Shiraz E-Med J.* 2005; 6.
 15. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Godino C, Demetrio M, Baldini M, Figini F, Coppi G, Slavich M, Camera M, Bartorelli A, Marenzi G, Campana L, Baldissera E, Sabbadini MG, Cianflone D, Tremoli E, D'Angelo A, Manfredi AA, Maseri A. An intense and short-lasting burst of neutrophil activation differentiates early acute myocardial infarction from systemic inflammatory syndromes. *PLOS One.* 2012; 7(6): e39484.
 16. Gavrilenko T, Ryzhkova N, Lomakovskiy O, Kornilina E, Parkhomchuk I. The of free-radical processes in neutrophils at the stable stenocardia. *Ukr Card J.* 2004; 18-20. [Russian].
 17. Ryzhkova N, Gavrilenko T, Parkhomenko O, Lomakovskiy O, Dovgan N. Comparative of description of the functional state of neutrophils at patients with the different forms of ischemic heart disease. Part I. Relative of sizes. *Ukr Card J.* 2006; 5: 30-34. [Russian]
 18. Ryzhkova A. Features of of the functional state of immunocompetency cells at the acute coronal syndrome. *Immun Allerg.* 2006; 4: 21-25. [Russian].
 19. Ryzhkova N, Gavrilenko T, Parkhomenko O, Kozhukhov S. Metabolic activity of neutrophils and the ways of it are possible correction at patients of acute coronal syndrome. *Fiziol Zh.* 2011; 57(2): 35-42. [Ukrainian].
 20. Graner M, Tikkanen E, Rimpila O, Tikkanen H, Ripatti S, Lokki ML, Nieminen MS, Taskinen MR, Sinisalo J. Diagnostic efficacy of myeloperoxidase to identify acute coronary syndrome in subjects with chest pain. *Ann Med.* 2013; 45(4): 322-7.
 21. Kaya M, Yalcin R, Okyay K, Poyraz F, Bayraktar N, Pasaoğlu H, Boyac B, Cengel A. Potential role of plasma myeloperoxidase level in Predicting Long-Term Outcome of Acute Myocardial Infarction. *Tex Heart Inst J.* 2012; 39(4): 500-6.
 22. Gavrilenko T, Ryzhkova N, Parkhomenko O, Yakushko L, Pidgayna O, Lutay Ya. Estimation of metabolic activity of neutrophils at of patients of acute infarct of myocardium. Kyiv, 2014. [Ukrainian].
 23. Yonezawa K, Morimoto N, Matsui K, Tenjin T, Yoneda M, Emoto T, Sawada T, Nomura T, Okamoto H, Takarada A, Ikeda H, Ito M. Significance of the neutrophil myeloperoxidase index in patients with atherosclerotic diseases. *Kobe J Med Sci.* 2013; 58(5): 128-37.
 24. Oemrawsingh R, Lenderink T, Akkerhuis KM, Heeschen C, Baldus S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Simoons-Sel A, Boersma E. Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart* 2011; 97(13): 1061-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.01.2016*

Варіабельність серцевого ритму у здорових осіб за умов діафрагмального дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку

В.П. Фекета, Л.А. Глеба, О.С. Паламарчук, Ю.М. Савка, К.Б. Ківежді

ДВНЗ «Ужгородський національний університет»; e-mail: vfeketa@gmail.com

Метою нашого дослідження було з'ясувати чи здатні портативні комп'ютерні прилади біологічного зворотного зв'язку в рекомендованих режимах використання суттєво вплинути на варіабельність серцевого ритму (ВСР) і наскільки тривалий цей ефект. У дослідженні брали участь 30 осіб чоловічої статі віком від 18 до 20 років, які випадковим чином були розподілені на три рівні групи по 10 осіб у кожній. Особи першої групи займалися дихальними вправами з використанням портативного пристрою біологічного зворотного зв'язку StressEraser, другої – пристрою EmWave2, а третьої – апаратно-програмного комплексу MyCalmBeat. Кожний сеанс тривав від 10 до 15 хв. Всього було проведено 10 сеансів щоденно в ранковій годині. ВСР реєстрували за допомогою дистанційного монітора серцевого ритму Polar RS800CX та програмного забезпечення Polar ProTrainer5. Для розрахунків показників використовували 5-хвилинні стаціонарні ділянки кривої грудного відведення електрокардіограми. Встановлено, що глибоке дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку протягом 15 хв суттєво впливає на показники ВСР. Зокрема, зростала загальна ВСР як за результатами статистичного, так і спектрального аналізу ритмокардіограми. У всіх трьох групах найбільших зсувів зазнав низькочастотний діапазон спектральної кривої Low Frequency (LF), який згідно з загальноприйнятою трактовкою відображає активність симпатичної ланки автономної нервової системи (АНС) та судинно-рухового центру. При аналізі відсоткової спектральної структури серцевого ритму до та після сеансу діафрагмального дихання встановлено, що у всіх трьох групах вірогідно зменшувалася питома вага хвиль наднизької частоти Very Low Frequency (VLF)% на $11,8 \pm 2,2$; $6,6 \pm 2,8$ та $6,8 \pm 2,4$ % відповідно. Це означає, що відбувся перерозподіл активності між різними регуляторними компонентами серцевого ритму на користь периферичної ланки АНС. Такі зміни ВСР зберігалися як мінімум протягом одного місяця після завершення експерименту. Найбільший вплив на показники ВСР спостерігався в групі осіб, яка використовувала прилад StressEraser. Ключові слова: автономна нервова система; варіабельність серцевого ритму; діафрагмальне дихання; дихальна гімнастика; пристрої біологічного зворотного зв'язку.

ВСТУП

Варіабельність серцевого ритму (ВСР) є фундаментальним фізіологічним феноменом організму людини, який відображає адаптацію серця до метаболічних потреб при різноманітних функціональних станах. Різниця в тривалості серцевого циклу «від удару до удару» залежить від взаємодії багатьох регуляторних факторів, які накладаються на базовий серцевий ритм, що генерується в здоровій людини синоатріальним вузлом

© В.П. Фекета, Л. А. Глеба, О.С. Паламарчук, Ю.М. Савка, К.Б. Ківежді

– пейсмекером 1-го порядку. Головними із цих факторів є співвідношення тону симпатичної та парасимпатичної ланок автономної нервової системи (АНС), барорецепторні судинні рефлексі, терморегуляторні реакції, гормональний фон [1,2]

За даними багатьох авторів ВСР має велике діагностичне значення для прогнозу тривалості життя пацієнтів після перенесеного інфаркту міокарда [3], для оцінки ступеня важкості депресивних станів [4], діагностики та лікування посттравматичних

стресових розладів [5] тощо. Із впровадженням комп'ютерних технологій у методику реєстрації ВСР з'явилася можливість вивчати її прогностичну цінність для оцінки механізмів адаптації людини до різноманітних фізіологічних чинників. Зокрема, отримано дані щодо специфіки ВСР у спортсменів різної спеціалізації і кваліфікації [6]. Інтенсивно вивчається взаємозв'язок ВСР із психофізіологічним та емоційним станом людини при розумових навантаженнях [7]. З цих досліджень можна зробити спільний висновок про те, що у разі зниження ВСР йдеться про пригнічення адаптаційних резервів організму, а її помірне підвищення завжди асоціюється із покращенням його функціонального стану чи прогнозу при патології.

Одним із відносно нових підходів до збільшення ВСР є діафрагмальне дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку. Цей метод показав свою ефективність у лікуванні психічних розладів (депресивні та тривожні стани), бронхіальної астми, ішемічної хвороби серця, хронічного больового синдрому, фіброміалгії. Особливо інтенсивно метод почав розвиватися після впровадження в практику портативних комп'ютерних приладів, здатних у режимі реального часу моніторувати спектральні характеристики серцевого ритму. Використання спектрального аналізу серцевого ритму дає змогу пацієнту фокусувати увагу на специфічних ділянках спектра, які відображають активність певних ланок АНС. Так, за даними Vaschillo, Lehrer [8], у більшості осіб позитивний вплив діафрагмального дихання досягається при частоті дихання 5-7 дихальних рухів за хвилину, що корелює із частотним діапазоном LF (0,1 Гц) спектральної кривої серцевого ритму. Збільшення спектральної енергії цієї компоненти ВСР збільшує сумарну варіабельність серцевого ритму і гармонізує дихання та кровообіг, що, в свою чергу, позитивно впливає на адаптаційний потенціал організму.

Портативні прилади для дихальної гімнастики в режимі біологічного зворотного

зв'язку з ВСР нині широко рекламуються і відносно доступні за ціною. Однак вони позиціонуються розробниками, перш за все, як засоби психологічної релаксації. Мета нашої роботи – з'ясувати чи здатні такі прилади в рекомендованих режимах використання суттєво вплинути на ВСР і наскільки тривалий цей ефект. Для дослідження були використані три прилади виробництва США: Stresseraser ("Helicor"), EmWave2 ("Heartmath"), MyCalmBeat. Останній з них – це пакет програмного забезпечення, який може працювати на персональному комп'ютері чи смартфоні, а його апаратна частина представлена тільки кліпсою з фотоелектричним перетворювачем, який реагує на ступінь кровонаповнення вушної раковини.

МЕТОДИКА

У дослідженні взяли участь 30 осіб чоловічої статі віком від 18 до 20 років, які випадковим чином були розподілені на 3 рівні групи по 10 осіб у кожній. Усі учасники експерименту не пред'являли скарг на стан здоров'я, не мали відхилень від норми за даними фізикального обстеження і професійно не займалися спортом. Особи першої групи займалися дихальними вправами з використанням портативного пристрою біологічного зворотного зв'язку StressEraser, другої – пристрою EmWave2, а третьої – апаратно-програмного комплексу MyCalmBeat. Кожний сеанс тривав від 10 до 15 хв. Всього було проведено 10 сеансів щоденно в ранкові години.

Під час тренування кожний учасник першої групи змінював частоту дихання відповідно із візуальними сигналами приладу. Хвильову структуру серцевого ритму розраховували приладом за фотоплетизмографічним датчиком, який детектував пульсове кровонаповнення вказівного пальця. Поява маркера у вигляді трикутника у верхній частині екрана давала сигнал до початку видиху. У разі узгодження хвильової структури серцевого ритму із темпом дихання

прилад індикував нараховані учаснику бали за кожний вдалий дихальний акт квадратами у нижній частині екрана; 3 квадратики оцінювалися у 1 бал. Сеанс тривав до набору 30 балів.

Дихальну гімнастику в учасників другої групи з використанням приладу EmWave2 реалізували завдяки звуковій та візуальній корекції патернів дихання протягом 15 хв. Прилад генерував керуючі стимули на основі безперервної реєстрації фотоелектричним датчиком пульсу вушної раковини. Зокрема, у разі досягнення когерентності дихання з серцевою діяльністю індикатор у правому верхньому куті змінював свій колір з червоного на синій або зелений залежно від ступеня цієї когерентності. Одночасно прилад подавав звуковий сигнал, що підвищувало ефективність корекції ритму дихання пацієнтом.

Учасники третьої групи також використовували для біологічного зворотного зв'язку пульсометричний датчик, що детектував пульс у вушній раковині аналогічно до реєстрації його в осіб другої групи. Однак принцип корекції дихання з використанням програмного забезпечення MyCalmBeat був дещо інший. Протягом перших 2 хв тренування апаратно-програмний комплекс на основі вільного дихання пацієнта розраховував оптимальну індивідуальну частоту дихання, а у наступні 15 хв він подавав візуальні інструкції щодо початку вдиху та видиху на екрані смартфона відповідно до цієї частоти.

BCP реєстрували за допомогою дистанційного монітора серцевого ритму Polar RS800CX та програмного забезпечення Polar ProTrainer5. Для розрахунків показників використовували 5-хвилинні стаціонарні ділянки кривої грудного відведення електрокардіограми (ЕКГ) згідно з рекомендаціями Європейської та Північно-Американської асоціації кардіологів (1996) [9]. Були використані: середньоквадратичне відхилення тривалості кардіоінтервалів (SD, мс); квадратний корінь із середнього значення квадратів різниць послідовних пар кардіоінтервалів (RMSSD,

мс); число пар послідовних інтервалів R-R, що відрізняються за тривалістю більш ніж на 50 мс (pNN50). Окрім цього, визначали такі спектральні параметри BCP, як TP (мс²) – загальна енергія спектра частот серцевого ритму; HF (мс²) – високочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,15-0,4 Гц; LF (мс²) – низькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,04-0,15 Гц та VLF(мс²) – наднизькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,003-0,04 Гц, що відображає сумарну активність надсегментарних відділів АНС і нейрогуморальні впливи на ритм серця. Додатково розраховували показник симпатовагального балансу (LF/HF) та відсотковий вклад кожного із частотних компонентів спектра у TP.

Отримані числові результати були оброблені методами варіаційної статистики з використанням критерію t Ст'юдента при рівні значимості $P < 0,05$. Динаміку показників BCP під впливом діафрагмального дихання оцінювали методом парних порівнянь, а міжгрупові відмінності – однофакторного дисперсійного аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка показників BCP під впливом однократного сеансу діафрагмального дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку.

Для з'ясування впливу діафрагмального дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку на показники BCP реєстрували грудне відведення ЕКГ в усіх обстежених за допомогою дистанційного монітора серцевого ритму Polar RS800CX у положенні сидячи після 10-хвилинної адаптації до умов реєстрації. Останні 5 хв адаптаційного періоду використовували для отримання фонових показників BCP, у наступні 15 хв тривав сеанс діафрагмального дихання, після його завершення продовжували реєстрацію ЕКГ ще протягом 5 хв. Про ефективність впливу сеансу дихання на BCP судили, порівнюючи перший та дру-

гий 5-хвилинний проміжок. Результати цього порівняння представлені у табл. 1.

У всіх групах обстежених спостерігалася схожа динаміка показників ВСР, але її вираженість була різною. Спільним інтегральним ефектом діафрагмального дихання із застосуванням усіх трьох приладів біологічного зворотного зв'язку було суттєве зростання ВСР як за значеннями статистичних, так і спектральних показників. Так, SD у першій, другій і третій групах зросла на $10,2 \pm 1,2$; ($P < 0,01$);

$8,1 \pm 2,3$; ($P < 0,02$) та $6,5 \pm 2,4$; ($P < 0,05$) мс відповідно. Аналогічне зростання pNN50 у цих групах становило $4,2 \pm 0,4$; ($P < 0,001$); $3,8 \pm 0,6$ ($P < 0,01$) та $3,3 \pm 0,7$; ($P < 0,01$). RMSSD, що характеризує парасимпатичну ланку АНС, статистично вірогідно збільшувався тільки в першій та другій групах на $12,2 \pm 1,4$; ($P < 0,01$) та $14,2 \pm 1,8$; ($P < 0,05$) мс відповідно.

Зростання загальної ВСР підтверджують і спектральні показники, зокрема TP, який підвищився у всіх трьох групах на

Таблиця 1. Динаміка показників варіабельності серцевого ритму під впливом однократного сеансу діафрагмального дихання (n=10)

Показник	SressEraser		EmWave2		MyCalmBeat	
	Фон	Після сеансу	Фон	Після сеансу	Фон	Після сеансу
Середньоквадратичне відхилення тривалості кардіоінтервалів (SD), мс;	52,5±6,2	62,7±2,6*	48,9±5,4	57,0±6,1*	54,9±5,4	61,4±5,6*
Квадратний корінь із середнього значення квадратів різниць послідовних пар кардіоінтервалів (RMSSD), мс	34,3±4,3	46,5±3,8*	35,7±4,1	49,9±5,2*	37,1±4,2	43,2±6,6
Число пар послідовних інтервалів R-R, що відрізняються за тривалістю більш ніж на 50 мс (pNN50);	18,6±1,5	22,8±1,8*	17,8±1,6	21,6±2,2*	16,5±1,3	19,8±1,6*
Загальна енергія спектра частот серцевого ритму (TP), мс ² ;	3797±345	4799±433*	3868±301	4743±345*	3944±401	4585±434*
Високочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,15-0,4 Гц (HF), мс ² ;	762±108	894±144	763±138	777±153	725±223	764±156
Низькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,04-0,15 Гц (LF), мс ²	1781±223	2888±216*	1862±218	2754±249*	1955±225	2664±301*
Наднизькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,003-0,04 Гц (VLF), мс ²	1254±176	1017±198*	1243±145	1212±163	1264±257	1157±232
Показник симпато-вагального балансу (LF/HF)	2,3±0,21	3,2±0,23*	2,4±0,22	3,5±0,24*	2,7±,22	3,5±0,24*
Відсотковий вклад частотного компонента спектра HF у TP, %	20,1±4,4	18,6±3,7	19,7±3,7	16,4±3,3	18,4±4,7	16,7±3,9
Відсотковий вклад частотного компонента спектра LF у TP, %	46,9±5,2	60,2±4,9*	48,1±4,6	58,1±4,7*	49,6±3,6	58,1±3,9*
Відсотковий вклад частотного компонента спектра VLF у TP, %	33,0±3,5	21,2±2,9*	32,1±3,1	25,6±2,8*	32,0±3,3	25,2±2,9*

* $P < 0,05$ статистично вірогідна зміна щодо фонового показника.

1002±145 ($P<0,01$); 875±177 ($P<0,02$); та 645±189 ($P<0,05$) мс^2 відповідно. Перевагою спектрального аналізу серцевого ритму є можливість з'ясувати динаміку окремих ланок АНС під впливом діафрагмального дихання. Зокрема, у всіх трьох групах найбільших зсувів зазнав низькочастотний діапазон спектральної кривої LF, який згідно з загальноприйнятою трактовкою відображає активність симпатичної ланки АНС та судинно-рухового центру. Зростання потужності LF у першій, другій і третій групах становило 1107±123 ($P<0,01$); 892±136 ($P<0,02$); та 709±109; ($P<0,05$) мс^2 відповідно.

Однак в умовах глибокого діафрагмального дихання його частота в усіх учасників експерименту знаходилась в діапазоні 5-7 дихальних рухів за хвилину, що корелює із частотними характеристиками LF-хвиль спектра серцевого ритму (0,1 Гц). Тому в цих умовах потужність LF-діапазону характеризує не стільки активність симпатичної ланки АНС, а відображає дихальну періодику. З цих самих міркувань зростання коефіцієнта LF/HF у всіх трьох групах на $0,9\pm0,16$; $1,1\pm0,17$ та $0,8\pm0,18$ ($P<0,05$) відповідно не слід трактувати як посилення активності симпатичної ланки АНС.

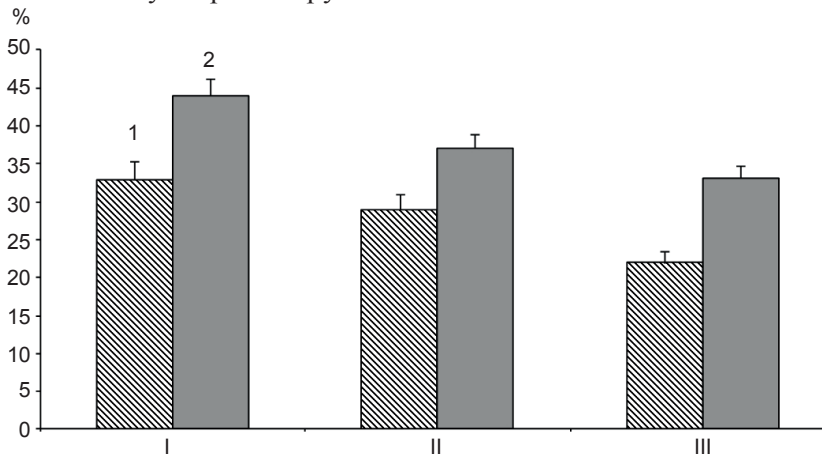
Не виявлено вірогідних змін показника HF у всіх групах. Потужність хвиль наднизькочастотного діапазону VLF вірогідно зменшувалася тільки у першій групі на

237±56 ($P<0,05$) мс^2 . При аналізі відсоткової спектральної структури серцевого ритму до та після сеансу діафрагмального дихання встановлено, що у всіх трьох групах спостерігалось вірогідне зменшення питомої ваги хвиль наднизької частоти VLF% на $11,8\pm2,2$, $6,6\pm2,8$ та $6,8\pm2,4\%$ відповідно. Це означає, що відбувся перерозподіл активності між різними регуляторними компонентами серцевого ритму на користь периферичної ланки АНС, оскільки VLF, як відомо, відображає активність центральної ланки регуляції.

