

Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 3 2014

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Гончаров С.В., Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Пашевін Д.О., Кузьменко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.С.</i> Вплив кверцетину на протеасомну активність в аорті та серці щурів зі спонтанною гіпертензією	3
<i>Шарінов Р.Р., Коцюруба А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф.</i> Індукція оксидативного стресу в мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерону	11
<i>Колесник Ю.М., Колесник М.Ю., Абрамов А.В.</i> Маркери ремоделювання міокарда щурів при артеріальній гіпертензії та експериментальному цукровому діабеті: роль мітохондріальної дисфункції	18
<i>Пашевін Д.О., Гончаров С.В., Тумановська Л.В., Досенко В.С., Мойбенко О.О.</i> Зміни активності трипептидил-пептидази II у тканинах аорти при експериментальному атеросклерозі та артеріальній гіпертензії	27
<i>Максимчук О. В.</i> Вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот на експресію ферментів про- та антиоксидантної системи в печінці щурів	32
<i>Вовкун Т.В., Янчук П.І., Штанова Л.Я., Весельський С.П., Барановський В.А.</i> Зміни у функціонуванні шлунка щура після інтрагастрального введення корвітину в підвищених дозах	38
<i>Вашека І.П., Весельський С.П., Горенко З.А., Грінченко О.А., Карбовська Л.С., Макарчук М.Ю.</i> Вплив амліліну на спектр холатів у жовчі щурів	46
<i>Березовський В.Я., Плотнікова Л.М., Весельський С.П., Літовка І.Г.</i> Життєдіяльність мезенхімальних стромальних клітин за умов зниженого парціального тиску кисню	54
<i>Гаділія О.П., Тимошенко М.О., Дворценко К.О., Остапченко Л.І., Верещака В.В.</i> Вплив 2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію на про- та антиокси- дантний статус у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу	60

<i>Єфіменко О.Ю., Савченко Ю.О., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Щербаков О.Б., Іванов В.К., Жолобак Н.М., Малюкин Ю.В., Співак М.Я.</i> Зміни моторної функції шлунка та товстої кишки у щурів під впливом нанокристалічного діоксиду церію . . .	67
<i>Лунько О.О., Ісаєв Д.С., Максимюк О.П., Кришталь О.О., Ісаєва О.В.</i> Характеристики постійного натрієвого струму в пірамідальних нейронах СА1 зони гіпокампа щурів після обробки протеолітичними ферментами	75
<i>Макарчук В.А., Зеленюк О.В., Ушакова Г.О.</i> Гіалуронатзв'язувальна активність білків мозку та підшлункової залози щурів за умов експериментального хронічного панкреатиту	80
<i>Верещака І.В., Легедза О.В., Дорновський М., Горковенко А.В., Хорєвін В.І.</i> Активність м'язів плечового пояса та плеча при створенні кистю ізометричного зусилля з циклічною зміною його напрямку	89
ПАМ'ЯТНІ ДАТИ	
Ірина Миколаївна Алексєєва	98
Володимир Ярославович Ганіткевич	100

С.В. Гончаров, Г.В. Портніченко, Л.В. Тумановська, Д.О. Пашевін, М.О. Кузьменко, О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко

Вплив кверцетину на протеасомну активність в аорті та серці щурів зі спонтанною гіпертензією