Порівнюючи інтегральний вплив на ВСР діафрагмального дихання із застосуванням різних портативних приладів біологічного зворотного зв'язку за даними SD та TP, можна відмітити, що він був найбільш виражений у першій групі, яка працювала з приладом StressEraser, дещо меншим – у другій групі, де застосовувався EmWave2, і найменшим – у третій групі, учасники якої користувалися системою MyCalmbeat (рисунок).

Динаміка показників ВСР під впливом 10-добового курсу діафрагмального дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку.

У наступній серії досліджень для вивчення залежності ефекту діафрагмального дихання від кількості сеансів та його тривалості був використаний тільки прилад StressEraser, оскільки саме його застосування давало



Приріст у відсотках показників варіабельності серцевого ритму відносно фонових значень при використанні приладів: I – StressEraser, II – EmWave2, III – MyCalmBeat; 1 – середньоквадратичне відхилення тривалості кардіоінтервалів, 2 – загальна енергія спектра частот серцевого ритму

найбільш відчутні зсуви ВСР у попередній серії. Для порівняння були взяті показники ВСР, отримані протягом стандартних 5-хвилинних проміжків в учасників першої групи до початку курсу, в кінці курсу та через 1 міс після його закінчення. Результати цієї серії досліджень наведені в табл. 2.

Слід відмітити, що під впливом тренувань показники функціонального стану АНС зазнали відчутних змін, частина з яких зберігалася протягом 1 міс після закінчення тренувань. Ці результати були зареєстровані не в режимі тренувань, а в стані фізіологічного спокою в умовах вільного дихання з частотою 10-13 дихальних рухів за хвилину.

Загальна ВСР за даними SD та TP зростала в кінці курсу і залишалася вищою за фонові показники на $8,9 \pm 1,2$ мс ($P < 0,01$) і 856 ± 94 мс² ($P < 0,05$) та $4,4 \pm 0,9$ мс ($P < 0,01$) і 554 ± 86 мс² ($P < 0,05$) відповідно. Ці зміни відбулися внаслідок збільшення активності як симпатичної (LF), так і парасимпатичної (HF)

ланки із незначним пригніченням центральної ланки (VLF) регуляції серцевого ритму. Відповідна динаміка цих показників в кінці курсу становила 507 ± 74 ($P < 0,01$); 514 ± 77 ($P < 0,01$) та 165 ± 45 мс² ($P < 0,05$). Через 1 міс після закінчення курсу зростали тільки HF та LF на 260 ± 38 ($P < 0,01$) та 336 ± 54 мс² ($P < 0,05$) відповідно. Показник симпато-вагального балансу (LF/HF) не продемонстрував вірогідної динаміки протягом спостережень. Про активацію парасимпатичної ланки свідчать також достовірне зростання показників RMSSD та pNN50 на $5,6 \pm 1,6$ мс і $3,9 \pm 0,8$ % в кінці курсу та $3,9 \pm 1,4$ мс і $2,8 \pm 0,7$ % через 1 міс після його закінчення відповідно.

Суттєві зміни відбулися у структурі спектра серцевого ритму за даними відсоткового внеску хвиль різної частоти у TP. У кінці курсу HF% вірогідно зростав на $7,2 \pm 2,7\%$; а VLF% - зменшувався на $9,6 \pm 3,8\%$. Через 1 міс після завершення курсу зміни стосувалися тільки показника VLF%, який зменшився на

Таблиця 2. Динаміка показників варіабельності серцевого ритму під впливом 10-добового курсу діафрагмального дихання з використанням приладу StressEraser (n=10)

Показник	До початку курсу	В кінці курсу	Через 1 міс після закінчення курсу
Середньоквадратичне відхилення тривалості кардіоінтервалів (SD), мс;	$52,5 \pm 6,2$	$61,4 \pm 5,7^{**}$	$56,9 \pm 4,8^*$
Квадратний корінь із середнього значення квадратів різниць послідовних пар кардіоінтервалів (RMSSD), мс	$34,3 \pm 4,3$	$39,9 \pm 4,7^{**}$	$39,2 \pm 4,6^*$
Число пар послідовних інтервалів R-R, що відрізняються за тривалістю більш ніж на 50 мс (pNN50);	$18,6 \pm 1,5$	$22,5 \pm 1,8^*$	$21,4 \pm 1,7^*$
Загальна енергія спектра частот серцевого ритму (TP), мс ² ;	3797 ± 345	$4653 \pm 388^{**}$	$4351 \pm 362^*$
Високочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,15-0,4 Гц (HF), мс ² ;	762 ± 108	$1269 \pm 167^*$	$1022 \pm 159^*$
Низькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,04-0,15 Гц (LF), мс ²	1781 ± 223	$2295 \pm 315^*$	$2117 \pm 298^*$
Наднизькочастотний компонент спектра серцевого ритму в діапазоні 0,003-0,04 Гц (VLF), мс ²	1254 ± 176	$1089 \pm 176^*$	1212 ± 176
Показник симпато-вагального балансу (LF/HF)	$2,3 \pm 0,21$	$1,8 \pm 0,26$	$2,1 \pm 0,31$
Відсотковий вклад частотного компонента спектра HF у TP, %	$20,1 \pm 4,4$	$27,3 \pm 4,6^{**}$	$23,5 \pm 4,1^*$
Відсотковий вклад частотного компонента спектра LF у TP, %	$46,9 \pm 5,2$	$49,3 \pm 5,8$	$48,7 \pm 5,9$
Відсотковий вклад частотного компонента спектра VLF у TP, %	$33,0 \pm 3,5$	$23,4 \pm 3,7^{**}$	$27,9 \pm 3,8^*$

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ щодо відповідного показника до початку курсу.

5,2±2,2%. В цілому, подібно до попередньої серії досліджень, ці зміни можна трактувати, як перерозподіл регуляторної активності АНС між центральними та периферичними ланками регуляції серцевого ритму на користь останніх.

Біологічний зворотний зв'язок – це процес передачі інформації в ЦНС про поточний стан функціонування певних органів і систем. Ця інформація може бути використана індивідом для корекції відповідного стану. ВСР, як відомо, дає інформацію стосовно функціональної активності різних ланок АНС. Тому біологічний зворотний зв'язок на основі моніторингу ВСР дає змогу при умові тренування суттєво зсувати в той чи інший бік вегетативний баланс і, таким чином, покращувати низку важливих фізіологічних і психологічних показників організму. Особливо ефективним є цей метод для лікування артеріальної гіпертензії, ментальних розладів, для зниження рівня фізичного та психологічного стресу [10–12].

Механізм позитивного впливу глибокого діафрагмального дихання на фізіологічний стан організму вбачають у перерозподілі активності периферичних ланок АНС на користь парасимпатичного відділу, що проявляється у збільшенні загальної ВСР та індексів парасимпатичної ланки. Наші результати загалом підтверджують ці уявлення, про що свідчить вірогідне зростання SD та TP у всіх групах обстежених. Водночас при вивченні ефекту ізолюваного сеансу глибокого дихання найбільшою мірою зростав показник LF, який в звичайних умовах фізіологічного спокою відображає активність симпатичної ланки. Однак в умовах відносно повільного діафрагмального дихання, частота якого 5-7 дихальних рухів за хвилину близька до низькочастотного діапазону спектра серцевого ритму LF (0,1 Гц), цей показник відображає не активність симпатичної ланки, а узгодження барорецепторного рефлексу з частотою дихання та серцевим ритмом.

Частоту дихання, при якій досягається

таке узгодження називають резонансною. Показано, що під час тривалого вдиху (протягом приблизно 5 с) завдяки активації симпатичної ланки АНС серцевий ритм пришвидшується, одночасно активація барорецепторів стимулює його для того, щоб не допустити зниження артеріального тиску. Під час видиху процеси розвиваються в протилежному напрямі. Зменшення об'єму грудної клітки створює тенденцію до підвищення артеріального тиску, зменшує імпульсацію від барорецепторів та рефлекторно активує парасимпатичну ланку, зменшуючи частоту серцевого ритму [13]. Це пояснює, чому під час дихання з резонансною частотою ВСР зростає. Точна синхронізація серцево-судинної, дихальної та автономної нервової системи створює стан фізіологічної когерентності. Цей термін запропонував Lehrer, який показав, що резонансна частота дихання є індивідуальною і залежить від статі та антропометричних показників [13].

Саме використання портативних електронних приладів біологічного зворотного зв'язку дає змогу людині візуально спостерігати рівень когерентності цих систем під час тренування і вносити потрібні корективи в патерни власного дихання. Як свідчать отримані нами результати, найбільш ефективним з цієї точки зору був прилад StressEraser, який візуально відображає когерентність систем і дає підказки у разі її зниження.

За даними Vaschillo та співавт. [14], глибоке діафрагмальне дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку із ВСР призводить до суттєвого її збільшення протягом декілька хвилин від початку сеансу і триває весь час реєстрації. При цьому дихання на резонансній частоті вилучає найбільш великі осциляції серцевого ритму і узгоджує їх з фазами дихання. У нашому дослідженні підтверджено цей ефект в усіх серіях спостережень при вивченні однократного впливу сеансу діафрагмального дихання на ВСР. Окрім того, згідно з отриманими нами результатами ефект зростання ВСР триває

щонайменше 1 міс після 10-добового курсу тренувань у режимі біологічного зворотного зв'язку. Ми пов'язуємо цей відносно довготривалий ефект тренувань у зростанні ефективності барорецепторного рефлексу. В свою чергу показано, що таке зростання покращує стан хворих з вегетативними дисфункціями, зокрема бронхіальною астмою [15], гіпертензивними станами [16], депресією [11], та ожирінням [17]. Водночас довготривалі ефекти такого тренування піддаються сумніву [17]. Очевидно існує потреба продовжити спостереження за ефективністю тренувань на триваліший період. Однак більшість авторів погоджуються, що досягнутий у результаті тренувань у режимі біологічного зворотного зв'язку більш високий рівень ВСР у стані спокою покращує шанси хворого на одужання. З іншого боку, зменшена активність барорецепторного рефлексу призводить до меншої ВСР і знижує регуляторні можливості організму при адаптації до аеробних навантажень, серцевої недостатності, тривожних розладів [18]. Деякі дослідники вважають, що ВСР в стані спокою корелює з емоційною резистентністю особи [19], загальним рівнем її фізичного та психічного стану [20,21].

На наш погляд, при аналізі ефекту глибокого дихання на функціональний стан АНС варто звернути увагу не тільки на загальне зростання ВСР, але і на її структуру. Зокрема це стосується показника VLF, який в цьому контексті в доступній нам літературі не розглядався. Хоча загалом фізіологічна трактовка цього показника ще остаточно не з'ясована, більшість авторів схиляються до думки, що він відображає активність надсегментарних центрів регуляції АНС (гіпоталамуса, лімбічної системи), нейрогуморальних впливів на серце та терморегуляції [22]. Однак існує спільна думка про те, що збільшення цього показника та його питомої ваги в спектрі серцевого ритму (VLF%) означає «централізацію» керування ним і є ознакою зменшення адаптаційних можливостей організму. Отримані нами результати дають змогу

стверджувати, що як однократний вплив діафрагмального дихання, так і 10-добовий курс тренувань зменшує VLF та VLF% у більшості осіб на фоні зростання загальної ВСР. По суті йдеться про перерозподіл активності АНС на користь її периферичних відділів. Це в свою чергу, може трактуватися як зростання регуляторного резерву організму [23].

ВИСНОВКИ

1. Глибоке дихання в режимі біологічного зворотного зв'язку протягом 15 хв суттєво впливає на показники ВСР здорових осіб молодого віку.

2. Основні зміни ВСР полягають у її зростанні за результатами як статистичного, так і спектрального аналізу внаслідок збільшення потужності хвиль низькочастотного діапазону з одночасним зменшенням потужності хвиль наднизькочастотного діапазону.

3. Такі зміни ВСР зберігаються як мінімум протягом місяця після завершення експерименту. Найбільший вплив спостерігався в групі осіб, яка використовувала прилад StressEraser.

В.П. Фекета, Л. А. Глеба, О.С. Паламарчук, Ю.М. Савка, К.Б. Кивежди

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В УСЛОВИЯХ ДИАФРАГМАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ В РЕЖИМЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Целью данного исследования было выяснить способны ли портативные компьютерные устройства биологической обратной связи в рекомендованных режимах использования существенно повлиять на вариабельность сердечного ритма и насколько продолжителен этот эффект. В исследовании принимали участие 30 человек мужского пола в возрасте от 18 до 20 лет, которые случайным образом были разделены на три равные группы по 10 человек. Участники первой группы занимались дыхательными упражнениями с использованием прибора StressEraser, второй – EmWave2, а третьей – аппаратно-программного комплекса MyCalmBeat. Каждый сеанс длился от 10 до 15 мин. Всего было проведено 10 сеансов ежедневно в утренние часы. ВСР регистрировали с помощью дистанционного монитора сердечного ритма Polar RS800CX и

программного обеспечения Polar ProTrainer5. Для расчетов показателей BCP использовали 5-минутные стационарные участки кривой грудного отведения электрокардиограммы. Установлено, что глубокое дыхание в режиме биологической обратной связи в течение 15 мин существенно влияет на показатели variability сердечного ритма здоровых лиц молодого возраста. В частности, растет общая variability сердечного ритма как по результатам статистического, так и спектрального анализа ритмокардиограммы. Во всех трех группах наиболее изменился низкочастотный диапазон спектральной кривой Low Frequency (LF), который согласно общепринятой трактовки отражает активность симпатического звена автономной нервной системы (АНС) и сосудисто-двигательного центра. При анализе процентной спектральной структуры сердечного ритма до и после сеанса диафрагмального дыхания установлено, что во всех трех группах имело место достоверное уменьшение удельного веса волн сверхнизкой частоты Very Low Frequency (VLF)% на $11,8 \pm 2,2$; $6,6 \pm 2,8$ и $6,8 \pm 2,4$ % соответственно. Это означает, что произошло перераспределение активности между различными регуляторными компонентами сердечного ритма в пользу периферического звена АНС. Такие изменения variability сердечного ритма сохранялись как минимум в течение одного месяца после завершения эксперимента. Наибольшее влияние наблюдалось в группе лиц, которая использовала прибор StressEraser.

Ключевые слова: автономная нервная система; variability сердечного ритма; диафрагмальное дыхание; дыхательная гимнастика; устройства биологической обратной связи.

**V.P. Feketa, L.A. Gleba, O.S. Palamarchuk,
Ju. M. Savka, K.B. Kivezhdi**

CORRECTION OF HEART RATE VARIABILITY USING DIAPHRAGMATIC BREATHING MODE BIOFEEDBACK IN HEALTHY PEOPLE

The research is an attempt to explain the use of portable computer devices aiming to correct heart rate variability (HRV) of healthy young men. According to the data, used deep diaphragmatic breathing in mode of biofeedback harmonizes breathing and blood circulation which positively affects the body's adaptive potential. However, developers present the portable instruments of biofeedback primarily as a means of psychological relaxation. The aim of this study is to determine whether such devices are able to significantly affect heart rate variability and how long this effect lasts.

There were 30 males aged 18 to 20 years that participated in this study. They were randomly divided into three equal groups with up to 10 people in each of them. Members of the first group were doing breathing exercises using a portable biofeedback StressEraser device, the second group used EmWave2, and the third one used hardware and software system

MyCalmBeat. Each session lasted from 10 to 15 minutes. There were 10 sessions held daily in the morning. HRV was recorded by remote heart rate monitor Polar RS800CX and software Polar ProTrainer5. 5-minutes' stationary segments of the curve chest electrocardiogram removal were used in order to calculate the HRV indexes. It was found that 15 minutes deep breathing in mode of biofeedback significantly affects the heart rate variability of healthy young people. In particular, it increases the overall heart rate variability according to the statistical and spectral analysis. It was established that in all 3 groups of experiment participants the spectral curve low-range "Low frequency" (LF) suffered the major shifts.

These shifts reflect the activity level of the sympathetic autonomic nervous system (ANS) as well as vascular-motor center according to the conventional interpretation. It was found that all three groups suffered a specific weight decrease of Very Low Frequency (VLF)% respectively $11,8 \pm 2,2$ %; ($p < 0,01$); $6,6 \pm 2,8$ %; ($p < 0,02$) and $6,8 \pm 2,4$ % ($p < 0,05$). This means that activity redistribution between different regulatory components of heart rate occurred in favour of the peripheral ANS parts. Heart rate variability changes of this kind remained valid for at least one month after the experiment. The greatest influence on heart rate variability was observed in the group of people who used the device StressEraser.

Key words: autonomic nervous system; heart rate variability; diaphragmatic breathing; breathing exercises; biofeedback devices.

SHEI «Uzhhorod National University»

REFERENCES

1. Appel M. L., Berger R. D., Saul J. P., Smith J. M., Cohen R. J. Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music? *J Am Coll Cardiol.* 1989; 14(5): 1139-48.
2. Bertson G. G., Bigger J. T., Jr., Eckberg D. L., Grossman P., Kaufmann P. G., Malik M., et al. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiol.* 1997; 34(6): 623-48.
3. Carney R. M., Blumenthal J. A., Freedland K. E., Stein P. K., Howells W. B., Berkman L. F., et al. Low heart rate variability and the effect of depression on post-myocardial infarction mortality. *Arch Intern Med.* 2005; 165(13): 1486-91.
4. Koschke M., Boettger M. K., Schulz S., Berger S., Terhaar J., Voss A., et al. Autonomy of autonomic dysfunction in major depression. *Psychosom Med.* 2009; 71(8): 852-60.
5. Zucker T. L., Samuelson K. W., Muench F., Greenberg M. A., Gevirtz R. N. The effects of respiratory sinus arrhythmia biofeedback on heart rate variability and posttraumatic stress disorder symptoms: A pilot study. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2009; 34: 135-43.
6. Hottenrott K., Hoos O., Esperer H. D. Heart rate variability and physical exercise. Current status. *Herz.* 2006; 31(6): 544-52.
7. Hjortskov N., Rissen D., Blangsted A. K., Fallentin N., Lundberg U., Sogaard K. The effect of mental stress on

- heart rate variability and blood pressure during computer work. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 92(1-2): 84-9.
8. Vaschillo E., Vaschillo B., Lehrer, P. Heartbeat synchronizes with respiratory rhythm only under specific circumstances. *Chest.* 2004; 126(4): 1385-406.
 9. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology *Circulation.* 1996; 93(5): 1043-65.
 10. Del Pozo, J., Gevirtz R., Scher B., Guarneri E. Biofeedback treatment increases heart rate variability in patients with known coronary artery disease. *Am Heart J.* 2004; 147: G1-G6.
 11. Karavidas M. K., Lehrer P. M., Vaschillo E., Vaschillo B., Marin H., Buyske S., Hassett A. Preliminary Results of an Open Label Study of Heart Rate Variability Biofeedback for the Treatment of Major Depression. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2007; 32(1): 19-30.
 12. Lehrer P. Biofeedback training to increase heart rate variability. In: Lehrer P. M., Woolfolk R. L., Sime W. E., editors. *Principles and practice of stress management.* 3rd ed. New York: Guilford; 2007. p. 227-48.
 13. Lehrer, P., Vaschillo, E., Lu, S., Eckberg, D., Vaschillo, B., Scardella, A., et al. Heart rate variability biofeedback: Effects of age on heart rate variability, baroreflex gain, and asthma. *Chest.* 2006; 129: 278-84.
 14. Vaschillo E., Vaschillo B., Lehrer P. Characteristics of resonance in heart rate variability stimulated by biofeedback. *Appl Psychophysiol and Biofeedback.* 2006; 31: 129-42.
 15. Lehrer P., Vaschillo E. Heart rate variability biofeedback: A new tool for improving autonomic homeostasis and treating emotional and psychosomatic diseases. *Jap J Biofeedback Res.* 2004; 30: 7-16.
 16. McCraty R., Atkinson M., Tomasino D. Impact of a workplace stress reduction program on blood pressure and emotional health in hypertensive employees. *J Altern Complement Med.* 2003; 9: 355-69.
 17. Meule A., Freund R., Skirde A. K., Vögele C., Kübler A. Heart rate variability biofeedback reduces food cravings in high food cravers. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2012; 37(4): 241-51.
 18. Wheat A.L., Larkin K.T. Biofeedback of heart rate variability and related physiology: A critical review. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2010;35:229-42.
 19. Thayer J. F., Hansen A. L., Johnsen B. H. The non-invasive assessment of autonomic influences on the heart using impedance cardiography and heart rate variability. *Handbook of Behavioral Medicine.* New York: Springer Science; 2010. p. 723-40.
 20. Britton A., Shipley M., Malik M., Hnatkova K., Hemingway H., Marmot M. Changes in heart rate and heart rate variability over time in middle-aged men and women in the general population (from the Whitehall II Cohort Study). *The Am J Cardiol.* 2007; 100: 524-27.
 21. Goldberger A. L., Peng C. K., Lipsitz L. A. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiology of aging* 2002; 23(1): 23-6.
 22. Mihajlov V.M. Variabel'nost' ritma serdca: opyt prakticheskogo primenenija metoda. Ivanovo: Ivan Gos Med Akademija; 2002. [Russian].
 23. Baevskij R. M., Berseneva A. P. Ocenka adaptacionnyh vozmozhnostej organizma i risk razvitija zabojevanij. Moskva: Medicina; 1997. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 15.12.2015

Вплив системи L-аргінін – NO на про- та антиоксидантну рівновагу в еритроцитах щурів за умов алкогольної інтоксикації

Н.В. Єфіменко, Н.О. Сибірна

Львівський національний університет ім. Івана Франка; E-mail: nataliya_yefimenko@mail.ru

За умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації виявлено зміни активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази) та NO-синтази (NOS), вмісту стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту і вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у лізаатах еритроцитів щурів. Показано, що за споживання субстрату NOS – L-аргініну тваринами з алкогольною інтоксикацією активність ензимів антиоксидантного захисту зростала в 2 рази на фоні зменшення вмісту ТБК-позитивних продуктів. Встановлено, що в гемолізатах еритроцитів щурів з алкогольною інтоксикацією значення сумарної активності NOS зменшувалося на 65% відносно контролю. Неселективний інгібітор No-нітро-L-аргінін метилового ефір (L-NAME), який є структурним аналогом L-аргініну, знижував вихідний рівень сумарної активності NOS на 23,4% у контролі та на 25% за умов патології. При споживанні щурами L-аргініну сумарна активність NOS збільшувалася в двох досліджуваних групах. Отримані результати свідчать про антиоксидантні властивості L-аргініну та незначний коригуючий вплив L-NAME.

Ключові слова: еритроцити; алкогольна інтоксикація; оксидативний стрес.

ВСТУП

Процес перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) властивий тканинам у нормі і відбувається, як правило, при побудові ліпідних мембранних структур, їх оновленні, під час біосинтезу низки гормонів. Проте вільнорадикальне окиснення може активізуватися за умов патології [1-3]. Тому для діагностики і прогнозування подальшого перебігу хвороби різного генезу одним із актуальних завдань є дослідження процесів ПОЛ та активності ферментів антиоксидантного захисту в нормі та за умов патології, а також впливу деяких чинників на інтенсивність цих процесів.

Клітинний вільнорадикальний гомеостаз забезпечується рівновагою між ферментативними та неферментативними системами генерації активних форм кисню та азоту (АФК, АФА відповідно) і системами їхнього знешкодження. Розвиток патологічних станів

© Н.В. Єфіменко, Н.О. Сибірна

супроводжується порушенням цієї рівноваги й відбувається надлишкове генерування вільних радикалів на фоні дефіциту антиоксидантів [3, 4].

NO, як відомо, є вторинним посередником у передачі клітинних сигналів, модулятором біологічних функцій білків, а також залежно від умов, може проявляти функції оксиданта й антиоксиданта. Він за активністю займає проміжне місце між досить інертним азотом і активним киснем, а оскільки містить один неспарений електрон на зовнішній обіталі, то може виступати також як радикал ($\bullet\text{NO}$). При взаємодії супероксидного радикала з оксидом азоту в клітині утворюється надзвичайно цитотоксична сполука – пероксинітрит (ONOO^-), яка безпосередньо або опосередковано може взаємодіяти з деякими молекулами у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Виникає так званий оксидативно-нітрозативний стрес, який супроводжується

нітруванням білків, розривами ДНК, тощо [5 - 7]. Однак у низці робіт показано, що NO у наномолярних кількостях і вище може фактично уповільнювати ПОЛ, діючи як внутрішньоклітинна “пастка” для кисневих радикалів [8, 9].

Останнім часом з'явилися праці, в яких наводяться окремі дані вивчення стану процесів ПОЛ, антиоксидантної системи та інтенсивності утворення в організмі NO при токсичному ураженні печінки, підшлункової залози й інших органів за алкогольної інтоксикації. Проте, незважаючи на велику увагу дослідників до вивчення стану процесів пероксидації за такої патології, дотепер немає цілкового уявлення про вплив АФК і АФА на внутрішньоклітинний метаболізм, зокрема еритроцитів, які, циркулюючи в руслі крові, є зручною мішенню для дії радикалів різноманітного походження [5 - 8].

Активация L-аргінін-NO - системи ґрунтується на здатності оксиду азоту лімітувати ключові ланки стрес-реакції та посилювати ендogenousні захисні системи організму. Тому фармакологічна імітація активації цієї ланки регулювання введенням субстрату NOS (L-аргініну) може забезпечити ефективний антистресорний захист та підвищити адаптаційні можливості організму [8, 9]. Хоч NO не належить до істинних інтермедіатів окиснення етанолу, однак використання його донаторів в медицині як гепатопротекторів, імуномодуляторів вказує на те, що NO-залежна регуляція морфофункціонального стану різних клітин організму є важливою ланкою розробки терапевтичних засобів лікування алкоголізму та наслідків хронічної алкогольної інтоксикації [10, 11].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу L-аргініну як субстрату NOS та інгібітора цього ензиму L-NAME на стан прота антиоксидантної рівноваги у еритроцитах щурів за умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на безпородних білих щурах з початковою масою 200-250 г. Експерименти проводили згідно з національними „Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах”, ухваленими Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986). Всі тварини отримували стандартний раціон віварію та вільний доступ до води.

Щурів було поділено на 6 груп: до 1-ї групи ввійшли контрольні тварини, до 2-ї та до 3-ї груп – тварини, які споживали L-аргінін та L-NAME відповідно, до 4-ї – тварини з алкогольною інтоксикацією, до 5-ї та до 6-ї – тварини з алкогольною інтоксикацією, які споживали L-аргінін та L-NAME відповідно.

Модель експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації у щурів створювали введенням за допомогою зонду протягом 14 діб 20%-го розчину етанолу з розрахунку 6 г/кг маси тіла *per os* [12]. Щурам 1-ї, 2-ї й 3-ї груп вводили еквівалентний за калорійністю етанолу розчин глюкози у дозі 10,2 г/кг для збереження енергетичної цінності раціону.

Тварини 5-ї групи з моменту індукції алкогольної інтоксикації з питною водою, споживали розчин основного субстрату NOS – L-аргініну (“Reanal”, Угорщина), у розрахунку 125 мг/кг; тварини 6-ї групи – розчин неселективного інгібітора NOS — L-NAME (“Sigma”, США) у розрахунку 7 мг/кг. Використовувані розчини тварини отримували протягом 2 тиж, щоденно (з моніторингом і корекцією об'єму).

Супероксиддисмутазну активність (СОД, КФ 1.15.1.11) визначали у лізатах еритроцитів методом, який полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами, котрі утворюються у реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою

НАДФН. Утворення нітроформазау – продукту відновлення нітротетразолію, блокується наявністю СОД [13]. Каталазну активність (КФ 1.11.1.6) вимірювали з використанням реакції перекису водню з молібдатом амонію [14]. Вміст сполук, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-позитивні продукти), визначали згідно з методикою Тімірбулатова [15]. Визначення вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) проводили методом Гріна, використовуючи реактив Гріса [4, 16, 17]. Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) визначали в безбілкових аліквотах лізатів після його відновлення цинковим пилом до нітрит-аніона (NO_2^-) [4, 18]. Сумарну активність NOS (КФ 1.14.13.19) вивчали за методикою, в основі якої лежить стехіометричне окиснення НАДФН у процесі реакції утворення NO з L-аргініну. Зменшення кількості НАДФН, яка еквімолярна такій утвореного NO, реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Для підвищення специфічності вирахування ступінь окиснення НАДФН, пов'язаного лише з активністю NOS, використовували додаткову пробу, яка замість L-аргініну містила 0,3 мл водного розчину інгібітора NOS – L-NAME у аналогічній до субстрату концентрації. Різниця між ступенем окиснення НАДФН з L-аргініном і з інгібітором дає ступінь окиснення НАДФН, залежну від конкурентного неселективного інгібітора всіх ізоформ NOS, тобто активність NOS [4]. Концентрацію білка в зразках визначали за методом Лоурі [19]. Результати обробляли методами варіаційної статистики з визначенням вірогідності змін за критерієм t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що основні пошкоджувальні ефекти алкогольної інтоксикації є наслідками безпосередньої дії етанолу та його токсичних метаболітів, які утворюються в процесі біотрансформації алкоголю. Етанол та інтермедіати його окиснення можуть впливати на рівень окисно-відновних процесів у клітині

із залученням NO-залежних сигнальних та метаболічних шляхів.

Нами було встановлено, що в еритроцитах щурів з алкогольною інтоксикацією значення сумарної активності NOS менше на 65% ($P < 0,05$) відносно контролю (рис. 1).

При введенні L-аргініну сумарна активність NOS збільшувалася в двох досліджуваних групах. Так, у нормі показник збільшився в 1,2 раза відносно контролю, а за умов алкогольної інтоксикації — в 1,9 раза щодо значень у тварин з інтоксикацією. Неселективний інгібітор L-NAME, який є структурним аналогом L-аргініну, знижував вихідний рівень сумарної активності NOS на 23,4% у контролі й на 25% за умов патології.

В організмі основними біологічними формами існування NO є S-нітрозотіолі і динітрозильні комплекси заліза, які здатні до взаємоперетворень. У нормі такі депо створюються за умов споживання L-аргініну, який виступає субстратом NOS, а при алкогольній інтоксикації вони можуть вивільнятися для інгібування активності NOS за принципом негативного зворотного зв'язку, оскільки

пмоль НАДФН/хв · мг протеїну

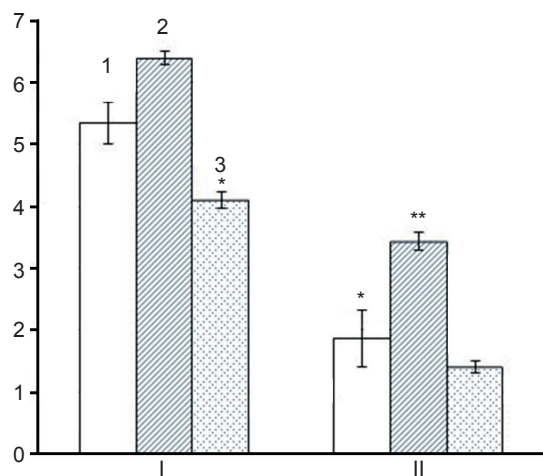


Рис.1. Активність NO-синтази у гемолізатах еритроцитів периферичної крові щурів у контролі (I) та за умов алкогольної інтоксикації (II): без додаткових факторів, 2 - з додаванням L-аргініну, 3 - з додаванням L-NAME.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем;

** $P < 0,05$ порівняно з інтоксикацією

оксид азоту має здатність зв'язуватися з гемовою групою ферменту, знижуючи його активність [9 – 11].

Відомо, що в еритроцитах наявний власний синтез NO. Такий цікавий факт дає змогу поставити нову низку питань щодо ролі цього низькомолекулярного регулятора у функціонуванні еритроцитів. На думку деяких дослідників, нітрит-іони є внутрішньосудинним депо оксиду азоту, а дезоксигемоглобін діє як нітритредуктаза, здійснюючи внесок в еритроцитозалежну гіпоксичну вазодилатацію. Еритроцити можуть бути резервуаром для внутрішньосудинного нітрит-іона, вміст якого може змінюватися за умов патології [4, 9, 20]. Нами відмічено зменшення вмісту NO_2^- у лізатах еритроцитів щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією в 1,3 раза відносно значень у контрольних тварин (таблиця 1).

Споживання тваринами L-аргініну зумовлювало збільшення вмісту NO_2^- як у нормі, так і за умов алкогольної інтоксикації, а L-NAME – зниження вмісту NO_2^- в обох досліджуваних групах. У літературних джерелах є дані, які свідчать про те, що за умов алкогольної інтоксикації посилюється активність нітритредуктазних систем, які супроводжуються розвитком гіпоксичного стану [21]. Можна припустити, що зниження вмісту NO_2^- може бути пов'язано з активним його відновленням до NO в еритроцитах периферичної крові. Значна частина утвореного NO вивільняється з еритроцитів і бере участь у вазодилатації, а екзогенний L-аргінін поповнює собою си-

роватковий запас, стає субстратом для NOS, відновлюючи таким чином пул NO [9, 16]. Нами виявлено збільшення вмісту NO_3^- за умов алкогольної інтоксикації. Це пов'язано не з генерацією NO у процесі функціонування ферментів NOS, оскільки сумарна активність їх знижується, а з вивільненням NO зі зв'язаної форми – нітрозопохідних і залізонітрозильних комплексів, у тому числі і з нітрозогемоглобіну під час нітритредуктазних реакцій [9]. У контролі споживання L-аргініну сприяло підвищенню вмісту NO_3^- , тоді як за умов алкогольної інтоксикації – зниженню. Натомість додаткове введення L-NAME у обох досліджуваних групах зменшувало цей показник.

Відомо, що за умов гострого отруєння алкоголем і хронічної алкогольної інтоксикації в організмі ссавців відбуваються значні зміни не тільки у тканинах, які зазнають первинного контакту з алкоголем, а й у тих, де здійснюється його метаболізм [1-3]. У разі цієї патології швидкість процесів ПОЛ переважає над здатністю антиоксидантної системи нівелювати вплив надлишкової кількості вільних радикалів, які, взаємодіючи з макромолекулами клітин, спричиняють їхнє пошкодження. Прооксидантні властивості, в патогенезі алкогольної інтоксикації, мають такі АФК та АФА: супероксидний аніон-радикал, пероксид водню (H_2O_2), гідроксильний радикал (HO^\cdot) і синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), котрі, як і оксид азоту, є надзвичайно реакційноздатними [22, 23].

Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нмоль/мг протеїну) у еритроцитах периферичної крові щурів у контролі та за умов інтоксикації ($M \pm m$, $n=6$)

Групи тварин	$\text{NO}_2^- \cdot 10^{-2}$	NO_3^-
Контроль	18,5±0,3	1,68±0,14
Введення		
глюкози і L-аргініну	22,1±0,8*	2,3±0,14*
глюкози і L-NAME	17,8±0,5	0,93±0,30*
Алкогольна інтоксикація	14,67±0,60*	3,25±0,23*
Введення		
L-аргініну	17,4±0,8**	1,9±0,1**
L-NAME	14,4±1,3	2,13±0,27**

Оскільки в еритроцитах ссавців основним ферментом, який каталізує реакцію розщеплення пероксиду водню, є каталаза, очікуваним наслідком оксидативного стресу за умов інтоксикації буде зростання її активності. Однак дослідження показало, що за умов алкогольної інтоксикації активність цього ферменту вірогідно знижується порівняно з контролем на 65% (рис.2).

Така зміна активності каталази зумовлюється, в основному, безпосереднім впливом на фізико-хімічні властивості мембранних структур, окисної модифікації ліпідних або білкових компонентів і зменшення виходу у розчинну цитозольну фракцію цього ферменту [20]. Активність каталази може знижуватися в результаті зменшення концентрації субстрату, оскільки пришвидшується неферментативна реакція Фентона з утворенням ініціатора ПОЛ – радикала OH^\cdot . Можливою також є інактивація каталази внаслідок безпосереднього впливу етанолу чи продуктів його метаболізму на структурну організацію цього ферменту або пригнічення відповідних біосинтетичних процесів токсичною дією ацетальдегіду у попередниках еритроїдних клітин червоного кісткового мозку. Споживання L-аргініну та L-

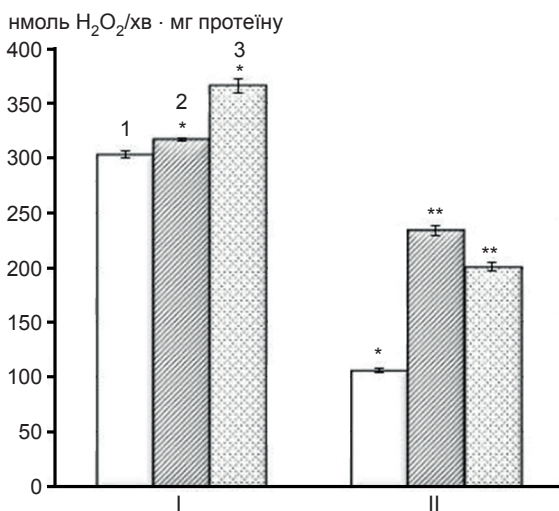


Рис.2. Активність каталази у гемолізатах еритроцитів периферичної крові щурів у контролі (I) та за умов алкогольної інтоксикації (II): без додаткових факторів, 2 - з додаванням L-аргініну, 3 - з додаванням L-NAME

NAME мало односпрямовану дію і призводило до підвищення цього показника як у нормі, так і за алкогольної інтоксикації.

Зниження активності СОД за умов алкогольної інтоксикації може бути пов'язане з впливом ONOO^- (рис.3).

Пероксинітрид може пострасляційно модифікувати СОД за тирозиновими залишками з утворенням стабільного протеїнзв'язаного комплексу [5, 9]. Слід відзначити, що споживання L-аргініну та L-NAME як у нормі, так і за умов алкогольної інтоксикації супроводжувалося підвищенням активності цього ферменту. Підвищення активності СОД за умов алкогольної інтоксикації на тлі досліджуваних чинників може бути пов'язане зі зменшенням пулу пероксинітриду, що відбувається за зниження продукції NO або в разі інгібування генерації супероксиду.

Сумарний вміст метаболітів NO підвищується внаслідок збільшення вмісту NO_3^- . Така зміна сприяє ушкоджувальній дії продуктів ПОЛ і суттєво підсилює ефект вільнорадикального окиснення. У лізатах еритроцитів за алкогольної інтоксикації вміст ТБК-позитивних продуктів збільшувався відносно контролю в 1,7 раза (рис.4).

Як відомо, активація процесів ПОЛ при одночасному зниженні активності ферментів АОЗ є одним з провідних чинників прогресу-

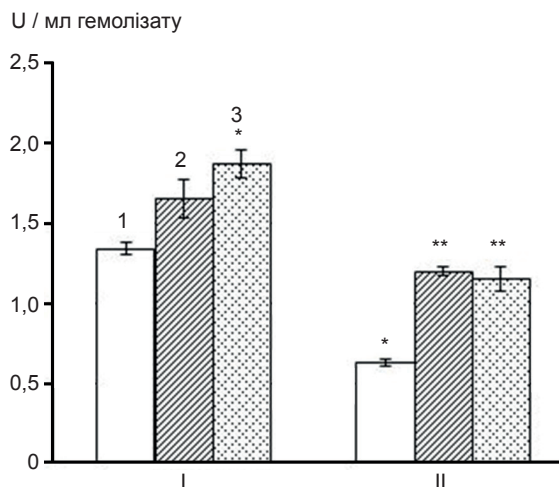


Рис.3. Активність супероксиддисмутази у гемолізатах еритроцитів периферичної крові щурів у контролі (I) та за умов алкогольної інтоксикації (II): без додаткових факторів, 2 - з додаванням L-аргініну, 3 - з додаванням L-NAME

сування хронічної ендогенної інтоксикації та трансформування нормальних тканин у нефункціонуючі. Продукти ПОЛ викликають трансформування клітин печінки у колагенпродукуючі, стимулюють купферовські клітини до надлишкового синтезу колагену III і ініціюють фіброгенез у печінці хворих [10]. Споживання L-аргініну та L-NAME тваринами 2-ї та 3-ї груп відповідно, не супроводжувалося достовірними змінами ТБК-позитивних продуктів у лізатах еритроцитів. Однак за умов алкогольної інтоксикації при введенні L-аргініну та L-NAME спостерігали зменшення вмісту вторинних продуктів ПОЛ.

Таким чином, результати проведених досліджень підтверджують те, що за умов алкогольної інтоксикації посилюється окисний стрес. Своєрідний «антиоксидантний» ефект NO дає змогу припустити, що взаємодія супероксидного аніон-радикала і NO може бути біологічно важливим шляхом детоксикації потенційно небезпечних АФК за умов алкогольної інтоксикації. Це відбувається за рахунок утворення пероксинітритної кислоти і її дисоціації з утворенням протона (H^+) і NO_3^- [5, 9, 22, 23]. Однак є літературні дані, які свідчать про те, що NO здатний посилювати негативні ефекти супероксидного радикала й

інших АФК, роль яких у патогенезі токсичного ураження тканин і розвитку ендотоксемії за алкогольної інтоксикації може вважатися доведеною. Цей шлях можливий за рахунок утворення цитотоксичного $OONO^-$ або вільнорадикального розпаду пероксинітритної кислоти на два токсичні радикали OH^\cdot і NO_2^\cdot , які є ініціаторами ПОЛ [5, 7, 22].