Проведено дослідження протеолітичної активності протеасоми в тканинах аорти та серця щурів зі спонтанною гіпертензією (лінія SHR), а також застосовано кверцетин, що здатний пригнічувати цей мультикаталітичний комплекс. При визначенні активності протеасоми в аорті щурів лінії SHR суттєвих відмінностей порівняно зі щурами лінії Вістар не встановлено. Проте у тканинах серця виявлено суттєво менші значення трипсино- (на 40 %, $P > 0,05$), та хімотрипсиноподібної (в 1,7 раза, $P < 0,05$) активності. Одночасно у щурів лінії SHR виявлені значні морфологічні зміни (фіброз 4,7 % від площі лівого шлуночка, більший індекс маси серця на 21,6 %, а також збільшення товщини інтими в аорті та ширини шарів гладеньком'язових клітин). Відмічалися функціональні порушення діяльності серця: зниження таких показників, як ударний об'єм у 3 рази ($P < 0,0001$), фракція викиду в 2,5 рази ($P < 0,0001$) і підвищення кінцево-діастолічного тиску в 6,5 рази ($P < 0,005$) та кінцево-систолічного тиску на 15 % ($P < 0,004$). Кверцетин ефективно пригнічував трипсино- і хімотрипсиноподібну активність протеасоми в аорті в 2,7 рази ($P < 0,005$) та в 2 рази ($P < 0,003$) відповідно, а також трипсино- (в 2,4 рази, $P > 0,05$) і каспазоподібну (в 9,3 рази, $P < 0,015$) активність у серці, що призвело до значного покращення морфофункціональних показників діяльності серця. Оскільки препарати кверцетину досить широко використовуються у клінічній практиці (особливо при гострому інфаркті), можна рекомендувати їх для запобігання ремоделювання серця при підвищенні артеріального тиску.

Ключові слова: протеасомна активність, артеріальна гіпертензія, аорта, серце, кверцетин.

ВСТУП

Протеасомний протеоліз відіграє важливу роль у патогенезі артеріальної гіпертензії (АГ). Починаючи з робіт японських дослідників [1–3], що вперше встановили антигіпертензивний ефект інгібіторів протеасоми, протягом останніх років проведено дослідження, в яких було доведено значення протеасоми в деградації або модуляції роботи цілої низки білків, що мають безпосереднє відношення до механізмів розвитку АГ [1, 2, 4, 5]. При цьому у деяких працях визначалися зміни активності протеасоми при розвитку АГ. Це було зроблено Такаока та співавт. [3] і Ху та співавт. [4], які встановили підвищення хімотрипсиноподібної активності в аорті при ДОСА-сольовій гіпертензії та при моделю-

ванні АГ за допомогою інфузій ангіотензину II відповідно, а також діабетичної та холестеринової вазопатії. Водночас практично відсутні конкретні відомості про зміни протеасомного протеолізу при спонтанній гіпертензії. Відомо три протеолітичні активності протеасомного комплексу (крім зазначеної вище, ще й трипсино- та каспазоподібна), які за нашими даними [6, 7], можуть змінюватися різною мірою і тому оптимальним є визначення їх усіх. Особливо важливим це є з огляду на можливість заміни конститутивних субодиниць протеасоми на індукційні з формуванням імунопротеасоми, каталітична активність якої і, можливо, субстратна специфічність, суттєво відрізняються [8–10].

Одночасно постає питання про розробку нового, ефективного методу корекції АГ і

© С.В. Гончаров, Г.В. Портніченко, Л.В. Тумановська, Д.О. Пашевін, М.О. Кузьменко, О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко

застосування препаратів із таргетним впливом на компоненти протеасомного комплексу. Проведено дослідження інгібіторів протеасоми при різних моделях [3, 11]. В усіх цих працях встановлена ефективність пригнічення активності протеасоми, що знижувало артеріальний тиск. Однак надзвичайно висока вартість синтетичних інгібіторів протеасоми та велика ймовірність побічних ефектів [12] спонукає до подальшого пошуку інгібіторів протеасоми, зокрема, природного походження. Особливого значення набуває біофлаваноїд кверцетин, здатність якого пригнічувати активність протеасоми встановлена деякими авторами [13, 14], а антигіпертензивні ефекти показано Duarte та співавт. [15].

Мета нашої роботи – визначити зміни активності протеасоми в серці та аорті щурів зі спонтанною гіпертензією, дослідити вплив таблетованої форми кверцетину – квертину на протеолітичну активність протеасоми, а також оцінити функціональні та патогістологічні зміни при спонтанній гіпертензії та її експериментальній терапії.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на щурах-самцях 6-місячного віку ліній Вістар, масою 295 ± 22 г і SHR, масою 294 ± 27 г, які були поділені на три групи: до I – (контрольної) увійшли щури лінії Вістар ($n=8$), до II – щури лінії SHR ($n=8$) та до III – щури лінії SHR ($n=16$), що отримували щодобово таблетовану форму кверцетину – квертин протягом 8 тиж у дозі 15 г/кг. Препарат подрібнювали та домішували до стандартного корму, пресуючи гранули для згодовування щурам. Гіпертензію у щурів лінії SHR підтверджували вимірюванням тиску неінвазивним методом у хвостовій артерії за допомогою Sphygmomanometer S-2 («HSE», Німеччина). Наявність і частоту пульсу реєстрували за допомогою осцилоскопа HM303-4 («NAMEG GmbH», Німеччина). У дослід брали щурів із систолічним тиском понад 150 мм рт.ст.