Екзогенне введення L-аргініну за умов алкогольної інтоксикації сприяє його посиленому метаболізму окисним шляхом, що в свою чергу зумовлює підвищення концентрації NO до фізіологічного рівня. У цьому разі NO виступає як антиоксидант, оскільки зв'язуючись з Fe^{2+} , що входить до складу гем-вмісних протеїнів (гуанілатциклаза, власне NO-синтаза, гемоглобін, цитохромоксидаза, цитохром P_{450} , ксантинооксидаза, пероксидаза, міeloperоксидаза, каталаза тощо), він гальмує утворення цитотоксичних радикалів, утворених в ході окисних реакцій. При споживанні алкоголізованими тваринами L-NAME знижувалася сумарна активність NOS, що супроводжувалося зменшенням кількості пероксинітриту, утвореного *de novo*. Це сприяло вирівнюванню оксидантно-прооксидантної рівноваги.

За споживання *per os* тваринами з інтоксикацією субстрату NOS - L-аргініну показано нормалізацію показників системи антиоксидантного захисту, а саме: підвищення активності його ферментів, зниження концентрацій кінцевих продуктів ПОЛ. Споживання алкоголізованими тваринами L-NAME виявляло позитивний коригуючий ефект на активність ферментів антиоксидантного захисту та вміст продуктів ПОЛ, але меншою мірою, ніж за умов споживання L-аргініну.

Н.В. Єфіменко, Н.А. Сибірна

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМЫ L-АРГИНИН – NO НА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЕ РАВНОВЕСИЕ В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации выявлены изменения активности ферментов

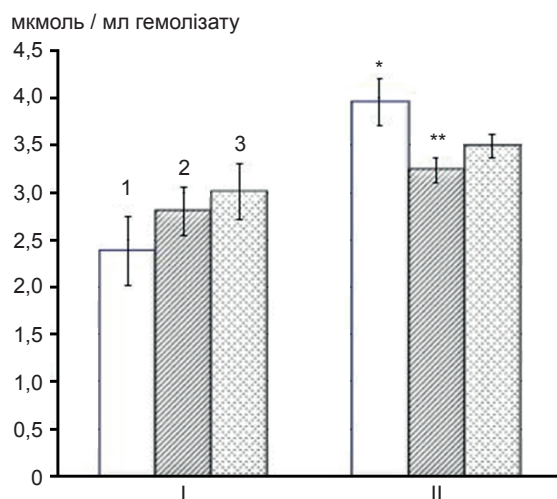


Рис.4. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у контролі (I) та за умов алкогольної інтоксикації (II): без додаткових факторів, 2 - з додаванням L-аргініну, 3 - з додаванням L-NAME

антиоксидантної захисти (супероксиддисмутази, каталази) і NO-синтази (NOS), содержания стабільних продуктів метаболізму окисла азота і урвня продуктів перекисного окислення ліпидів в лизатах еритроцитів крыс. Показано, что при употреблении субстрата NOS – L-аргинина животными с алкогольной интоксикацией активность энзимов антиоксидантної захисти возрастает в 2 раза на фоне уменьшения содержания ТБК-позитивных продуктов. Установлено, что в гемолизатах эритроцитов крыс с алкогольной интоксикацией значение суммарной активности NOS уменьшалось на 65% относительно контроля. Неселективный ингибитор Nω-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME), который является структурным аналогом L-аргинина, понижал выходной уровень суммарной активности NOS на 23,4% в контроле и на 25% при патологии. При потреблении крысами L-аргинина суммарная активность NOS увеличивалась в двух исследуемых группах. Полученные результаты свидетельствуют о антиоксидантных свойствах L-аргинина и незначительном корректирующем воздействии L-NAME.

Ключевые слова: эритроциты; алкогольная интоксикация; оксидативный стресс.

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

N.V. Yefimenko, N.O. Sybirna

EFFECT OF L-ARGININE – NO ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN ERYTHROCYTES OF RATS UNDER ALCOHOL INTOXICATION

It was shown changes in the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase) and NO-synthase (NOS), in the content of stable metabolic products of nitric oxide and levels of lipid peroxidation products in erythrocytes of rats under alcoholic intoxication. It was shown that animals with alcohol intoxication under of the admission of the main substrate NOS – L-arginine activity of antioxidant protection enzymes was increased in twice on the fond of TBA-positive products decrease contents. Established in hemolysate red blood cells in rats with alcohol inrotoxication value of total NOS activity decreases by 65% compared to control. Not selective inhibitor Nω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), which is a structural analog of L-arginine, reduced output level of total NOS activity by 23.4% in the control and 25% under conditions of pathology. The consumption of rats L-arginine NOS total activity increased in the two study groups. The results testify that L-arginine has antioxidant properties, whereas L-NAME exerts a slightly stabilizing influence.

Key words: erythrocytes; alcoholic intoxication; oxidative stress.

Department of Biochemistry, Ivan Franko Lviv National University

REFERENCES

1. Gulyi MF. Metabolic disorders and their correction in the human body for alcoholism and drug addiction. Ukr Biochem J. 2000; 72(6): 103-6. [Ukrainian].
2. Das SK, Vasudevan DM. Monitoring oxidative stress in patients with non-alcoholic and alcoholic liver diseases. Indian J Clin Biochem. 2005; 20(2): 24-8.
3. Tsyntar TP. Lipid peroxidation and oxidative modification of proteins in non-alcoholic steatohepatitis, combined with chronic obstructive pulmonary disease. BMH J. 2014; 18, № 3 (71): 166-8. [Ukrainian].
4. Sybirna NO, Mayevska OM, Barska ML. Research of separate biochemical indexes under oxidative stress. Lviv: Publishing center of the Ivan Franko Lviv National University; 2006. [Ukrainian].
5. Sharipov RR, Kotsuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(5); 3-13. [Ukrainian].
6. Yolkina NM, Kazakova VV, Konoshenko SV. Description of some indices erythrocytes inwardly to metabolism in condition of active oxygen forms generation in vitro. Exp and Clin Phys and Biochem. 2005; 3: 50-3. [Ukrainian].
7. Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. Pharmacol Res. 2005; 51: 337-43.
8. Sybirna NO, Lyuta MYa, Klymyshyn NI. Molecular mechanisms of nitric oxide deposition in erythrocytes. Studia Biologica. 2010; 4 (1): 143-60. [Ukrainian].
9. Drel VR. Main mechanisms of the initiation and development of diabetic complications: the role of nitrative stress. Stud Biol. 2010; 4(2): 141-58. [Ukrainian].
10. Acevedo CG, Carrasco G, Burotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. Life Sci. 2001; 68: 2893-903.
11. Sybirna NO, Vovk OI, Fedorovych AM. Influence of L-arginine and NOS inhibitors on antioxidant system of platelets under type 1 diabetes mellitus. Visn Lviv Univ. Series Biology. 2004; 38: 50-6. [Ukrainian].
12. Burov YuV, Vedernikova NN. Neurochemical and Pharmacological journal of alcoholism. Moscow: Medicine; 1985. [Russian].
13. Chevri ST, Andal T, Shtrenger Ya. Determination of antioxidant parameters of blood and their diagnostic value in a sear and yellow leaf. Lab business. 1991; 10: 9-13. [Russian].
14. Koroluk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method for measuring catalase activity. Lab business. 1988; 1: 16-9. [Russian].
15. Timirbulatov R, Seleznev E. Method for increasing intensity of free radical oxydation of blood lipid containing components and its diagnostic value. Lab business. 1981; 4: 209-11. [Russian].
16. Gromov LA, Belenichev IF, Gonchar-Cherdakli LG, Zher-

- novaja GA. Effect of anticonvulsants on the nitric oxide system. Ukr Biochem J. 2013; 85 (1): 79-83. [Russian].
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J.G. Analysis of nitrate, nitrite and ^{15}N —nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126 (1): 131–8.
18. Kiselyk IO, Lutsyk MD, Shevchenko Yu. Peculiarities of determining nitrates and nitrites in blood of the patients with viral hepatitis and jaundices of another etiology. Diagn Lab. 2001; 3: 43–5. [Ukrainian].
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J Biol Chem. 1951; 193: 265-75.
20. Dudok K, Starykovich L, Vlokh I, Dudok T, Grinchishin N., Sybirna N. Structural and functional peculiarities of haemoglobin and the blood erythrocyte enzymes activity of the rats at the duration of ethanol intoxication. Visn Lviv Univ. Series Biol. 2008; 47: 74-80. [Ukrainian].
21. Zahorodnyi M, Svintsitskyi I. Endothelial dysfunction in hypertension: current views on the causes and pathogenetic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies. Cardiology. 2013; 2:17-27. [Ukrainian].
22. Pefeiffer S, Gorren ACF, Pitters E, Schmidt K, Werner ER, Mayer B. Allosteric modulation of neuronal nitric oxide synthase by the pterin-site inhibitor 4- amino-tetrahydrobiopterin. Biochem J. 1997; 328: 349 - 52.
23. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(13): 6770-4.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.11.2015*

Потенціалкеровані кальцієві канали: класифікація та фармакологічні характеристики (частина I)

О.В. Єгорова¹, О.П. Максимюк^{1,2}, О.І. Фісюнов¹, О.О. Кришталь^{1,2}

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

²Міжнародний Центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; email: am@deptcm.kiev.ua.

Вхід іонів кальцію через потенціалкеровані кальцієві канали опосередковує величезну кількість фізіологічних подій та клітинних відповідей. Численні наукові публікації показують, що кальцієві канали беруть участь в процесах синаптичної передачі, вивільнення медіаторів, регуляції експресії генів, скорочення, формування осциляцій мембранного потенціалу, пейсмекерної активності, вивільнення секретованих речовин з нервових та секреторних клітин, активації кальційзалежних ензимів тощо. В огляді представлені сучасна класифікація, особливості молекулярної будови, фізіологічні і фармакологічні властивості потенціалкерованих кальцієвих каналів клітин ссавців.

Ключові слова: потенціалкеровані кальцієві канали, фармакологія, молекулярна будова.

ВСТУП

Іони кальцію відіграють важливу роль у функціонуванні збудливих клітинних систем. Їх валентність зумовлює здатність ефективно взаємодіяти з органічними молекулами і змінювати конформацію, запускаючи чи модулюючи таким чином перебіг основних внутрішньоклітинних життєвих процесів. Зміни їх внутрішньоклітинної концентрації ($[Ca^{2+}]_i$) регулюють такі фізіологічні та біохімічні процеси, як проліферація, секреція, електричне збудження та його розповсюдження, синтез білків тощо [1].

Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у нервових клітинах здійснюється за рахунок вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо і його входу ззовні. Потенціалкеровані кальцієві (ПКК) канали, розташовані в клітинній мембрані збудливих клітин, утворюють один із основних шляхів надходження Ca^{2+} всередину клітини. Відкриваючись у відповідь на деполаризацію і пропускаючи вхідний струм вони беруть участь у контролі трансмембранного потенціалу та значною мірою визначають характеристики потенціалу дії, що генерується

клітиною. Крім сигнальної функції кальцієві канали відіграють важливу роль у сполученні електричної активності плазматичної мембрани із різними рецепторними механізмами та внутрішньоклітинними процесами.

Відкриття кальцієвих каналів

Під час з'ясування механізмів регуляції іонної провідності мембрани збудливих клітин Ходжкін та Хакслі [2] вперше висунули припущення про іонний канал, яке полягало в тому, що проникність мембрани для різних іонів зумовлена молекулярними порами (каналами), через які вони можуть вільно проникати в клітину. Автори розробили модель потенціалу дії, що демонструвала наявність у клітинній мембрані натрієвих і калієвих потенціалкерованих каналів. Згодом це стало одним з основних досягнень у галузі вивчення клітинної збудливості.

Відкриття ПКК-каналів було відзначено експериментами Фетта і Катца [3], які, вивчаючи властивості м'язових волокон рака, уперше знайшли їхню здатність генерувати потенціали дії в безнатрієвому розчині. По-

© О.В. Єгорова, О.П. Максимюк, О.І. Фісюнов, О.О. Кришталь

яснюючи природу цих явищ Фетт і Гінсбург [4] уперше показали, що в їх основі лежить вхід Ca^{2+} у клітину. Після цього з'явилася ціла низка праць, що свідчила про існування кальцієвої провідності мембрани як універсальної властивості збудливих клітин.

Більш детально досліджуючи природу кальцієвого потенціалу дії Хагівара та співавт. [5] вперше встановили такі властивості кальцієвих каналів, як насичуваність ($K_D=20-40$ ммоль/л), конкурентне відкриття проникаючими катіонами (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) і блокування непроникаючими іонами (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). Для пояснення цих явищ автори постулювали наявність у каналі особливих місць адсорбції Ca^{2+} . Отримані дані дали змогу також уперше знайти ще одну важливу властивість кальцієвого потенціалу дії – його залежність від $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Наступний етап у вивченні кальцієвих каналів – експерименти Рейтера [6], котрий, використовуючи метод фіксації потенціалу і заміщення іонів у позаклітинних розчинах, уперше продемонстрував існування кальцієвої провідності мембрани волокон Пуркінє. Її наявність, мабуть, пов'язана з існуванням у мембрані клітини особливих ПКК-каналів, що відрізняються за своїми характеристиками від натрієвих каналів. Це згодом підтвердилося численними даними з заміщення іонів, а також фармакологічними експериментами [5, 7-11]. Була встановлена ще одна важлива особливість кальцієвих каналів: виявилось, що їхні характеристики модулюються іншими факторами крім мембранного потенціалу. Це вплив фізіологічно активних речовин – нейротрансмітерів та вторинних посередників (катехоламіни, серотонін, цАМФ) [9-11]. Також була виявлена неоднорідність популяції кальцієвих каналів.

Новий напрямок у вивченні потенціалкероаних каналів мембрани було пов'язано з розробкою Костюком та співробітниками методу внутрішньоклітинної перфузії ізольованих клітин [12]. Незважаючи на вже існуючу на той час методику перфузії гігантського аксона кальмара, застосування

її було сильно обмежене, оскільки такий підхід міг бути використаний тільки для досліджень досить великих об'єктів (наприклад, гігантських м'язових волокон). Метод внутрішньоклітинної перфузії дав змогу вивчати функціонування ізольованої клітини в умовах зміни її внутрішньоклітинного середовища. Використовуючи його автори вперше виділили кальцієвий струм у чистому вигляді із сумарного трансмембранного струму та провели детальний аналіз кінетичних характеристик. Виявилось, що на відміну від натрієвого й калієвого струмів, кінетика активації інтегрального кальцієвого струму описується квадратичним ступенем перемінної активації (m^2) моделі Ходжкіна-Хакслі [2], а хід інактивації – сумою принаймні двох експонент.

Костюком і Кришталь [13] також була вперше виявлена ще одна фундаментальна властивість кальцієвих каналів – це залежна від позаклітинної концентрації Ca^{2+} здатність трансформуватися в канал, що пропускає одновалентні катіони. Нарешті, застосування нового методичного підходу призвело до остаточного перегляду класичної концепції «метаболічної незалежності» функціонування іонних каналів. Можливість зміни внутрішньоклітинного середовища дала змогу виявити визначену залежність функціонування кальцієвих каналів від цитоплазматичних процесів: був виявлений феномен «вимивання» кальцієвого струму під час перфузії клітини, а також показана роль внутрішньоклітинного кальцію в пригніченні активності кальцієвих каналів і роль цАМФ-залежного фосфорилування в регуляції такої активності [14-16].

Найбільш значимим наслідком застосування внутрішньоклітинної перфузії було створення й розробка методу дослідження одиночних іонних каналів мембрани patch-clamp, суть якого полягає в можливості виміру трансмембранних струмів через мікроскопічно малі ділянки клітинної мембрани [17]. Цей метод виявився революційним у галузі дослідження іонних каналів, він дав

можливість реєструвати струми одиночних каналів амплітудою близько пікоампера. У результаті електрофізіологія вийшла на якісно новий рівень вивчення характеристик і властивостей іонних каналів, що у свою чергу призвело до значного розвитку теоретичних уявлень про механізми їхнього функціонування.

Молекулярна будова

Кальцієвий канал являє собою трансмембранний гетероолігомерний білковий комплекс із молекулярною масою близько 390 кДа, що складається з 4 субодиниць: α_1 , α_{28} , β і γ [18].

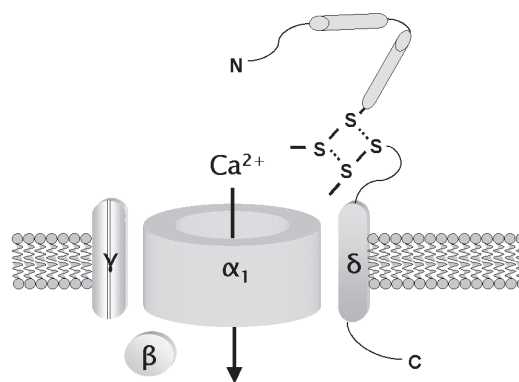
Молекулярне клонування ідентифікувало 10 генів α_1 -субодиниці кальцієвого каналу (α_{1A} – α_{1H} , α_{1L} та α_{1S}), 4 гени β -субодиниці (β_1 – β_4) та лише 1 ген α_{28} та γ [8, 19, 20]. Власне іонний канал, тобто заповнену водою пору, що забезпечує трансмембранне проходження іонів, формує α_1 -субодиниця з молекулярною масою 190 кДа (рисунок) [21]. Вона містить спеціальну ділянку, котра пропускає Ca^{2+} (та деякі інші двовалентні катіони) і затримує одновалентні катіони (селективний фільтр). Субодиниця α_1 складається з 1873 амінокислот, що формують 24 трансмембранних α -спіральних сегменти, зібраних у 4 гомологічних домени.

Кальцієві канали різного типу мають неоднакові пороформуючі α_1 -субодиниці, зокрема, α_{1A} -субодиниця відповідає кальцієвому каналу P/Q-типу, α_{1B} – N-типу, α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} та α_{1S} кодують кальцієві канали L-типу, а α_{1E} складає новий R-тип кальцієвих каналів із властивостями подібними як до високо- так і низькопорогових каналів. Нещодавно було показано, що α_{1G} , α_{1H} та α_{1L} кодують різні ізоформи кальцієвих каналів T-типу [20]. Субодиниці α_{28} , β і γ кальцієвого каналу виконують регуляторні функції, забезпечуючи додаткові центри фосфорилування каналу, зв'язування з G-білками і т.п. [22].

Класифікація

Спочатку були ідентифіковані два типи каль-

цієвих каналів: T (transient) і L (long-lasting), причому їхня класифікація ґрунтувалася на біофізичних властивостях (порозі активації й кінетиці інактивації) [12, 16, 23]. Незабаром у нервових клітинах за біофізичними параметрами був ідентифікований ще один високограничний компонент кальцієвого струму – N-струм (“ні T, ні L”) [17, 24, 25], і, відповідно, виділений N-тип кальцієвих каналів. Лише через кілька років стало можливим селективно виділяти інші компоненти кальцієвого струму, чому сприяло відкриття низки селективних блокаторів окремих типів кальцієвих каналів, головним чином, природних токсинів [26]. Так, спочатку був виявлений селективний блокатор каналів N-типу [24, 27, 28], а потім P-каналів (клітини Пуркінє) [29]. Порівняно недавно були фармакологічно розділені Q- і R-канали [28], і в більшості випадків R (residual) компонент кальцієвого струму визначається як залишковий. Таким чином, наразі кальцієві канали відповідно до фармакологічної класифікації розділяють на T, L, N, P, Q і R-типи [21]. З появою можливості провести молекулярне клонування було виділено і охарактеризовано 10 типів α_1 -субодиниць [21], що дало змогу їх розділити на 3 структурно і функціональ-



Структура потенціалкерованого кальцієвого каналу. Канал формують 4 субодиниці: α_1 , β , γ , α_{28} . Субодиниця α_1 формує каналну пору, α_1 , β мають центри фосфорилування для цАМФзалежної протеїнкінази, γ -субодиниця має центри гліколізації

Класифікація та функціональні характеристики потенціалкерованих кальцієвих каналів

Клас	Тип струму	Головна субодинація	Тип	Блокатори	Експресія	Фізіологічні функції	Хвороби
високопорові	L	α_{1S}	$Ca_v1.1$	Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+} , фенілакіламіни, бензотіазепіни, дигідропіридини	Скелетні м'язи	Генерація потенціалів дії, секреція гормонів і нейромедіаторів, синаптична передача у фоторецепторів та пресинаптична кальцієва сигналізація	М'язевий параліч, тимусний синдром, аутизм, куряча сліпота
		α_{1C}	$Ca_v1.2$		Міоцити судинної стінки, кардіоміоцити		
		α_{1D}	$Ca_v1.3$		Ендокринні клітини, нейрони		
		α_{1F}	$Ca_v1.4$		Палички та колбочки фоторецепторів		
	P	α_{1A}	$Ca_v2.1$	токсин ω AgaIVA, токсин ω STxMVPIIC	Нейрони, ендокринні клітини	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Мозочкова атаксія, геміплетична мігрень
	Q	α_{1A}	$Ca_v2.1$	токсин ω STxMVPIIC	Нейрони, ендокринні клітини	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Мозочкова атаксія, геміплетична мігрень
	N	α_{1B}	$Ca_v2.2$	Cd^{2+} , токсин ω STxGVIA, токсин ω STxMVPIIC	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Синдром дистонії-міоклонуса
	R	α_{1E}	$Ca_v2.3$	SNX-482, Cd^{2+} і Ni^{2+}	Нейрони	Вивільнення нейромедіаторів у синапсах	Розлади синаптичної передачі
	T	α_{1G}	$Ca_v3.1$	Ni^{2+} , амілорид, фенітоїн, фленаризин	Нейрони	Формування осциляцій мембранного потенціалу, пейсмейкерна активність нейронів	Абсансна епілепсія
		α_{1H}	$Ca_v3.2$		Кардіоміоцити, Нервова та ендокринна тканина		
		α_{1L}	$Ca_v3.3$		Нейрони		

но споріднених родини (Ca_v1 , Ca_v2 і Ca_v3) [30, 31] та довершити сучасну класифікацію кальцієвих каналів (див. таблицю).

Т-тип кальцієвих каналів

Низькопорогові потенціалкерovanі кальцієві канали (НПК) Т-типу за особливостями молекулярної будови поділяються на 3 під-типи: $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, $\text{Ca}_v3.3$. Канал $\text{Ca}_v3.1$ сформований $\alpha1_G$ -субодиницею, він має найбільш швидкий час відновлення після інактивації, локалізується в клітинах мозку. Канал $\text{Ca}_v3.2$, сформований субодиницею $\alpha1_H$, має найбільш повільний час відновлення після інактивації, широко розповсюджений у печінці та нирках, а також у серці, в нервовій та ендокринній тканинах. Канали $\text{Ca}_v3.3$ сформовані $\alpha1_I$ -субодиницею, локалізуються у нейронах мозку і генерують Т-струми, що сприяють підтриманню електричної активності нейронів, оскільки вони активуються внаслідок слабкої деполяризації. Кальцієві канали Т-типу зустрічаються в м'язових, секреторних [32] і хромафінних клітинах [33]. У багатьох нейронах ці канали починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -60 мВ [12, 23, 34]. Активація Т-каналів дуже швидка. Сигмоподібний тип активації підтверджує наявність 2 чи більше послідовних закритих станів каналу [35]. Деактивація (хвостовий струм) Т-струму пов'язана із закриванням каналів і може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу близько мілісекунд [36, 37]. Постійна часу деактивації Т-струму не залежить від тривалості попередньої деполяризації, ступеня інактивації кальцієвих каналів і типу проникаючого катіона [38].

Інактивація Т-струму розвивається моно-експоненційно за час близько 100 мс, виявляє строгу потенціалзалежність і не залежить від потоку Ca^{2+} , що проникають через канал [12, 23, 34]. При підтримуваних мембранних потенціалах більш позитивних ніж -50 мВ Т-канали повністю стаціонарно інактивовані [12, 23, 34, 39]. Таким чином, ці дані вказують

на подібність кінетичних характеристик Na^+ , K^+ і Ca^{2+} -каналів, а так само і на можливість застосування кінетичних схем, що описують роботу Na^+ - та K^+ -каналів, для Ca^{2+} -каналів [35].

Селективні та провідні властивості кальцієвих каналів Т-типу також характеризуються певними особливостями. По-перше, вони пропускають двовалентні катіони Ca^{2+} , Sr^{2+} і Ba^{2+} практично з однаковою ефективністю [34, 40], по-друге, провідність одиночних каналів досить низька 5 – 7 пСм [41] і практично не залежить від типу проникаючого двовалентного катіона.

Кальцієві канали Т-типу менш чутливі порівняно з L-каналами, до блокування Cd^{2+} [25]. Водночас вони більш чутливі до блокування Ni^{2+} [42]. Дигідропіридини, так само як і інші органічні блокатори, мають низьку ефективність щодо Т-каналів (виключення становлять Т-канали гіпоталамічних і можливо інших центральних нейронів хребетних) [43]. Досить сильними блокаторами цих каналів є амілорид [44], антиконвульсант фенітоїн [45], флунаризин [43] і деякі складні вуглеводневі спирти [29]. Функціональний стан кальцієвих каналів Т-типу практично не залежить від внутрішньоклітинних обмінних процесів, тому їхня активність протягом тривалого часу може підтримуватися в ізольованих від клітини мембранних фрагментах [41].

L-тип кальцієвих каналів

Високі порогові потенціалкерovanі кальцієві канали (ВПК) L-типу переважно локалізовані в кардіоміоцитах і міоцитах судинної стінки. Цей тип каналів також широко представлений в нейрональних [46], м'язових [47] і секреторних клітинах [48–50]. У серцево-судинній системі вони беруть участь у підтримці електричної і механічної активності кардіоміоцитів і гладеньком'язових клітин судин. Канали L-типу за особливостями молекулярної будови поділяються на наступні 4 типи: $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.4$. $\text{Ca}_v1.1$ -канали локалізовані на Т-трубочці поперечно-смуг-

гастих і серцевого м'язів. $\text{Ca}_v1.2$ широко експресуються в гладеньких м'язах, клітинах підшлункової залози, фібробластах і нейронах. Експресія $\text{Ca}_v1.3$ -каналів переважає на внутрішніх волоскових клітинах завитка. Було показано, що видалення $\text{Ca}_v1.3$ -каналів викликає глухоту у мишей [51]. $\text{Ca}_v1.4$ -канали переважно експресуються в паличках і колбочках фоторецепторів. Інактивація $\text{Ca}_v1.4$ призводить до порушення синаптичної передачі фоторецепторів та пресинаптичної кальцієвої сигналізації і запобігає формуванню фоторецепторів. Мутації в $\text{Ca}_v1.4$ -каналі в організмі людини спричиняють курячу сліпоту [52, 53]. Кальцієві канали L-типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу від -30 до -20 мВ [54]. Час досягнення піка амплітудного значення струму монотонно зменшується зі збільшенням потенціалу, амплітуда струму зростає від -30 до 0 мВ і знову спадає при подальшому збільшенні тестуючого потенціалу. Деактивація (хвіст) L-струму може бути апроксимована однією експонентою з постійної часу 170 мкс для Ca^{2+} і 235 мкс для Ba^{2+} [54].

Інактивація цих каналів розвивається дуже повільно і струм цілком не інактивується, якщо як основний проникаючий катіон використовуються Ba^{2+} або внутрішньоклітинний розчин містить EGTA [12, 34, 55]. Це підтверджує той факт, що $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відіграє важливу роль у контролі інактивації кальцієвих каналів [55].

Кальцієві канали L-типу, разом із Ca^{2+} здатні ефективно пропускати Ba^{2+} і Sr^{2+} . Ряд максимальної амплітуди струмів виглядає: $I_{\text{Ba}} > I_{\text{Sr}} > I_{\text{Ca}}$ [34, 36, 39, 56]. Така послідовність характерна як для макрострумів від цілої клітини, так і для струмів через одиночні канали. Одиночні L-канали відрізняються досить значною провідністю 2025 пСм при концентрації Ba^{2+} близько 100 ммоль/л [25].

L-тип кальцієвих каналів характеризується високою чутливістю до неорганічних іонів (Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+}) [57] та органічних блокаторів трьох класів – фенілалкіла-

мінів (верапаміл, D600), бензотіазепінів (дилтіазем) і дигідропіридинів (ніфедипін, нітрендипін, нізолдипін, німодипін) [58]. Стосовно каналів цього типу висока ефективність властива також кальцієвим агоністам з групи дигідропіридинів – BayK8644 і CGP28392 [25, 59].

Особливістю кальцієвих каналів L-типу всіх збудливих клітин є залежність їхнього функціонального стану від внутрішньоклітинного метаболізму [35, 60]. Це, у свою чергу, визначає їх схильність до різноманітних регуляторних впливів, котрі модулюють їх активність за допомогою широкого набору нейротрансмітерів і гормонів за участю різних внутрішньоклітинних систем [47].

N-тип кальцієвих каналів

Наявність каналів N-типу ($\text{Ca}_v2.2$) одночасно з кальцієвими каналами інших типів було показано в основному для клітин нейрональної природи [61-63]. Крім нейронів спінальних гангліїв, ембріонів курчати й миші, до таких клітин відносяться нейрони тригемінальних гангліїв [64], клітини клубочкової зони кори наднирникових залоз щура [56] і нейросекреторні клітини [33]. Співіснування N і L-каналів було показано на симпатичних нейронах щура [65]. Як і в разі інших підтипів потенціалкероаних кальцієвих каналів, $\alpha 1$ -субодиниця утворює пори, через які кальцій проникає в клітину і визначає більшу частину властивостей каналу $\text{Ca}_v2.2$ [66].

Кальцієві канали N-типу за своєю потенціалзалежністю займають проміжне положення між T і L-каналами. Поріг їхньої активації перевищує такий для T-каналів і лежить у діапазоні від -40 до -30 мВ. Максимум вольт-амперної характеристики припадає на потенціали в ділянці 0 мВ [39]. Під час триваючої деполяризації кальцієві канали N-типу досить швидко інактивуються (постійна часу 50–80 мс), потенціал їх повної стаціонарної інактивації становить приблизно -30 мВ. Провідність одиночних каналів N-типу становить близько 13 пСм (110 ммоль/л Ba^{2+}) [25]. У більш пізніх дослідженнях було

встановлено, що провідність одиночних N-каналів близько 18 пСм [67].

Серед особливостей фармакології N-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування Cd^{2+} і токсином ω -CTx-GVIA, а також стійкість до Ni^{2+} і дигідропіридинів [39, 68, 69].

Р-тип кальцієвих каналів

ВПК канали Р-типу ($\text{Ca}_v2.1$) поширені у багатьох структурах ЦНС, периферичній нервовій системі, серцевому та скелетних м'язах [29, 70]. На молекулярному рівні вони складаються з основної пороформуючої $\alpha 1$, допоміжних $\alpha 2$ -та β -субодиниць і факультативних субодиниць, як наприклад γ , у кальцієвих каналах скелетних м'язів [71]. Канали цього типу починають активуватися при деполяризації клітини до значень мембранного потенціалу -55 мВ, а максимум їх вольт-амперної характеристики знаходиться близько -20 мВ [72]. Деактивація (хвіст) струму через Р-тип кальцієвих каналів може бути апроксимована однією експонентою з постійною часу 180 мкс. Інактивація цього струму розвивається дуже повільно (кілька секунд) і залежить від мембранного потенціалу. Характерною рисою Р-типу кальцієвих каналів є широкий діапазон перекриття (від -50 до 0 мВ) кривих стаціонарної активації й інактивації [72]. Дослідження провідності одиночних каналів ізольованих клітин Пуркінє дорослих тварин показали наявність 3 різних рівнів провідності (9-10, 13-14, 18-19 пСм), кожний з яких блокується очищеною отрутою токсину австралійського павука-тенетника (FTX від англ. funnel spider toxin) [73]. Серед особливостей фармакології Р-каналів слід зазначити високу чутливість до блокування за допомогою токсину ω -Aga-IVA, а також стійкість до дигідропіридинів і ω -CTx-GVIA [72].

Q-тип кальцієвих каналів

Цей тип каналів вперше був виявлений у нейронах мозку [74], гранулярних клітинах

мозочка [75] та у клітинах серцевої тканини [22]. Їх характеристики схожі на ПМК-канали Р-типу, більше того, ці канали мають однакову пороформуючу субодиницю (α_{1A}) і відповідно належать до родини $\text{Ca}_v2.1$ [21]. На підставі значень порогу активації (близько -40 мВ) і максимуму вольт-амперної характеристики (0-10 мВ) Q-тип каналів був віднесений до ВПК-каналів. Вони мають більш швидку кінетику інактивації, ніж Р-канали, а також більш низьке значення потенціалу половинної інактивації, близько -45 мВ [22]. Проникність Q-каналів однакова як для іонів кальцію, так і барію [76].

При аналізі фармакологічних властивостей Q-типу кальцієвих каналів гранулярних клітин мозочка було встановлено, що вони не чутливі до дигідропіридинів та токсину ω -CTx-GVIA, але можуть бути цілком заблоковані токсином ω -CTx-MVІІС у мікромолярних концентраціях і на 60% токсином ω -Aga-IVA у концентрації 1 мкмоль/л [74]. Незважаючи на те, що токсин ω -CTx-MVІІС блокує як Q- так і N-тип кальцієвих каналів, N-струм пригнічується набагато швидше, ніж струм Q-типу. Аплікація 5 мкмоль/л токсину ω -CTx-MVІІС призводить до повного блокування N-типу кальцієвих каналів уже через 10 с, водночас для повного блокування каналів Q-типу потрібно близько 50 с [77]. Селективних блокаторів для цього типу каналів поки не виявлено.

R-тип кальцієвих каналів

Уперше кальцієві канали R-типу були виявлені у гранулярних нейронах мозочка [76, 78]. Як і для інших ПМК-каналів, $\alpha 1$ -субодиниця утворює пору, через яку іони кальцію проникають у клітину, і визначає більшу частину властивостей каналу. За будовою $\alpha 1$ -субодиниці, цей тип каналів також відомий як $\text{Ca}_v2.3$, і експресується в основному у корі головного мозку, дендритах пірамідальних клітин гіпокампа, стріатумі, мигдалині і міжніжкових ядрах [79], також, разом з каналами Q-типу, описані в гранулярних клітинах мозочка [80].

Ці канали мають високий поріг (близько -50 мВ) та відносно повільну кінетику активації струму. Максимальна амплітуда R-струму спостерігається при потенціалі 0 мВ (причому як у кальцієвому розчині, так і в розчині, що містить 5 ммоль/л Ba^{2+}). Під час триваючої деполяризації відбувається швидка інактивація цього струму (постійна часу 20–30 мс). Потенціал половинної інактивації R-типу кальцієвих каналів за даними різних авторів різний: Жанг і співавт. [76] наводять значення -62 мВ, а Долфін [22] – -15 мВ. Таким чином, за своїми активаційними і інактиваційними характеристиками T і R-канали дуже схожі між собою. Проте деактивація R-струму відбувається значно швидше T-струму і може бути апроксимованою однією експонентою з постійної часу близько 300 мкс [81]. Провідність одиночних кальцієвих каналів, утворених α_{1E} -субодиницею, так само досить висока і становить приблизно 14 пСм [82].

Серед фармакологічних особливостей R-типу кальцієвих каналів (як і для T-типу) слід зазначити низьку чутливість до цілої низки відомих блокаторів: дигідропіридинів, фенілалкіламінів, конотоксинів та FTX [78, 83]. За даними Еллінора та співавт. [78], струм через R-канали блокується Cd^{2+} і Ni^{2+} з $\text{IC}_{50}=1,2$ мкмоль/л і $\text{IC}_{50}=66$ мкмоль/л відповідно. Селективним блокатором для цього типу кальцієвих каналів є синтетична речовина SNX-482 [21].

Фізіологічні функції

Результати численних досліджень показали, що кальцієві канали різних типів розподілені в мозку неоднорідно і що кожний з них, швидше за все, виконує деяку специфічну функцію. З іншого боку, було встановлено, що кілька типів кальцієвих каналів можуть у визначеній пропорції одночасно експресуватися в одній і тій самій клітині, крім того, канали різних типів нерівномірно локалізовані й у межах самої клітини. Так, L-канали розташовуються в основному на сомі, P, Q

та R – на сомі та дендритах, N-канали – головним чином на синаптичних закінченнях [62, 84].

Нині ще немає повного уявлення про функцію кожного типу кальцієвих каналів. Передбачається, що T-канали беруть участь у формуванні осциляцій мембранного потенціалу і пейсмейкерної активності нейронів; L-канали відіграють роль у генерації потенціалу дії і задіяні у процесі вивільнення речовин, що секретуються з нервових і секреторних клітин, а N, P, і Q-канали регулюють вивільнення нейротрансмітерів у синаптичних сполученнях, причому функціональні розходження між трьома останніми типами каналів наразі не зовсім зрозумілі (див. таблицю). Проте окремі дані вказують, що ці канали задіяні до процесів вивільнення визначеного виду медіаторів або ж є специфічними для того чи іншого типу клітин [21, 85-87].

Е.В. Єгорова¹, А.П. Максимюк^{1,2},
А.І. Фіслюнов¹, О.А. Кришталь^{1,2}

ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ Кальциевые КАНАЛЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА (ЧАСТЬ I)

Вход ионов кальция через потенциалуправляемые кальциевые каналы опосредует огромное количество физиологических событий и клеточных ответов. Многочисленные научные публикации показывают, что кальциевые каналы участвуют в процессах синаптической передачи, высвобождении медиаторов, регуляции экспрессии генов, сокращения, формирования осцилляций мембранного потенциала, пейсмейкерной активности, высвобождение секретируемых веществ из нервных и секреторных клеток, активации кальцийзависимых ферментов и др. В данном обзоре представлены современная классификация, особенности молекулярного строения, физиологические и фармакологические свойства потенциалуправляемых кальциевых каналов клеток млекопитающих. Ключевые слова: потенциалуправляемые кальциевые каналы; фармакология; молекулярное строение.

¹Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

²Международный Центр молекулярной физиологии НАН Украины, Киев

**O. Iegorova¹, O. Maximyuk^{1,2}, A. Fisyunov¹,
O. Krishtal^{1,2}**

VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS: CLASSIFICATION AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES (PART I)

Calcium influx through voltage-gated calcium channels mediate a huge amount of physiological events and cellular responses. Numerous scientific reports indicate that calcium channels are involved in synaptic transmission, neurotransmitter release, regulation of gene expression, cellular membrane voltage oscillations, pacemaker activity, secretion of specific substances from nerve and secretory cells, morphological differentiation, activation of calcium-dependent enzymes, etc. This review represents the modern classification, molecular structure, physiological and pharmacological properties of voltage-gated calcium channels expressed in mammalian cells.

Key words: voltage-gated calcium channels, pharmacology, molecular structure.