Через 8 тиж щурів наркотизували уретаном (1,5 г/кг) та визначали гемодинамічні показники. Для цього використовували стандартний 2F-катетер для реєстрації тиску (SPR-838; Millar Instruments, США) калібрували, вводили через праву сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок і записували показники гемодинаміки за допомогою програми ChartTM v.5.4.2 (ADInstruments, Millar Instruments, США). Співвідношення тиску – об'єму лівого шлуночка аналізували за допомогою пакета програм PVAN 3.6 (ADInstruments, Millar Instruments, США).

Насосну функцію оцінювали за комплексом показників: фракція викиду, ударний об'єм, ударна робота, частота серцевих скорочень. Діастолічну функцію досліджували за швидкістю зниження тиску лівого шлуночка (dp/dt_{\min}). Скоротливу активність вивчали за результатами визначенням максимальної швидкості збільшення тиску в лівому шлуночку (dp/dt_{\max}), а також максимальної сили, зрівноваженої на переднавантаження, що є співвідношенням максимальної сили під час серцевого циклу до кінцево-діастолічного об'єму в квадраті [16]. Перед- та постнавантаження серця визначали за кінцево-діастолічним об'ємом та ефективною артеріальною жорсткістю відповідно. Крім того, оцінювали кінцево-систолічний тиск та об'єм, кінцево-діастолічний тиск та об'єм. Для дослідження скоротливої функції серця проводили тимчасову оклюзію нижньої порожнистої вени через невеликий розріз нижче мечеподібного відростка.

Оцінюючи гіпертрофію серця у щурів лінії SHR визначали індекс маси серця (маса серця (міліграми)/маса тіла (грами)). Визначаючи фібротичні зміни в міокарді лівого шлуночка щурів використовували заморожені поперечні зрізи товщиною 10 мкм із чотирьох ділянок серця, які фарбували за методом Ван Гізона із застосуванням фуксин-пікринової кислоти. Морфометричний аналіз аорт щурів різних експериментальних груп включав: оцінку товщини інтими, співвідношення

інтима/медія та тотальної ширини аорти, відстані між двома еластичними мембранами (ширина прошарку ГМК), кількості таких прошарків. Для дослідження ліпідних включень у стінці аорти використовували метод із застосування специфічного для ліпідів барвника Oil Red [6]. Ліпідоз стінок аорти оцінювали як відсоток від загальної площі її поперечного зрізу. Поперечні зрізи як для морфометрії, так і для визначення ліпідозу отримували в 10 різних ділянках дуги аорти кожної дослідної тварини.

Для дослідження хімотрипсино-, трипсино- та каспазоподібної активності протеасоми використовували тканини аорти та серця. Зразок зважували, а потім гомогенізували в тріс-НСІ-буфері (рН 7,4) з розрахунку 0,1 мл/мг тканини. Отриманий гомогенат тканини центрифугували (900 г протягом 10 хв). У супернатанті активність протеасомного комплексу визначали за допомогою специфічного флуорогенного субстрату: сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину, бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину. Проби інкубували із зазначеними субстратами при 37°C протягом 30 хв (при визначенні трипсиноподібної активності) та 60 хв (для двох інших). Флуоресценцію продуктів гідролізу реєстрували за допомогою спектрофлуориметра Hitachi-4000 (Ex/Em – 360/440). Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу додавали селективний інгібітор протеасоми класто лактоцистин β-лактон (5 мкмоль/л), а відсоток зменшення активності гідролізу трактували як активність протеасоми і виражали в мікромолях 7-аміно-4-метилкумарину на 1 г білка за 1 хв.