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

²*International Center for Molecular Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Kostyuk P. Calcium ions in nerve cell function. Oxford: Oxford University Press; 1992.
2. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117(4):500-44.
3. Fatt P, Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1953;120(1-2):171-204.
4. Fatt P, Ginsborg BL. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1958;142(3):516-43.
5. Hagiwara S, Nakajima S. Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle. *J Gen Physiol.* 1966;49(4):807-18.
6. Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* 1967;192(2):479-92.
7. Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol.* 1973;26:1-43.
8. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, et al. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 1994;13(3):505-6.
9. Kostyuk PG, Krishtal OA, Doroshenko PA. Calcium currents in snail neurones. I. Identification of calcium current. *Pflugers Arch.* 1974;348(2):83-93.
10. Trautwein W, McDonald TF, Tripathi O. Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. *Pflugers Arch.* 1975;354(1):55-74.
11. Doroshenko PA, Kostyuk PG, Kryshchal OA. [Action of calcium on the somatic membrane of the giant neurons of molluscs]. *Neirofiziolohiia.* 1973;5(6):621-7. [Article in Russian]
12. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Intracellular perfusion. *J Neurosci Methods.* 1981;4(3):201-10.
13. Kostyuk PG, Krishtal OA, Shakhvalov YA. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J Physiol.* 1977;270(3):545-68.
14. Reuter H. Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 1974;242(2):429-51.
15. Tsien RW. Adrenaline-like effects of intracellular iontophoresis of cyclic AMP in cardiac Purkinje fibres. *Nat New Biol.* 1973;245(143):120-2.
16. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP. *Brain Res.* 1981;214(1):210-4.
17. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260(5554):799-802.
18. Hosey MM, Chang FC, O'Callahan CM, Ptasienski J. L-type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. Purification and phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;560:27-38.
19. Stea A, Soong TW, Snutch TP. The voltage-gated calcium channels. In: North R, editor. *Handbook of Receptors and Channels; Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.; 1995. p. 113-52.
20. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 1998;391(6670):896-900.
21. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8).
22. Dolphin AC. The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G-proteins. *Exp Physiol.* 1995;80(1):1-36.
23. Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J.* 1984;46(3):413-8.
24. Kostyuk PG, Shuba Ya M, Savchenko AN. Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflugers Arch.* 1988;411(6):661-9.
25. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 1985;316(6027):440-3.
26. Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science.* 1985;230(4732):1338-43.
27. Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and

- ω-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.* 1989;414(2):150-6.
28. Ferroni A, Mancinelli E, Camagni S, Wanke E. Two high voltage-activated calcium currents are present in isolation in adult rat spinal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(2):379-84.
29. Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(5):1689-93.
30. Snutch TP, Reiner PB. Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 1992;2(3):247-53.
31. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 2000;25(3):533-5.
32. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(9):349-54.
33. Albillos A, Artalejo AR, Lopez MG, Gandia L, Garcia AG, Carbone E. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol.* 1994;477(Pt 2):197-213.
34. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1985;359:431-46.
35. Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1982; 331:599-635.
36. Carbone E, Lux HD. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol.* 1987;386:547-70.
37. Matteson DR, Armstrong CM. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol.* 1986;87(1):161-82.
38. Lux HD, Carbone E, Zucker H. Na⁺ currents through low-voltage-activated Ca²⁺ channels of chick sensory neurones: block by external Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Physiol.* 1990;430:159-88.
39. Fox AP, Nowicky MC, Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol.* 1987;394:149-72.
40. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1985;86(1):1-30.
41. Carbone E, Lux HD. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J Physiol.* 1987;386:571-601.
42. Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J Physiol.* 1987;383:231-49.
43. Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuk YV. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol.* 1989;412:181-95.
44. Tang CM, Presser F, Morad M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science.* 1988;240(4849):213-5.
45. Yaari Y, Hamon B, Lux HD. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science.* 1987;235(4789):680-2.
46. Carbone E, Swandulla D. Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Mol Biol.* 1989;54(1):31-58.
47. Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:367-84.
48. Lopez MG, Villarroja M, Lara B, Martinez Sierra R, Albillos A, Garcia AG, et al. Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 1994;349(3):331-7.
49. Plant TD. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1988;404:731-47.
50. Madison DV, Nicoll RA. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol.* 1984;354:319-31.
51. Platzter J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, et al. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell.* 2000;102(1):89-97.
52. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998;19(3):264-7.
53. Striessnig J, Bolz HJ, Koschak A. Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):361-74.
54. Swandulla D, Armstrong CM. Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons. *J Gen Physiol.* 1988;92(2):197-218.
55. Eckert R, Chad JE. Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 1984;44(3):215-67.
56. Durroux T, Gallo-Payet N, Payet MD. Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J Physiol.* 1988;404:713-29.
57. Konnerth A, Dressen J, Augustine GJ. Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7051-5.
58. Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature.* 1983;302(5911):790-4.
59. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurones. *J Physiol.* 1981;310:403-21.
60. Kostyuk PG. Calcium channels in the neuronal membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1981;650(2-3):128-50.
61. Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, et al. Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science.* 1988;239(4835):57-61.
62. Regan LJ, Sah DW, Bean BP. Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω-conotoxin. *Neuron.* 1991;6(2):269-80.

63. Carbone E, Sher E, Clementi F. Ca currents in human neuroblastoma IMR32 cells: kinetics, permeability and pharmacology. *Pflugers Arch.* 1990; 416(1-2):170-9.
64. Dupont JL, Bossu JL, Feltz A. Effect of internal calcium concentration on calcium currents in rat sensory neurones. *Pflugers Arch.* 1986; 406(4):433-5.
65. Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(12):4313-7.
66. Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, et al. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron.* 1992;8(1):71-84.
67. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron.* 1989;2(5):1453-63.
68. McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, et al. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(12):4327-31.
69. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 1988;11(10):431-8.
70. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 1992;9(1):85-95.
71. Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, et al. Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J Biol Chem.* 1998; 273(52):34857-67.
72. Regan LJ. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J Neurosci.* 1991;11(7):2259-69.
73. Usonicz MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinas R. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron.* 1992;9(6):1185-99.
74. Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunits. *Neuron.* 1993;11(2):291-303.
75. Randall A, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 1995;15(4):2995-3012.
76. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology.* 1993;32(11):1075-88.
77. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994;264(5155):107-11.
78. Ellinor PT, Zhang JF, Randall AD, Zhou M, Schwarz TL, Tsien RW, et al. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature.* 1993;363(6428):455-8.
79. Toro-Castillo C, Thapliyal A, Gonzalez-Ochoa H, Adams BA, Meza U. Muscarinic modulation of Cav2.3 (R-type) calcium channels is antagonized by RGS3 and RGS3T. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C573-80.
80. Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology.* 1997;36(7):879-93.
81. Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, et al. Structure and functional characterization of neuronal α_{1E} calcium channel subtypes. *J Biol Chem.* 1994;269(35):22347-57.
82. Schneider T, Wei X, Olcese R, Costantin JL, Neely A, Palade P, et al. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca^{2+} channel alpha 1 subunit. *Recept Channels.* 1994;2(4):255-70.
83. Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science.* 1993;260(5111):1133-6.
84. Day NC, Shaw PJ, McCormack AL, Craig PJ, Smith W, Beattie R, et al. Distribution of α_{1A} , α_{1B} and α_{1E} voltage-dependent calcium channel subunits in the human hippocampus and parahippocampal gyrus. *Neuroscience.* 1996;71(4):1013-24.
85. Elliott EM, Malouf AT, Catterall WA. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci.* 1995;15(10):6433-44.
86. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.* 1996;380(6571):255-8.
87. Martin-Moutot N, Charvin N, Leveque C, Sato K, Nishiki T, Kozaki S, et al. Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6567-70.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.11.2015*

Інсуліноподібний фактор росту 1 за умов судинної патології головного мозку

О.Ю. Гарматіна

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ;
e-mail: harmatina@ukr.net

Система інсуліноподібних факторів росту (ІФР) займає важливе місце в розвитку і рості центральної нервової системи (ЦНС). Експресія генів інсуліноподібного фактора росту 1 (ІФР-1) і рецепторів ІФР-1 представлена практично у всіх відділах головного мозку і значною мірою сконцентрована в церебральних судинах. ІФР-1 бере участь у нейрогенезі, ангиогенезі, стимуляції проліферації клітин та репарації у відповідь на пошкодження центральної і периферичної нервової системи. ІФР-1 здійснює антиоксидантний, протизапальний та протекторний вплив на ЦНС. В огляді обговорюються значення і роль ІФР-1 в судинній патології головного мозку, зокрема, при аневризмах, ішемічному інсульті, аневризмальному субарахноїдальному крововиливі, а також у нейропротекції.

Ключові слова: інсуліноподібний фактор росту 1; церебральні судини; аневризми; інсульт; субарахноїдальний крововилив.

ВСТУП

Судинна патологія головного мозку відноситься до найбільш серйозних медико-соціальних проблем, що зумовлено її значною часткою в структурі захворюваності, інвалідності та смертності населення. Цереброваскулярні захворювання входять до числа головних причин смертності населення, тому з'ясування механізмів розвитку патології судин головного мозку має важливе значення для розробки ефективного лікування та нових терапевтичних підходів.

Інсуліноподібний фактор росту 1 (ІФР-1, соматомедин С, IGF-1) відноситься до системи інсуліноподібних факторів росту, яка являє собою гормональну мережу і включає три ліганди, чотири рецептори (ІФР-Р), шість високоафінних зв'язуючих протеїнів (ІФРЗП). Ліганди (інсулін, ІФР-1 і ІФР-2) експресуються в різних тканинах і мають індивідуальні фізіологічні функції. У крові ІФР циркулюють у вигляді комплексів з протеїнами, які його зв'язують (ІФРЗП1-6),

підсилюють або блокують їх ефекти, змінюють біологічну доступність, захищають при циркуляції і поставляють в тканини. Найбільший рівень експресії в головному мозку мають ІФРЗП-2, -4 і -5. У плазмі крові ІФРЗП зв'язують близько 99% ІФР-1 [1, 2]. ІФР, їх зв'язуючі білки і рецептори відіграють важливу роль у процесах, що регулюють ріст і розвиток центральної нервової системи (ЦНС), в нейропротекції, в патофізіології неврологічних захворювань і розглядаються як потенційні терапевтичні мішені.

ІФР-1 – плейотропний пептид з молекулярною масою 7,64 кДа, є важливим посередником дії гормону росту (ГР). ІФР-1 виконує різні метаболічні функції, регулює розвиток організму, клітинну проліферацію, диференціацію, апоптоз [3]. Він задіяний у таких функціях мозку, як енергетичний гомеостаз, нейрогенез, диференціювання, пластичність і виживання клітин ЦНС при дії патологічних факторів [4]. В огляді літератури обговорюються значення і роль ІФР-1 у судинній патології головного мозку.

© О.Ю. Гарматіна

Ген ІФР-1. Ген ІФР-1 людини розташований на довгому плечі хромосоми 12, представлений 6 екзонами, включає 90 тис. пар основ. У промоторі гена ІФР-1 ідентифікований поліморфізм – СА-повтори, кількість яких говорить про рівень експресії цього гена. Вміст ІФР-1 визначається алельними варіантами генів. Поліморфізм ІФР-1 асоційований з його вмістом у сироватці крові, масою і зростом [5].

Показано зв'язок поліморфізму гена ІФР-1 з різними захворюваннями. ІФР-1 бере участь у патогенезі серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2-го типу, ожиріння, атеросклерозу, пухлин головного мозку, хвороби Альцгеймера, шизофренії, ішемічного інсульту, аміотрофічного латерального склерозу, множинного склерозу, в механізмах старіння тощо [3, 6–8]. Беручи участь у механізмах, які контролюють клітинний цикл і апоптоз, ІФР-1 також займає важливе місце в онкології [9]. Різде зниження його вмісту відмічається при дефіциті ГР і голодуванні. Це пов'язано зі збільшеним ризиком смертності при ішемічній хворобі серця і інсульті [10], а високий вміст – з підвищеним ризиком розвитку деяких видів раку і хвороби Паркінсона [11, 12]. Найбільш часті алелі гена ІФР-1 (19 і 20 СА-повторів) асоційовані з максимальним вмістом ІФР-1 у сироватці крові. Їх відсутність призводить до значного зниження цього показника і може вказувати на ризик раптової зупинки серця [13].

ІФР-1 в мозку. Розвиток мозку ссавців проходить такі певні етапи, як нейруляція, нейрогенез, диференціювання в нейрони і клітини глії, міграція клітин, ріст дендритів і аксонів, природна загибель клітин, синаптогенез і мієлінізація. Дія сигналізації ІФР-1-ІФР-1Р у мозку виявляється практично на кожному етапі розвитку ЦНС [3].

Наявність скороченої форми ІФР-1 (des-N-(1-3)-IGF-1) є унікальною особливістю системи ІФР в мозку – вона не має перших 3 амінокислот (Gly-Pro-Glu). Ймовірно, ця

особливість des-ІФР-1 не дає змоги йому зв'язуватися з ІФРЗП, що забезпечує більш високу концентрацію його вільної форми, а також підвищену активність як локального ауто- і/або паракринного регулятора клітинної проліферації і виживання нормальних і трансформованих клітин мозку [14]. N-термінальний Gly-Pro-Glu (GPE) трипептид, який утворюється разом з des-N-(1-3)-ІФР-1 протягом протеолітичного розщеплення ІФР-1, також може опосередковувати нейропротекторні ефекти *in vivo* та *in vitro* [14, 15].

У мозку експресія ІФР-1, -2 і ІФР-1Р значно виражена під час ембріонального і раннього постнатального розвитку, потім спостерігається їх зменшення в підлітковому і дорослому віці [16]. ІФР-1 продукується практично всіма типами клітин мозку. ІФР-1 і ІФР-1Р експресуються в безпосередній близькості один від одного в різних ділянках головного мозку, припускаючи паракринну та/або аутокринну регуляцію [17]. ІФР-1 експресується в ембріоні гризунів, сягаючи максимуму на другому тижні постнатального розвитку і продовжує бути вираженим у головному мозку дорослих. Пік його експресії корелює з активною проліферацією, розвитком і ростом нейронів [18].

ІФР-1 і церебральні судини. Експресія генів ІФР-1 і ІФР-1Р представлена практично у всіх відділах головного мозку і значною мірою сконцентрована в церебральних судинах [19]. ІФР-1Р є в гладеньком'язових і ендотеліальних клітинах артеріальних судин. ГР, висока експресія ІФР-1 в судинах відіграють важливу регуляторну роль в ангіогенезі, стимулюють проліферацію ендотеліальних клітин і беруть участь у репарації кровоносних судин [20]. ІФР-1 також потенціює дію деяких факторів росту судин [21].

В експериментах на тваринах показано, що з віком вміст ГР і ІФР-1 в плазмі крові зменшується, що супроводжується зниженням синтезу білка ІФР-1 і еластичності судин [22, 23]. Зміна вмісту ІФР-1 в головному

мозку може бути пов'язана з модифікацією щільності його мікросудин. Дослідження *in vitro* підтверджують гіпотезу про те, що ГР і ІФР-1 регулюють ріст судин, а зниження їх секреції сприяє церебральній судинній недостатності, яка розвивається з віком. При дослідженні *in vivo* у старих тварин на фоні введення ГР істотно збільшувався ріст судин, що вказує на його участь і/або ІФР-1 в вікових змінах судинної регуляції [23]. Показано, що високий вміст ІФР-1 спостерігається саме в мікросудинах і загальна його концентрація в мозку знижується з віком на 30–40%, що зумовлено зменшенням щільності судин. Синтез ІФР-1 судинами може мати важливе значення в регуляції функції мозку. Враховуючи, що між функцією мозку і церебральними судинами існують певні взаємозв'язки, ймовірно, є і механізми, що відповідають за зниження функції судин, наприклад, наявність ІФР-1 як потенційного посередника між функціями нейронів і судин.

ІФР-1 і патологія судин. Артеріальні аневризми. Показана участь ІФР-1 у формуванні артеріальних ектазій і аневризм. Він може відігравати певну роль у розвитку аневризм у пацієнтів з пухлиною гіпофіза. Описані випадки поєднання пухлини гіпофіза і формування аневризм артерій головного мозку, торакоабдомінальної частини аорти, наявність яких корелює зі збільшеним вмістом ГР і ІФР-1 у сироватці крові. Це може вказувати на ризик розвитку внутрішньочерепних аневризм, тому нейрорадіологічна оцінка стану церебральних судин у такому разі може розглядатися одним з етапів діагностичного обстеження пацієнтів [24, 25].

Формування аневризм супроводжується порушенням метаболізму колагену в стінці артерій. Відомо, що ІФР-1 впливає на його біосинтез. Деградація колагену в стінці аневризми характеризується збільшенням колагенолітичної активності. Концентрація ІФР-1 в стінці аневризм знижується, що вказує на потенційну роль цього чинника у механізмах

регулювання метаболізму цього білка [26, 27]. Інший можливий механізм формування аневризм і ектазій артерій – підвищена чутливість ендотеліальних і гладеньком'язових клітин до дії ГР під впливом ІФР-1 [28].

Ішемічний інсульт. Найбільш поширена причина інвалідності в неврології – інсульт, який може бути ішемічним та геморагічним. Він супроводжується сенсомоторними і когнітивними порушеннями, є провідною причиною смертності і важкої тривалої непрацездатності у всьому світі. Показана участь ІФР-1 у механізмах ішемічного інсульту.

ІФР, який виробляється макрофагами, підвищує поглинання клітинами і деградацію ліпопротеїнів низької щільності [29]. Порушення регуляції ІФР-1 сприяє розвитку таких судинних захворювань, як атеросклероз і рестеноз [30]. Показано, що у дітей з дефіцитом ГР високий ризик розвитку атеросклерозу і смертності від серцево-судинних захворювань у ранньому віці [31]. В утворенні атеросклеротичної бляшки беруть участь багато чинників і ІФР один з них [32]. З іншого боку, ІФР-1 надає протизапальну дію, знижуючи експресію прозапальних цитокінів і пригнічує оксидативний стрес, що в свою чергу зменшує прогресування атеросклерозу [33].

Між вмістом ІФР-1 у плазмі і ризиком розвитку ішемічного інсульту існує зворотне співвідношення [34]. У плазмі крові після ішемічного інсульту у підлітків і дорослих цей показник значно знижується. При цьому більш низький вміст ІФР-1 пов'язаний з несприятливим прогнозом і підвищеним ризиком смерті [35]. Вміст ІФР-1 в сироватці знижуються з віком, при відсутності фізичних навантажень і при метаболічному синдромі [6]. Навіть після корекції цих факторів, низький вміст ІФР-1 у сироватці крові є чинником підвищеного ризику інсульту [34].

ІФР-1 і нейропротекція. ІФР-1 здійснює нейропротекторну дію на речовину головного мозку при різних патологічних впливах,

зокрема, регулюючи клітинну проліферацію та пригнічуючи клітинний апоптоз і некроз [8]. Він проникає в головний мозок і потенційно може забезпечити швидке та ефективно лікування, щоб запобігти хронічним наслідкам інсульту. Нейропротекторні властивості ІФР-1 при гострому ішемічному інсульті проявляються за рахунок розширювання судин, протизапального та антитромбоцитарного ефектів, а також поліпшення функціонального зв'язку і метаболізму нейронів, регуляції нейромедіаторів і ремієлінізації, що було показано при профілактиці когнітивних порушень у літніх людей, а також при поліпшенні функції при гострому ішемічному інсульті в досліджах на тваринах [36].

Екзогенний ІФР-1 сприяє виживанню нейронів *in vitro* та *in vivo*. У клітинах головного мозку, включаючи нейрони, він інгібує апоптоз, індукований різними стимулами, наприклад, такими, як гіпоксія і екситотоксичність, беручи участь у регуляції кальцію і збільшенні експресії протоонкогена *c-fos* [37, 38]. Активація ІФР-1Р по РІЗК-Akt і *ras-raf*-MEK-ERK шляхах після лігандіндукованої аутофосфориляції також призводить до інгібування апоптозу і зростання виживання клітин [39, 40].

Ослаблення ІФР-1 сигналізації в ЦНС при патологічних процесах пов'язана і з мітохондріальною дисфункцією [41]. Він сприяє виживанню нейронів за рахунок зниження каспазозалежного апоптозу, що проявляється у збільшенні мітохондріального мембранного потенціалу, зниженні споживання кисню і збільшенні синтезу АТФ, які в свою чергу мінімізують викид цитохрому *c* у цитоплазму [42].

Протекторний ефект ІФР-1 при ішемічному інсульті також пов'язаний з активацією нейрогенерациі [43] і модуляцією нейропластичності через вплив на ріст нейронів, синаптогенез, збудження нейронів і викид нейромедіаторів [44].

In vitro показано, що ІФР-1 бере участь у протекції сенсорних і моторних нейронів

при екситотоксичності та оксидативному стресі [3]. Ендотеліальні клітини судин, які формують гематоенцефалічний бар'єр, після ішемії збільшують секрецію ІФР-1, що зменшує ушкодження нейронів [45]. Астроцити – головний клітинний елемент мозку, який робить важливий внесок у гомеостаз нейронів. ІФР-1 бере участь у їх відповіді на оксидативний стрес як частина загальної реакції, що охоплює всі види клітин мозку. Інгібування ІФР-1 і ІФР-1Р в астроцитах показало, що експресія першого є важливим ключовим моментом у їх виживанні, а також у захисті нейронів в умовах оксидативного стресу за допомогою взаємодії факторів стовбурових клітин, які секретуються астроцитами, з ІФР-1. У останніх ІФР-1 зменшує також вміст прооксидантного тіоредоксинвзаємодіючого білка 1 і активних форм кисню [46].

В експериментах *in vivo* показано, що у щурів після інсульту збільшення ендогенної експресії ІФР-1 супроводжується клітинною проліферацією, ангіогенезом, мієлінізацією, нейрогенезом і зменшенням об'єму зони інфаркту [3, 47, 48]. Нейрогенез поряд з ангіогенезом бере участь у функціональному відновленні після інсульту. Ішемічний інсульт стимулює нейрогенез через різні фактори росту (FGF-2, IGF-1, BDNF, VEGF), а також хемокини (SDF-1, MCP-1). Ангіогенез, викликаний інсультом, також регулюється багатьма факторами, такими, як eNOS, CSE, VEGF / VEGFR2, Ang-1 / Tie2 та ін. Останні дослідження показали, що при інсульті, можливо, існує взаємозв'язок нейрогенезу і ангіогенезу [49].

ІФР-1 може ефективно застосовуватися при лікуванні м'язової атрофії, яка викликається інсультом, що супроводжується збільшенням експресії ІФР-1 в ЦНС, зниженням апоптозу клітин кори головного мозку, зростанням активації кортикальної Akt і поліпшенням показників рухової функції [48]. При цьому його захисний ефект не залежить від маркерів запалення, як системних (С реактивний білок і фібриноген), так і локальних (ICAM-1) [50].

ІФР-1 і субарахноїдальний крововилив.

Нетравматичний крововилив у субарахноїдальний простір головного мозку (субарахноїдальний крововилив – САК) найчастіше виникає внаслідок розриву артеріальних аневризм. Гострий аневризмальний субарахноїдальний крововилив (АСАК) є захворюванням, важкість якого зумовлена неврологічним дефіцитом, серцево-судинними, ендокринологічними та психологічними порушеннями. Нейроендокринний дефіцит також впливає на відновлення і реабілітацію після АСАК. Ендокринні порушення, ймовірно, розвиваються через близькість гіпоталамуса і гіпофіза до чутливих судинних структур, які можуть постраждати при гострому АСАК. Гідроцефалія, локальні крововиливи, мікроінфаркти, венозний застій, спазм судин і хірургічні маніпуляції також є можливою причиною дисфункції гіпофіза і/або гіпоталамуса [51].

Дисфункція гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи показана в гострій і пізній фазах АСАК [51-54]. Дефіцит ГР є найбільш поширеною нестачею гормонів гіпофіза у пацієнтів з АСАК [54], що може вплинути на якість життя [55]. При ішемічному інсульті та в патологічних клітинних процесах при АСАК ІФР-1 має потенційний вплив на ріст нейронів, їх загибель, апоптоз і нейромодуляцію [40, 41, 56]. Всі ці механізми також можуть брати участь і в гострій фазі АСАК [56]. Дослідники припускають, що низький вміст ІФР-1 у пацієнтів з ішемічним [10, 35, 57] і геморагічним інсультами вказує на несприятливий прогноз [10].

АСАК впливає на якість життя пацієнта. Він може бути причиною різних тривалих неврологічних дефіцитів, порушень психіки, сну, концентрації уваги, тривоги, депресії, може викликати втому, пригніченість [58]. Ці симптоми, ймовірно, пов'язані з ішемією, яка викликана АСАК, а також з дефіцитом функції гіпофіза [55]. Механізм цих змін повністю не зрозумілий,

але цілком допускає пошкодження судин гіпофіза при інсультах.

У критичному періоді захворювання вміст ІФР-1 в сироватці крові може істотно знижуватися [59]. Основна частина пацієнтів з АСАК має концентрацію ІФР-1 в крові значно нижчу від вікових значень [40, 41, 57]. Це, мабуть, відображає недостатність вироблення ГР гіпофізом або зниження його синтезу печінкою. Враховуючи, що ІФР-1 бере участь у судинних ефектах, він, можливо, буде задіяний і у патофізіологічних процесах, пов'язаних з АСАК [58].

Таким чином, захворювання церебральних судин являють собою важливу проблему. Вивчення механізмів розвитку цереброваскулярної патології має значення для розробки ефективного лікування та нових терапевтичних підходів. Дані досліджень на клітинних культурах, клінічних зразках, трансгенних моделях тварин вказують на те, що ІФР-сигналізація, зокрема ІФР-1, відіграє головну роль у ангиогенезі і судинній регуляції. Порушення в системі ІФР впливають на механізми розвитку та функціонування різних структур головного мозку і судин, що може сприяти розвитку патології ЦНС і церебральних судин. Нейропротекторні стратегії, які сприяють виживанню нейронів при патологічних станах, спрямовані переважно на ослаблення гострого пошкодження. ІФР-1 широко експресується в мозку (нейрони, глія), судинах, впливає на розвиток, захист і виживання клітин при дії патологічних факторів. ІФР-1, маючи нейропротекторні властивості, забезпечує комплексний підхід, послаблюючи клітинну загибель і сприяючи репарації. Очевидно, що система ІФР, зокрема ІФР-1, може розглядатися як терапевтична мішень при лікуванні різних неврологічних захворювань, в тому числі, судинної патології головного мозку. Подальші дослідження, можливо, будуть спрямовані на вивчення терапевтичного потенціалу системи ІФР у модуляції патологічних процесів.

О.Ю. Гарматина

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР РОСТА 1 В УСЛОВИЯХ СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Система инсулиноподобных факторов роста (ИФР) занимает важное место в развитии и росте центральной нервной системы (ЦНС). Экспрессия генов инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и рецепторов ИФР-1 представлена практически во всех отделах головного мозга и в значительной степени сконцентрирована в церебральных сосудах. ИФР-1 участвует в нейрогенезе, ангиогенезе, стимуляции пролиферации клеток и репарации в ответ на повреждение центральной и периферической нервной системы. ИФР-1 оказывает антиоксидантное, противовоспалительное и протекторное действие на ЦНС. В обзоре обсуждаются значение и роль ИФР-1 в сосудистой патологии головного мозга, в частности, при аневризмах, ишемическом инсульте, аневризмальном субарахноидальном кровоизлиянии, а также в нейропротекции.

Ключевые слова: инсулиноподобный фактор роста 1; церебральные сосуды; аневризмы; инсульт; субарахноидальное кровоизлияние.

O.Yu. Harmatina

INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 UNDER CONDITIONS OF THE BRAIN VASCULAR DISEASES

The system insulin-like growth factors (IGF) occupies an important place in the development and growth of the central nervous system (CNS). Gene expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor are represented in all parts of the brain and are heavily concentrated in the cerebral vessels. IGF-1 is involved in neuro-, angiogenesis, in the stimulation of cell proliferation, and repair responses to damage for both the central and peripheral nervous system. IGF-1 exerts antioxidant, anti-inflammatory and protective effects on the CNS. The review discusses the importance and the role of IGF-1 in vascular diseases of the brain, in particular, aneurysms, the ischemic stroke, the aneurysmal subarachnoid hemorrhage, as well as neuroprotection.

Key words: insulin-like growth factor 1; cerebral blood vessels; aneurysms, stroke; subarachnoid hemorrhage.

State Institution "Institute of Neurosurgery named after acad. A.P.Romodanov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv.

REFERENCES

1. D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides*. 2002;36(2-3):209–20.

2. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrinol Rev*. 1999;20:761–87.
3. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocrinol Rev*. 2005;26:916–43.
4. Benarroch EE. Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *Neurol*. 2012;79:2148–53.
5. Rietveld I, Janssen JA, van Rossum EF, Houwing-Duistermaat JJ, Rivadeneira F, Hofman A, Pols HA, van Duijn CM, Lamberts SW. A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but has no effect on the secular trend in body height. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(2):195–203.
6. Åberg D, Jood K, Blomstrand C, Jern C, Nilsson M, Isgaard J, Åberg ND. Serum IGF-I levels correlate to improvement of functional outcome after ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):E1055–64.
7. van Bunderen CC, van Nieuwpoort IC, van Schoor NM, Deeg DJ, Lips P, Drent ML. The association of serum insulin-like growth factor-I with mortality, cardiovascular disease, and cancer in the elderly: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4616–24.
8. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res*. 2003;13:113–70.
9. Zamykal M, Martens T, Matschke J, Günther HS, Kathagen A, Schulte A, Peters R, Westphal M, Lamszus K. Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor involves different context-dependent mechanisms. *Neuro Oncol*. 2015;17(8):1076–85.
10. van Rijn MJ, Slooter AJ, Bos MJ, Catarino CF, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM, van Duijn CM. Insulin-like growth factor I promoter polymorphism, risk of stroke, and survival after stroke: The rotterdam study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2006;77:24–7.
11. Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 87(3):201–23.
12. Godau J, Herfurth M, Kattner B, Gasser T, Berg D. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2010;81:536–8.
13. Knapp J, Teschendorf P, Vogel P, Bruckner T, Böttiger BW, Popp E. Effects of intracerebroventricular application of insulin-like growth factor 1 and its N-terminal tripeptide on cerebral recovery following cardiac arrest in rats. *Resuscitation*. 2013;84(5):684–9.
14. Sara VR, Carlsson-Skewir C, Bergman T, Jornvall H, Roberts PJ, Crawford M, Hakansson LN, Civalero I, Nordberg A. Identification of Gly-Pro-Glu (GPE), the aminoterminal tripeptide of insulin-like growth factor 1 which is truncated in brain, as a novel neuroactive peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 165:766–71.
15. Cacciatore I, Cornacchia C, Baldassarre L, Fornasari

- E, Mollica A, Stefanucci A, Pinnen F. GPE and GPE analogues as promising neuroprotective agents. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(1):13–23.
16. Bondy CA, Lee WH. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. *Functional implications*. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;692:33–43.
17. Bondy CA, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience*. 1992;46:909–23.
18. Bondy CA, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol*. 1990;4:1386–98.
19. Sonntag WE, Lynch CD, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso-Bechtold JK. Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience*. 1999;88:269–79.
20. Cun X, Xie J, Lin S, Fu N, Deng S, Xie Q, Zhong J, Lin Y. Gene profile of soluble growth factors involved in angiogenesis, in an adipose-derived stromal cell/endothelial cell co-culture, 3D gel model. *Cell Prolif*. 2015;48(4):405–12.
21. Sato Y, Okamura K, Morimoto A, Hamanaka R, Hamaguchi K, Shimada T, Ono M, Kohno K, Sakata T, Kuwano M. Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res*. 1993;204:223–9.
22. Foster JA, Rich CB, Miller M, Benedict MR, Richman RA, Florini JR. Effect of age and IGF-I administration on elastin gene expression in rat aorta. *J Gerontol*. 1990;45:B113–8.
23. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*. 1997;138:3515–20.
24. Kulseng B, Myhre HO. Is insulin growth factor-1 (IGF-I) playing a role for aneurysm formation in patients with pituitary gland tumor? *Int Angiol*. 2006;25(4):433–5.
25. Manara R, Maffei P, Citton V, Rizzati S, Bommarito G, Ermani M, Albano I, Della Puppa A, Carollo C, Pavesi G, Scanarini M, Ceccato F, Siculo N, Mantero F, Scaroni C, Martini C. Increased rate of intracranial saccular aneurysms in acromegaly: an MR angiography study and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1292–300.
26. Lindholt JS¹, Martin-Ventura JL, Urbonavicius S, Ramos-Mozo P, Flyvbjerg A, Egido J, Henneberg EW, Frystyk J. Insulin-like growth factor I - a novel biomarker of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42(5):560–2.
27. Panek B, Gacko M, Pałka J. Metalloproteinases, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in aortic aneurysm. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(3):159–64.
28. Akturk IF¹, Biyik I, Yalcin AA, Isiksacan N, Celik O, Ozturk D, Erturk M. Impact of insulin like growth factor-1 in development of coronary artery ectasia. *Bosn J Basic Med Sci*. 2014;14(4):244–9.
29. Hochberg Z, Hertz P, Maor G, Oiknine J, Aviram M. Growth hormone and insulin-like growth factor I increase macrophage uptake and degradation of low-density lipoprotein. *Endocrinology*. 1992;131:430–5.
30. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The Insulin-Like Growth Factor Axis A Review of Atherosclerosis and Restenosis. *Circul Res*. 2000;86:125–30.
31. Binay C, Simsek E, Yıldırım A, Kosger P, Demiral M, Kılıç Z. Growth hormone and the risk of atherosclerosis in growth hormone-deficient children. *Growth Horm IGF Res*. 2015;25(6):294–7.
32. Bennet MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1995;95:2266–74.
33. Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Vaughn C, Mohler J, Li Y, Song YH, Titterton J, Delafontaine P. IGF-I reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2684–90.
34. Johnsen SP, Hundborg HH, Sorensen HT, Orskov H, Tjonneland A, Overvad K, Jørgensen JO. Insulin-like growth factor (IGF) I, -II, and IGF binding protein-3 and risk of ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5937–41.
35. Tang JH, Ma LL, Yu TX, Zheng J, Zhang HJ, Liang Hm, Shao P. Insulin-like growth factor-1 as a prognostic marker in patients with acute ischemic stroke. *PLoS ONE*. 2014;9:e99186.
36. Lioutas VA, Alfaro-Martinez F, Bedoya F, Chung CC, Pimentel DA, Novak V. Intranasal Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 as Neuroprotectants in Acute Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2015;6(4):264–75.
37. Clawson TF, Vannucci SJ, Wang GM, Seaman LB, Yang XL, Lee WH. Hypoxia-ischemia-induced apoptotic cell death correlates with IGF-I mRNA decrease in neonatal rat brain. *Biol Signals Recept*. 1999;8(4-5):281–93.
38. Fernandez AM, Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I modulates c-Fos induction and astrocytosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience*. 1997;76(1):117–22.
39. Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K. Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci*. 2005;25:2838–52.
40. Kooijman R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)- I. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17:305–23.

41. Ribeiro M, Rosenstock TR, Oliveira AM, Oliveira CR, Rego AC. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;74:129–44.
42. Puche JE, Castilla-Cortazar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med.* 2012;10:1–29.
43. Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, De Keyser J. Insulin-Like Growth Factor I: A Potential Neuroprotective Compound for the Treatment of Acute Ischemic Stroke? *Stroke.* 2009;40:e83–8.
44. Madathil SK, Saatman KE. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* Boca Raton (FL): CRC Press. 2015, Chapter 7.
45. Wang J, Tang Y, Zhang W, Zhao H, Wang R, Yan Y, Xu L, Li P. Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia. *FEBS J.* 2013;280:3658–68.
46. Genis L, Davila D, Fernandez S, Pozo-Rodríguez A, Martínez-Murillo R, Torres-Aleman I. Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research.* 2014, 3.
47. Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Tureyen K, Vemuganti R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: Effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem.* 2003;87:586–97.
48. Chang HC, Yang YR, Wang PS, Kuo CH, Wang RY. The neuroprotective effects of intramuscular insulin-like growth factor-I treatment in brain ischemic rats. *PLoS ONE.* 2013;8:e64015.
49. Ruan L, Wang B, ZhuGe Q, Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res.* 2015;1623:166–73.
50. Ruidavets JB, Luc G, Machez E, Genoux AL, Kee F, Arveiler D, Morange P, Woodside JV, Amouyel P, Evans A, Ducimetière P, Bingham A, Ferrières J, Perret B. Effects of insulin-like growth factor 1 in preventing acute coronary syndromes: The PRIME study. *Atherosclerosis.* 2011;218:464–9.
51. Schneider HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Ghigo E, Stalla GK, Agha A. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *JAMA.* 2007;298:1429–38.
52. Aimaretti G, Ambrosio MR, Di Somma C, Fusco A, Cannavo S, Gasperi M, Scaroni C, De Marinis L, Benavenga S, Degli Uberti EC, Lombardi G, Mantero F, Martino E, Giordano G, Ghigo E. Traumatic brain injury and subarachnoid haemorrhage are conditions at high risk for hypopituitarism: Screening study at 3 months after the brain injury. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61:320–6.
53. Brandt L, Saveland H, Valdemarsson S, Sjöholm A, Reinsturp P. Fatigue after aneurysmal subarachnoid hemorrhage evaluated by pituitary function and 3D-CBF. *Acta Neurol Scand.* 2004;109:91–6.
54. Tanriverdi F, Dagli AT, Karaca Z, Unluhircarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Keleştimur F. High risk of pituitary dysfunction due to aneurysmal subarachnoid haemorrhage: A prospective investigation of anterior pituitary function in the acute phase and 12 months after the event. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:931–7.
55. Kreitschmann-Andermahr I, Poll E, Hutter BO, Reineke A, Kristes S, Gilsbach JM, Saller B. Quality of life and psychiatric sequelae following aneurysmal subarachnoid haemorrhage: Does neuroendocrine dysfunction play a role? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:833–7.
56. Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1341–53.
57. Bondanelli M, Ambrosio MR, Onofri A, Bergonzoni A, Lavezzi S, Zatelli MC, Valle D, Basaglia N, Degli Uberti EC. Predictive value of circulating insulin-like growth factor I levels in ischemic stroke outcome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3928–34.
58. Visser-Meily JM, Rhebergen ML, Rinkel GJ, van Zandvoort MJ, Post MW. Long-term health-related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relationship with psychological symptoms and personality characteristics. *Stroke.* 2009;40:1526–9.
59. Baxter RC, Hawker FH, To C, Steward PM, Holman SR. Thirty-day monitoring of insulin-like growth factors and their binding proteins in intensive care unit patients. *Growth Horm IGF Res.* 1998;8:455–63.

Матеріал надійшов до редакції 11.12.2015

ЮВІЛЕЇ



РИБАЛЬЧЕНКО Володимир Корнійович

До 75-річчя з дня народження

Володимир Корнійович Рибальченко народився 5 вересня 1941 р. Після закінчення на відмінно семирічної школи і з відзнакою Звенигородського сільськогосподарського технікуму та пропрацювавши рік на цілині, він у 1961 р. вступив до біологічного факультету Київського державного університету ім. Т.Г. Шевченка. У 1964 р. як кращий студент (стипендія ім. О.О. Богомольця) переведений з Київського університету до Московського державного університету ім. М.В. Ломоносова, де продовжив навчання зі спеціальності біофізика. На той час це була загальна практика у колишньому Радянському Союзі, коли найбільш талановитих студентів різними шляхами скеровували до Москви, де багато з них залишалися назавжди. У 1966 р. він повернувся в Україну і був зарахований на посаду асистента Київського університету, з яким не розлучається протягом усієї своєї наукової і педагогічної кар'єри від асистента до професора і декана факультету. У 1970 р. захистив кандидатську дисертацію за спеціальністю біофізика («Участь іонів кальцію в трансмембранних електричних

процесах клітин гладеньких м'язів»), а у 1988 – докторську за спеціальностями біохімія і фізіологія людини і тварин («Плазматична мембрана гладко-м'язової клітини: активний транспорт кальцію, натрій-кальцієвий обмін і реконструкція іонної провідності»). В 1972-1974 рр. – заступник декана, а в 1978-1979 рр. – декан біологічного факультету. З 1985 р. – професор біологічного факультету, завідувач лабораторії мембранології і головний науковий співробітник та науковий керівник міжфакультетської НДЛ «Біологічно активні речовини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. З 1994 по 2007 р. – завідувач кафедри медичної біології Медичного університету (за сумісництвом).

Творчий доробок В.К. Рибальченка – понад 650 наукових і навчальних праць, у тому числі чотири підручники, два з яких із біологічної хімії, чотири монографії, 12 патентів і авторських свідоцтв на винаходи і 16 навчальних посібників із грифом МОН України. Професор Рибальченко В.К. – один із провідних в Україні та за кордоном вчених-біологів у галузі мембранології й фізико-хімічної біології. Розроблені ним і представниками його наукової школи «Мембранологія» модель молекулярної організації клітинних мембран і механізм безрецепторної міжклітинної сигналізації дають можливість краще зрозуміти значення еволюційно більш давнього типу міжклітинної хімічної сигналізації. Очевидно, до утворення білкових рецепторів у складі мембран міжклітинна хімічна сигналізація відбувалася за участю ліпідів пра-мембран. Цей шлях міжклітинної сигналізації через генералізований ліпідний рецептор не втратив свого значення і на нинішньому етапі еволюційного розвитку живих організмів. За цей доробок та наукові досягнення вчена рада Київського університету двічі нагородила його «Похвальною грамотою» та «Відзнакою» Університету і присудила йому премію

ім. Тараса Шевченка. Окремі з його книг («Биохимическая кинетика», «Молекулярная организация и ферментативная активность биологических мембран», «Структура и функции мембран. Практикум», «Физиология и биохимия пищеварения животных и человека») використовують у навчальних процесах в університетах країн СНД, зокрема у Московському університеті ім. М.В. Ломоносова.

Значним є внесок В.К. Рибальченка у підготовку та атестацію науково-педагогічних кадрів вищої кваліфікації. Він уперше в Україні створив і тривалий час очолював спецраду із захисту докторських дисертацій з цитології, працював вченим секретарем, заступником голови і головою експертної ради з біологічних наук Вищої атестаційної комісії України.

В.К. Рибальченко - керівник 26 кандидатських і консультант 6 докторських дисертацій, є членом кількох спецрад, брав участь в організації і роботі республіканських і міжнародних наукових симпозіумів, конференцій і з'їздів біофізичного, біохімічного, токсиколо-

гічного і фізіологічного товариств України. Є членом редколегій кількох наукових часописів і головним редактором фахового видання «Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології». Його учні працюють в Україні, Польщі, США, Аргентині і Канаді, а сам він завжди з теплотою згадує своїх учителів – керівників курсових, дипломних робіт і кандидатської дисертації: академіків В.О. Беліцера, О.С. Спіріна, С.Є. Северіна і П.Г. Богача.

Визнанням вагомих результатів наукової і педагогічної діяльності професора Рибальченка В.К. є його членство в «International Academy of Cardiovascular Sciences» та звання «Заслужений діяч науки і техніки України».