Усі кількісні показники були проаналізовані на нормальність розподілу за допомогою тесту Колмогорова–Смірнова, відхилень від нормального розподілу не спостерігали ($P > 0,05$). Гомогенність дисперсії (гомоскедастичність) між групами перевірено за допомогою тесту Левайна. У разі рівності

дисперсії ми використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), а у разі гетероскедастичності – тест Уелча та Брауна–Форсайта. Статистично значимі результати вважали при значенні $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження кардіодинаміки дали змогу встановити суттєві відмінності між показниками у щурів групи II порівняно з контролем (таблиця). Серед показників насосної функції серця були вірогідно нижчими такі: ударний об'єм (у 3 рази, $P < 0,0001$), фракція викиду (в 2,5 рази, $P < 0,0001$), а також частота серцевих скорочень (на 12 %, $P = 0,006$). Показники діастолічної функції серця були вищими у щурів лінії SHR: кінцево-діастолічний тиск (у 6,5 рази, $P < 0,005$) та dp/dt_{\min} на 30 %, $P < 0,0001$ (-8526,16 мм рт.ст./с. порівняно з -5962,18 мм рт.ст./с.). Водночас мінімальний тиск і кінцево-сistolічний тиск були нижчими у щурів лінії SHR в 1,5 рази ($P < 0,01$) та на 15 % ($P < 0,004$) відповідно. Це можна пояснити змінами артеріальної жорсткості, яка була у щурів лінії SHR вищою у 4,4 рази ($P < 0,0001$) та показниками розростання сполучної тканини (4,7 % від площі лівого шлуночка серця у тварин II групи порівняно з 0,79 % у контролі). Ймовірно це і спричинювало збільшення індексу маси серця у щурів лінії SHR (на 21,6 % ($3,7 \pm 0,6$ мг/г); ніж у щурів лінії Вістар ($2,9 \pm 0,4$ мг/г) $P < 0,004$). Морфометрія зрізів аорти щурів II групи вказує на значне збільшення товщини інтими, збільшення ширини та кількості прошарків ГМК та відповідно товщини стінки аорти. Спостерігався низький рівень ліпідної інфільтрації стінок аорти (0,48 % від площі досліджуваних поперечних зрізів судини, які були отримані в 10 різних ділянках дуги аорти) у щурів лінії SHR, при повній відсутності ознак ліпідозу в аортах щурів лінії Вістар, що вказує на розвиток початкових атеросклеротичних змін.

Застосування кверцетину дало змогу суттєво нормалізувати низку показників (див.

**Показники кардіогемодинаміки щурів лінії Вістар та SHR,
що отримували кверцетин**

Показник	Щури лінії Вістар (n=8)	Щури лінії SHR (n=16)	Щури лінії SHR, що отримували квертин (n=8)
Ударний об'єм, мкл	239,00±13,5	79,23±7,8*	129,13±9,0**
Серцевий викид, мкл/хв	82776,59±5625,4	23756,19±2385,4*	39085,18±2477,0**
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	650,55±158	526,53±32,9	517,58±11,48
Кінцево-систолічний об'єм, мкл	484,75±19,1	514,99±41,7	472,86±13,5
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	1,93±1,8	12,31±2,4*	0,84±0,5**
Кінцево-систолічний тиск, мм рт.ст.	94,48±1,9	108,33±2,9*	91,03±2,0**
Фракція викиду, %	34,26±1,3	13,91±1,1*	22,33±1,1**
Артеріальна жорсткість, мм рт.ст./мкл	0,44±0,02	1,93±0,2*	0,86±0,07**
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	342,94±9,5	302,28±5,4*	305,42±5,0

* P<0,05 порівняно зі щурами лінії Вістар, ** P<0,05 – зі щурами лінії SHR з SHR, що отримували квертин