Цілеспрямованість і воля, принциповість і професіоналізм, порядність і доброзичливість, а також чудове почуття гумору забезпечили Володимирі Корнієвичу Рибальченку заслужений авторитет серед наукової спільноти України та світу. Його особистий внесок у науку сприяв розвитку біохімії й біофізики мембран кінця XX – початку XXI сторіч.

Академіки НАН України

О.О. Кришталь та В.Г. Радченко

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ

IX Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини»

З 12 по 15 травня 2016 р. Міжнародна академія проблем гіпоксії та Національна академія наук України спільно з Науково-дослідним медико-інженерним центром «НОРТ» та Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця у м. Києві провели IX Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини». На 5 засіданнях, що відбулися за ці дні, було заслухано та обговорено 33 доповіді. Більшість з них стосувалася принципів немедикаментозного лікування природними чинниками та інноваційними технологіями, апаратури інструментальних впливів на стан здоров'я людини. У перервах між засіданнями кияни і гості столиці мали можливість ознайомитись з матеріалами стендів (28), автори яких знаходилися поруч, давали пояснення та відповідали на запитання. У збірці тез, що видана трьома мовами за кілька днів до початку симпозіуму, опубліковано 72 праці від авторів з 11 країн.

Перше засідання відкрив академік НАН України, директор Інституту фізіології О.Кришталь. Після нього академік НАН України І.Магура, присвятив свій виступ біофізичним властивостям іонних каналів та індивідуальних нейронів. Доповідь супроводжувалась яскравою демонстрацією та детальним обговоренням проблеми сигнальної активності нейронів за різних умов існування. Наступна доповідь від Харківського Національного університету ім. В.Каразіна стосувалася впливу варіації атмосферної, космічної погоди і геофізичних полів на стан здоров'я людини. Професор Л.Черногор переконливо підтвердив істотність змін фізіологічних реакцій населення за різних погодних умов. З великим інтересом прослухали виступ академіка О.Чалого (від Національного

медичного університету ім.О.О.Богомольця) з інтригуючою назвою «Нові загадкові та унікальні властивості води». Виявилося, що наші знання про цей найбільш вагомий компонент організму тварин та людини вивчений недостатньо і потребує пильної уваги майбутніх дослідників. Присутні мали можливість не тільки задати питання та вислухати відповіді, але й висловити власну думку з піднятих проблем.

Вечірнє засідання 12.05.2016 р. відкрилося доповіддю професора В.Березовського «Парадигма здоров'я людства – інтегральна медицина». Автор проаналізував ступінь забруднення території України та Росії, показав пов'язані з цим захворювання та перспективність використання для їх лікування не тільки лікарських засобів, але й інноваційних біофізичних методів поліпшення стану здоров'я населення. Другою виступила Голова Державного експертного центру МОЗ України О.Матвеева. Вона розповіла про побічну дію лікарських засобів і пов'язані з цим міфи та реалії. Наведено приклади негативного впливу недостатньо вивчених препаратів та засобів посилення контролю за можливими ускладненнями фармакотерапії. Наступну доповідь англійською мовою зробив наш гість з Варшави професор М.Покорський. Вона була присвячена оцінці гіпоксичного впливу на регуляцію зовнішнього дихання. На переконливих прикладах він показав як індивідуальні відмінності чутливості рецепторів на вміст кисню в середовищі, так і можливість істотного функціонального переходу чутливості цих рецепторів на новий рівень. Особливо яскраво ці відмінності виявлено під час тривалого впливу газових сумішей з низьким вмістом кисню порівняно з пере-

ривчастою дією нормобаричної гіпоксії. З великим інтересом було заслухано доповідь професора Х.Мурадяна від Інституту геронтології НАМН України, який поставив перед собою і перед аудиторією питання, чи може штучно керована атмосфера бути фактором прекодиціювання і перепрограмувати плюрипотентні стовбурові клітини? Проведені ним і колективом його лабораторії експерименти дають підстави стверджувати, що штучні газові суміші зі зниженим вмістом кисню і підвищеним вмістом вуглекислого газу можуть бути дієвим інструментом для перепрограмування стовбурових клітин та усунення помилок в їх генетичних програмах. Доповідь та обговорення проведено англійською мовою.

Ще більше цікавості в аудиторії викликав виступ представника Алтайського державного медичного університету (Барнаул) професора В.Кулікова - «Гиперкапническая гипоксия – эффективное средство цитопротекции, профилактики и лечения заболеваний». Понад 20 років тому ним була сформульована гіпотеза, що гіперкапнія потенціює цитопротекторні впливи гіпоксії, а сполучення цих двох факторів – ефективний засіб попередження та лікування хвороб. На щурах комбінований вплив подовжує наявність біоелектричних проявів діяльності мозку до 270 %. Заключна доповідь другого засідання була присвячена антигіпоксантичним ефектам мелатоніну та можливості їх посилення за допомогою дипіридамолу. Роботу виконано у Буковинському державному медичному університеті (Чернівці) професором І.Заморським. В експериментах на щурах показано, що попереднє введення мелатоніну здійснює значний нейропротекторний ефект до дії гострої гіпоксії. Водночас застосування дипіридамолу істотно не впливає на утворення продуктів ліпідної і білкової пероксидації та на активність внутрішньоклітинних Na^+ , K^+ -АТФаз.

Виступом професора О.Яковлевої «Негативна динаміка функціональних тестів погір-

шує прогноз ХОЗЛ (хронічної обструктивної хвороби легенів) при кардіальній коморбідності» (Вінницький НМУ ім. М.Пирогова) відкрилося третє засідання симпозиуму 13.05.2016 р. Другим доповідачем цього засідання став професор В.Валензі (Італія-Швейцарія). Він навів приклади зовнішнього впливу таблетованих лікарських засобів через рецепторні утворення шкіри, без перорального використання. Автор пояснює таку дію квантовими механізмами. Переконливі докази позитивного впливу стимуляційної терапії та гірського клімату на різні варіанти деменції навів професор Дж.Доре (Італія). Особливості реакції центральної гемодинаміки на дію дротаверину в умовах середньогір'я були наведені професором А.Бакуновського (Київ). Дослідженням на культурі мезенхімальних стовбурових клітин людини було присвячено матеріали Л.Плотнікової (Київ), яка виявила можливість прискорювати проліферацію цих клітин за допомогою дозованого зниження парціального тиску кисню.

Вечірнє засідання 13.05.2016 р. відкрив професор Є. Чумаченко (Париж). Його робота була присвячена розробці критерію об'єктивної оцінки ноцицепції та оптимізації знеболювання при травматичних пошкодженнях. Наступним виступив професор А.Гоженко (Одеса). Він висвітлив сучасні уявлення про механізми регуляції водно-сольового гомеостазису, порушення якого бувають причиною різноманітних форм клінічної патології. Анальгетичним ефектом поляризованого світла було присвячено матеріали професора С.Гуляра та З.Тамарової (Київ). Інноваційний матеріал про новий біофізичний метод ранньої діагностики стану печінки (УЗ-стеатометрії) було надано у доповіді О.Динника (Київ-Харків). Не менш цікавий матеріал представили учасники симпозиуму К.Апихтін, В.Петрухін, Ю.Горго (Київ-Москва). Вони показали широкі можливості нового варіанту аналізу варіабельності ритму серця та поліпшення функціонального стану міокарда за допомогою сеансів

інструментальної оротерапії. Синергічному впливу височастотного електрозварювання на структурну впорядкованість тканин було присвячено доповідь професора А.Вазиної (Москва-Київ) та співавторів. Ця технологія вже знайшла своїх прихильників у багатьох країнах. Заключна доповідь цього засідання – «Вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії та автономну нервову систему дітей – мешканців радіаційно забруднених територій» (Л.Лісуха, Київ) переконливо показала позитивну дію інструментальної оротерапії на зменшення радіоактивного забруднення організму та поліпшення якості нервової регуляції метаболічних функцій.

Ранкове засідання 14.05.2016 р. відкрилося лекцією професора А.Тихон (Молдова, Кишинів), присвяченою розгляду проблеми раціонального харчування, як невід'ємного компоненту здорового способу життя. Наступною виступала гостя з Великобританії Т.Вороніна, керівник Лондонської клініки антіейджингу, що протягом багатьох років успішно використовує розроблену в Україні технологію інструментальної оротерапії. Новий варіант аналізу варіабельності серцевого ритму у хворих із супутніми посттравматичними стресовими розладами розробили С.Мостовий та співавт. (Київ). Ця технологія є особливо інформативною для діагностики осіб, постраждалих в АТО. Доповідь професора Ю.Кравченка (Київ) стосувалася аналогічного предмету за умов проведення тесту після тривалої адаптації до гіпоксії. Насамкінець виступив професор С.Харченко (Суми), який проаналізував прогноз смертності від виразкової хвороби залежно від вікового і територіального факторів в Україні. Засідання завершилося загальною дискусією, прийняттям резолюції та процедурою закриття симпозиуму.

У вестибюлі були розташовані експонати сателітної виставки нових приладів та апаратури. Відвідувачі мали можливість здійснити поглиблений автоматичний аналіз електрокардіограми та варіабельності сер-

цевого ритму за новою розробленою в НАН України комп'ютерною програмою детального прогнозування стану міокарда (К.Апихтін, В.Петрухін, Ю.Горго, Москва-Київ). Усі бажаючі (а таких знайшлося дуже багато) мали можливість отримати інструментальну характеристику повноцінності діяльності стану своєї печінки за допомогою нового біофізичного приладу «Стеатометра». Завдяки автоматичному розрахунку коефіцієнта затухання відбитого тканинами печінки ультразвуку, нова технологія дає змогу діагностувати ранні ознаки виникнення ранніх ознак патології органа (О.Динник, Н.Кобиляк, А.Марусенко, Київ-Харків). Учасники зрілого та похилого віку відчули на собі омолоджуючий вплив штучного гірського повітря. Процедуру забезпечував апарат «Борей», виробництва медико-інженерного центру НОРТ НАН України, який за допомогою газоселективних мембран дає можливість людині дихати керованою атмосферою, що відтворює цілющі властивості гірського повітря курортів Швейцарії.

Велику увагу учасників симпозиуму та відвідувачів виставки було привернуто до сучасних розробок відділу клінічної патофізіології Інституту фізіології НАН України – інноваційної технології та пристрою для діагностики стану та якості кісткової тканини «Остеотест» і акустично модульованої магнітотерапії «АММТ-1» (М.Левашов, С.Сафонов, Київ). Крім того, були продемонстровані експериментальні моделі апаратів для акустичного вібромасажу органів дихання «ЕОЛ-М», загальної та локальної аероіоно- та магнітотерапії.

Принципово нові можливості візуального дослідження стану кровоносних судин дна ока людини надає створений Інститутом металофізики ім. Г.Курдюмова НАН України прилад, який користувався максимальною увагою відвідувачів. Відмінність і перспективність цієї апаратури і технології полягає у тому, що вона не потребує використання атропіну для дослідження та усуває можливість

його негативних наслідків на організм. Якщо дослідження з атропіном триває не менше ніж 30 хв, то аналогічне дослідження за допомогою нового приладу завершується протягом 2-3 хв. Це створює можливість підвищувати продуктивність діагностики окулістів. Діяльність апарату демонстрував його винахідник академік І.Плюто. Київський центр «Фунготерапії, аюрведи та біорегуляції» представив цілу лінійку нових препаратів для фіто- і фунготерапії різних захворювань, також апаратуру для оцінки стану фізіологічних систем організму людини і біорезонансної терапії.

Культурна програма здійснювалася на території Зверинецької гори м. Києва у межах ді-

ючого Іонінського монастиря. Під цією горою нещодавно, майже випадково, були відкриті стародавні печери дохристиянського періоду. Екзотична екскурсія у ці печери справила незабутні враження не тільки на іноземних гостей, але й на киян. Всі учасники симпозиуму висловили впевненість у надзвичайній продуктивності обговорення проблем біофізичної медицини та необхідності подальшого регулярного проведення таких зборів.

Видані до початку роботи симпозиуму тези доповідей учасників відкриті для загального доступу на сайті Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця Національної академії наук України - www.biph.kiev.ua.

Оргкомітет

РЕЦЕНЗІЇ

Рецензія на монографію Н.О. Сибірної, А.І. Шевцової, Г.О. Ушакової, І.В. Бродяк та І.Ю. Письменецької “Основи глікобіології”

за ред. проф. Н.О. Сибірної. — Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2015. - 492 с. — (Серія “Біологічні студії”).

Нещодавно видавництво Львівського національного університету випустило книгу “Основи глікобіології”, авторами якої є Н.О. Сибірніа, А.І. Шевцова, Г.О. Ушакова, І.В. Бродяк та І.Ю. Письменецька. У монографії висвітлені основні положення глікобіології, яка є важливою складовою частиною не лише біохімії, а і фізіології, молекулярної та клітинної біології, оскільки вивчає структуру, метаболізм і функції глікокон’югатів та їх похідних, а також біологічне значення в нормі і за патологічних станів. Вивчення закономірностей синтезу та функціонування гліканів, глікозаміногліканів і гліколіпідів, а також ролі у життєдіяльності багатоклітинних організмів є досить актуальним і перспективним напрямком досліджень у різних галузях біологічних наук і тому видання цієї книги в Україні має прогресивне значення.

У монографії представлено сучасні літературні відомості, у тому числі і дані авторів книги, відносно будови та функції глікокон’югатів, білків, що специфічно їх зв’язують, розглянуто механізми глікозилування протеїнів, біосинтезу глікозаміногліканів і процеси деградації глікокон’югатів. Описано спадкові хвороби, що виникають внаслідок порушень цих процесів. Цей матеріал викладено у чотирьох розділах, кожен з яких написаний одним або групою авторів, які є досвідченими фахівцями у конкретному напрямку глікобіології.

Перший розділ присвячений розгляду структурних особливостей гліканів, що входять до складу клітинних глікопротеїнів різних за еволюційною організацією організмів (від архей до еукаріотів), показана

наявність великих розбіжностей у складі олігосахаридів прокаріотів та еукаріотів, що слід враховувати при створенні біотехнологічних препаратів. Аналіз структури N- та O-гліканів, а також особливостей складу глікозилфосфатидилінозитольних послідовностей (якорів) у клітинах еволюційно різних організмів наведено з урахуванням їх функціонального навантаження та включення у розвиток різних патологічних станів. Окремо розглянуто загальні закономірності окремих класів гліколіпідів, глікозаміногліканів та протеогліканів з акцентуванням уваги на їх ролі у розвитку та функціонуванні нервової тканини.

У другому розділі монографії наведені дані стосовно класифікації, структури та функцій лектинів, білків, що специфічно зв’язують глікокон’югати і забезпечують процеси рекогніції, трансдукції сигналу, фолдинг і сортування синтезованих білків. Цей розділ містить також методологічну частину стосовно застосування лектинів, як молекулярних зондів при проведенні наукових досліджень або маркерів різних захворювань (онкологічних, гормональних і генетичних). Особливу увагу приділено протеїнам, що зв’язують глікоаміноглікани, та молекулам міжклітинної адгезії, які забезпечують утворення міжклітинних контактів у тканинах багатоклітинних організмів.

Окремий розділ монографії присвячено узагальненню існуючих на сьогоднішній день даних стосовно механізмів синтезу вуглеводних складових різних глікокон’югатів і ролі кінцевих сіалових кислот у регуляції молекулярних та клітинних взаємодій. Поруч-

шення процесів глікозилювання призводить до розвитку цілої низки захворювань, які клінічно проявляються розвитком мікроаномалій кісткової, нервової і сполучної тканин, причому не завжди ідентифікуються загальноприйнятими лабораторними методами діагностики. У цій книзі наведені вроджені дефекти глікозилювання із зазначенням дефектного гена або протеїну, а також методи лабораторної діагностики таких захворювань і можливі підходи до корекції цих патологій за допомогою сучасних біотехнологічних підходів.

Заслуговує на увагу четвертий розділ, в якому узагальнено сучасні дані відносно ролі глікозилювання протеїнів в асоційованому із ендоплазматичним ретикулулом їх згортання та деградації неправильно згорнутих форм, оскільки процеси фолдингу протеїнів у ендоплазматичному ретикулумі є чутливими до порушення клітинного гомеостазу, що призводить до розвитку стресу ендоплазматичного ретикулума. Цей стрес має важливе значення у функціонуванні клітин як у нормі, так і за патологічних процесів, причому інтерес до цього напрямку глікобіології значно зростає за останні роки у зв'язку з поглибленням знань про роль стресу ендоплазматичного ретикулума у розвитку різноманітних патологій.

У монографії проаналізована велика кількість літературних джерел з різних аспектів глікобіології, причому кількість публікацій стрімко зростає з кожним днем, що свідчить про актуальність такого напрямку досліджень.

Останній розділ монографії містить методологічні підходи до дослідження глікокон'югатів. У ньому описані основні електрофоретичні, імунологічні та хроматографічні методи виділення глікопротеїнів, аналізу їх вуглеводної складової, а також їх мікрогетерогенності, наведені колориметричні методи аналізу глікозаміногліканів у біологічних рідинах. Окремо розглядаються методи дослідження глікокон'югатів із використанням лектинів: лектингісто-, лектинцито- та лектин-ферментний аналіз. Описано також ензиматичне секвенування олігосахаридів і підходи до аналізу їх структури. Слід підкреслити, що певна частина наведених у книзі методів є запатентованими розробками авторів цієї монографії.

Усі розділи монографії містять багато схем та кольорових рисунків, для спрощення сприймання яких наведено чорно-білі та кольорові загальноприйняті символи моносахаридів та приклади запису різних олігосахаридних структур. Монографія "Основи глікобіології" може бути корисною як для біологів, так і клініцистів та фармакологів, а також аспірантів і студентів природничих, медичних, сільськогосподарських та педагогічних університетів, які спеціалізуються в галузі біохімії, фізіології, загальної біології, клінічної медицини та фармакології, а послідовність викладення матеріалу, методологічна спрямованість та ілюстративне оформлення монографії будуть сприяти кращому засвоєнню наведеного матеріалу.

О.Г. Мінченко, д.б.н., проф.,
зав. відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України

CONTENTS

V.G. Sydorenko, O.S. Komarov, B.S. Sushko, A.K. Romanov, E.V. Isaeva, D.S. Isaev. Modulation of 4-aminopyridine-induced neuronal activity and local pO ₂ in rat hippocampal slices by changing the flow rate of the superfusion medium	3
D.V. Osypchuk, V.P. Chernyshov, L.I. Chernysheva, N.P. Kissel, B.V. Dons'koi, I.M. Matvienko, V.P. Rodionov, Yu.A. Makov's'ka. Reduced response of natural killer lymphocytes to Toll-like receptor 3 stimulation in children with recurrent infections	12
S.V. Ziablitshev, S.V. Pishchulina, S.V. Kolesnikova, R.N. Boris, Ya.S. Yuzkiv. Disorders of carbohydrate metabolism in experimental brain injury	18
N. Kolesova, L. Natrus, T. Bryuzhina, V. Lytvynenko, N. Suhareva S. Chukhrai. Pathological changes development in the heart with underlying convulsive syndrome model of various etiologies	23
S.I. Uretii, <u>A.V. Kotsuruba</u> , B.S. Kopyak. Reducing resistance to acid hemolysis by iron-contained drug increases the level of hemoglobin in the erythrocytes of aging animals	31
G. Maleeva, S. Buldakova, P. Bregestovski. Subunit specific modulation of A glycine receptors by ginkgolic acid	40
L.M. Lisukha, V.Ya. Berezovsky. Influence of intermittent normobaric hypoxia on cardiovascular system and hemodynamic parameters of children lived at radiation contaminated territories	46
V.L. Sokolenko. Impact of emotional stress on the immune system indices among residents of radiation contaminated areas	53
T.I. Gavrilenko, N.O. Ryzhkova, O.M. Parkhomenko. Dependence of level of myeloperoxidase of plasma of blood on functional state of neutrophils at acute infarct of myocardium	60
V.P. Feketa, L.A. Gleba, O.S. Palamarchuk, Ju. M. Savka, K.B. Kivezhdi. Correction of heart rate variability using diaphragmatic breathing mode biofeedback in healthy people	66
N.V. Yefimenko, N.O. Sybirna. Effect of L-arginine – NO on prooxidant-antioxidant balance in erythrocytes of rats under alcohol intoxication	76
O Iegorova, O Maximyuk, A Fisyunov, O Krishtal. Voltage-gated calcium channels: classification and pharmacological properties (part I)	84
O.Yu. Harmatina. Insulin-like growth factor 1 under conditions of the brain vascular diseases	95