таблицю). Насосна функція серця змінювалася: достовірно підвищувались в 1,6 раза ударний об'єм (P<0,002), фракція викиду (P<0,0001), серцевий викид (P<0,0001). Серед показників скоротливої функції серця знижувався кінцево-систолічний тиск (на 16 %, P<0,0001), кінцево-діастолічний – у 15 разів (P<0,0001). Ці зміни знову ж можна пояснити достовірним зниженням артеріальної жорсткості (у 2 рази, P<0,001), зниженням індексу маси серця (до 3,4 ± 0,2 мг/г, P>0,05) та попередженням збільшення товщини стінки аорти, ширини шарів ГМК і товщину інтими. Біофлавоноїд запобігає ліпідозу, знижуючи його відсоток майже удвічі та зменшує прояви фіброзу серця в 2,9 раза (4,7 % від площі лівого шлуночка у тварин II групи до 1,6 % у тварин III групи, P<0,05).

Таким чином, розвиток спонтанної гіпертензії у щурів супроводжується різними морфофункціональними змінами діяльності серця, в основі яких лежить збільшення показників жорсткості міокарда, що призводять до значної діастолічної дисфункції та погір-

шення насосної функції серця (зниження діастолічного наповнення серця, збільшення діастолічного тиску, зменшення ударного та хвилинного об'єму, а також фракції викиду). Морфологічні дослідження вказують на розвиток фіброзу в серці, ліпідозу і потовщення інтими в аорті у щурів лінії SHR. Уперше показано, що використання біофлавоноїду, кверцетину (квертин) гальмує розвиток морфофункціональних порушень у серці й аорті.

При визначенні трипсино-, хімотрипсино- та каспазоподібної активності в тканинах аорти у щурів ліній Вістар та SHR статистичної різниці ми не знайшли, хоча трипсиноподібна активність була нижчою на 18 % (рисунок, I). При дослідженні трипсино- і хімотрипсиноподібної активності у тканинах серця вони були в 1,6 раза нижчі у щурів лінії SHR, лише з тією різницею, що остання статистично вірогідно відрізнялася (P=0,02). Каспазоподібна активність у тканинах серця I та II груп не відрізнялася (див. рисунок, II).

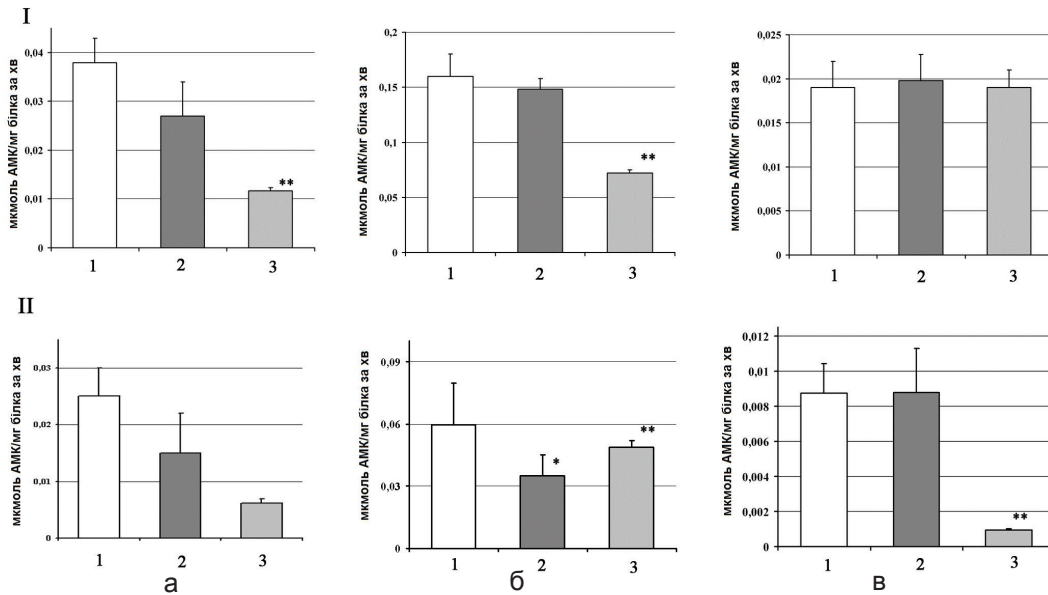
У разі застосування кверцетину (III група) знижувалася трипсино- і хімотрипсинопо-

дібна активність у тканинах аорти в 2,7 рази ($P < 0,005$) та в 2 рази ($P < 0,003$) відповідно. Каспазоподібна активність майже не змінювалася. Трипсино- та каспазоподібна активність у тканинах серця була в 2,4 рази ($P > 0,05$) та в 9,3 рази ($P < 0,02$) нижчими відповідно, а хімотрипсиноподібна активність зростала на 40 % ($P < 0,05$).

Отримані результати певною мірою протирічать даним японських дослідників, які при використанні інших моделей АГ показали суттєве збільшення хімотрипсиноподібної активності протеасоми [3, 4]. Можливо, це пов'язано з тим, що постійне підвищення артеріального тиску у щурів лінії SHR призводить до активності певних компенсаторних механізмів, що дають змогу зберігати активність протеасоми на базовому рівні. Доказовим у цьому аспекті є результати, які ми отримали при застосуванні кверцетину у щурів лінії SHR, трипсино- та хімотрипсиноподібна активність протеасоми значно знижувалися в аорті. Важливо зазначити, що виражений вплив на активність протеасоми супроводжувався зменшенням артеріального тиску та уповільнював розвиток гіпертрофії

серця у щурів зі спонтанною гіпертензією. Порівняння показників гемодинаміки щурів двох ліній вказує на значні відмінності у насосній і скоротливій функціях серця (мінімальний тиск, кінцево-сistolічний і кінцево-діастолічний тиск, ударний об'єм та артеріальна жорсткість). Слід визнати, що ангіопротекторні, антиатерогенні властивості біофлавоноїдів описані багатьма авторами [17–19]. Однак лише в наших працях показано, що протективні властивості кверцетину можуть пояснюватися впливом на протеасомний протеоліз [6].

Загалом, аналіз результатів дає змогу стверджувати, що пригнічення протеасоми може спричинювати антигіпертензивний ефект. Певною мірою це може бути підкріплено даними, в яких йдеться про роль запалення в патогенезі АГ [20, 21], підвищення вмісту прозапальних цитокінів у крові, що описано як синдром системної запальної відповіді (від англ. systemic inflammatory response) [22–24]. Крім того, показано, що активація протеасоми має значення в патогенезі такої відповіді [25]. У цьому аспекті найбільш перспективним, на нашу думку, є застосування препаратів



Активність протеасоми в тканинах аорти (I) та серця (II): а – трипсиноподібна; б – хімотрипсиноподібна; в – пептидилглютаміл пептид-гідролазна. АМК – амінометилкумарин. * $P < 0,05$ порівняно зі щурами ліній Вістар і SHR; ** $P < 0,05$ у порівнянні зі щурами лінії SHR з SHR, що отримували квертин

природного походження, зокрема біофлавоноїдів. Їхніми перевагами є низька токсичність, завдяки еволюційно налагодженим системам біотрансформації та детоксикації, здатність впливати на велику кількість біологічних мішеней (антиоксидантний ефект, пригнічення ліпоксигінази та низки протеїнкіназ), а також невисока вартість.

ВИСНОВКИ

1. Активність протеасоми в аорті щурів лінії Вістар суттєво не відрізнялася від такої у лінії SHR.

2. У тканинах серця щурів лінії SHR трипсино- та хімотрипсиноподібна активність значно менша, ніж у щурів лінії Вістар.

3. У щурів лінії SHR виявлені значні морфологічні зміни: фіброз, збільшення індексу маси серця та товщини інтими.

4. У щурів лінії SHR спостерігалися функціональні зміни діяльності серця: зниження ударного об'єму, фракції викиду, ударної роботи і підвищення кінцево-діастолічного та кінцево-систолического тиску.

5. Кверцетин ефективно пригнічував трипсино- та хімотрипсиноподібну активність протеасоми в аорті та трипсино- і каспазоподібну активність у серці, що призвело до значного покращення морфофункціональних показників діяльності серця.

**С.В. Гончаров, Г.В. Портниченко,
Л.В. Тумановська, Д.А. Пашевін,
М.А. Кузьменко, А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко**

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ПРОТЕАСОМНУЮ АКТИВНОСТЬ В АОРТЕ И СЕРДЦЕ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Для определения роли протеасомного протеолиза в патогенезе артериальной гипертензии проведено исследование протеолитической активности протеасомы в тканях аорты и сердца крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR), а также использовано препарат кверцетина, что способен угнетать активность этого мультикаталитического комплекса. При определении активностей протеасомы в аорте крыс линии SHR существенной разницы по сравнению с животными линии Вистар не установлено. При этом

трипсино- (на 40 %, $P > 0,05$), и химотрипсиноподобная (в 1,7 раз, $P < 0,05$) активность в сердце была существенно меньше. Одновременно у крыс линии SHR выявлены значимые морфологические изменения (фиброз 4,7 % от площади левого желудочка, увеличивался индекс массы сердца выше на 21,6 % ($3,7 \pm 0,6$ мг/г); чем у крыс линии Вистар ($2,9 \pm 0,4$ мг/г; $P < 0,004$), а также увеличение толщины интимы, ширины слоев гладкомышечных клеток. Отмечались функциональные нарушения деятельности сердца: снижение таких показателей, как ударный объем в 3 раза ($P < 0,0001$), фракции выброса в 2,5 раза ($P < 0,0001$) и повышения конечно-диастолического давления в 6,5 раз ($P < 0,005$) также конечно-систолического давления на 15 % ($P < 0,004$). Кверцетин эффективно подавлял трипсино- и химотрипсиноподобную активность протеасомы в аорте (в 2,7 раза, $P < 0,005$) и в 2 раза ($P < 0,003$) соответственно, также трипсино- (в 2,4 раза, $P > 0,05$) и каспазоподобную (в 9,3 раза, $P < 0,02$) активность сердца, что значительно улучшило морфофункциональные показатели сердечно-сосудистой системы. Поскольку препараты кверцетина широко используются в клинической практике (особенно при остром инфаркте), можно рекомендовать этот биофлавоноид для предотвращения ремоделирования сердца при повышенном артериальном давлении.

Ключевые слова: протеасомная активность, артериальная гипертензия, аорта, сердце, кверцетин.

**S.V. Goncharov, G.V. Portnichenko,
L.V. Tumanovska, D.O. Pashevin,
M.O. Kuzmenko, O.O. Moibenko, V.E. Dosenko**

EFFECT OF QUERCETIN ON PROTEASOME ACTIVITY IN THE AORTA AND HEART TISSUES OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

To determine the role of proteasome proteolysis in the pathogenesis of hypertension, we have studied the proteolytic activity of the proteasome in the aorta and heart tissues of rats with spontaneous hypertension (line SHR), and used quercetin, the drug that can inhibit the activity of this multicatalytic complex. In the aorta of SHR, the activities of the proteasome were not significantly different from that observed in Wistar rats. At the same time, in the heart tissues the trypsin-like (at 40 %, $P > 0.05$), and chymotrypsin-like (by 1,7 times, $P < 0.03$) activities were significantly less in SHR. Significant morphological changes (fibrosis of the left ventricle was 4.7 %, aorta intima width was increased and heart weight index was higher by 21,6 % ($3,7 \pm 0,6$ mg/g) compared with Wistar rats ($2,9 \pm 0,4$ mg/g, $P < 0.004$) were observed in these animals functional disorders (reduced stroke volume by 3 times ($P < 0.0001$), ejection fraction by 2.5 times ($P < 0.0001$), increased end diastolic pressure by 6.5 times ($P < 0.005$), end systolic pressure by 15 % ($P < 0.004$)) were revealed. Pharmacological drug "Quercetin" effectively inhibited trypsin-like and chymotrypsin-like proteasome activities

in the aorta (2.7-fold ($P < 0.005$) and 2-fold ($P < 0.003$), correspondingly) and trypsin-like, and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing-like activities (2.4 -fold, $P > 0.05$ and 9.3-fold, $P < 0.02$, correspondingly) activities in the heart, leading to a significant improvement of morphological and functional parameters of the heart. Whereas the drug “Quercetin” that is widely used in clinical practice (especially in therapy of acute myocardial infarction) it could be recommended for the use in prevention of cardiac remodeling with high level of blood pressure.

Key words: proteasome activity, arterial hypertension, aorta, heart, quercetin.

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

REFERENCES

- Okamoto H, Takaoka M, Ohkita M, Itoh M, Nishioka M, Matsumura Y. A proteasome inhibitor lessens the increased aortic endothelin-1 content in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1998; 350(1):11-2.
- Takaoka M, Ohkita M, Itoh M, Kobayashi Y, Okamoto H, Matsumura Y. A proteasome inhibitor prevents vascular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001; 28(5-6):466-8.
- Takaoka M, Okamoto H, Ito M, Nishioka M, Kita S, Matsumura Y. Antihypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats. *Life Sci.* 1998; 63(4): 65-70.
- Xu J, Wang S, Zhang M, Wang Q, Asfa S, Zou MH. Tyrosine nitration of PA700 links proteasome activation to endothelial dysfunction in mouse models with cardiovascular risk factors. *PLoS One.* 2012; 7(1): 29649.
- Ying WZ, Sanders PW. Accelerated ubiquitination and proteasome degradation of a genetic variant of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J.* 2003; 376: 789-94.
- Pashevina DA, Tumanovska LV, Dosenko VE, Nagibin VS, Gurianova VL, Moibenko AA. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacol Rep.* 2011; 63(4): 1009-18.
- Pashevina DO, Dosenko VE, Byts' IuV, Moibenko OO. Antiatherogenic characteristics of korvutin: effect on proteasome activity of the aorta, heart, and blood cells. *Fiziol Zh.* 2009; 55(4): 50-7.
- Gaczynska M, Goldberg AL, Tanaka K, Hendil KB, Rock KL. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17275-80.
- Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell.* 2012; 148(4): 727-38.
- Tanaka K. Molecular mechanism of immunological recognition and the abnormality. *Nihon Rinsho.* 1997; 55(6):1356-62.
- Romero M, Jiménez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaino F, Tamargo J, Vargas F, Duarte J. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010; 627(1-3): 242-50.
- Bockorny M, Chakravarty S, Schulman P, Bockorny B, Bona R. Severe heart failure after bortezomib treatment in a patient with multiple myeloma: a case report and review of the literature. *Acta Haematol.* 2012;128(4): 244-7.
- Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaia LV, Zagorin Vlu, Moibenko AA. The influence of quercetin on the activity of purified 20S, 26S proteasome and proteasomal activity in isolated cardiomyocytes. *Biomed Khim.* 2006; 52(2):138-45.
- Nam S., Smith DM., Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(16): 13322-30.
- Duarte J, Raquel P-P, Vargas F, Ocete M, Francisco P-V, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133: 117-124.
- Takagaki M, McCarthy PM, Chung M, Connor J, Dessoffy R, Ochiai Y, Howard M, Doi K, Kopcak M, Mazgalev TN, Fukamachi K. Preload-adjusted maximal power: a novel index of left ventricular contractility in atrial fibrillation. *Heart.* 2002; 88(2): 170-6.
- Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957:146-61.
- Hollman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl.* 1998; 20: 237-48.
- Ishizawa K, Yoshizumi M, Kawai Y, Terao J, Kihira Y, Ikeda Y, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J Pharmacol Sci.* 2011;115(4): 466-70.
- Haibo Xu, Elizabeth B. Oliveira-Sales, Fiona McBride, Beihui Liu, James Hewinson, Marie Toward, Emma B. Hendy, Delyth Graham, Anna F. Dominiczak, Monica Giannotta, Hidefumi Waki, Raimondo Ascione, Julian F.R. Paton, Sergey Kasparov. Upregulation of junctional adhesion molecule-A is a putative prognostic marker of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2012; 96(3): 552-60.
- Waki H., Hendy E.B., Hindmarch C.C., Gouraud S., Toward M., Kasparov S., Murphy D., Paton J.F. Excessive leukotriene B4 in nucleus tractus solitarius is prohypertensive in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2013; 61(1):194-201.
- Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med.* 1998; 24(11):1131-8.
- Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function,

- inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. Am J Med. 2003; 115:99-106.
24. Wisse BE: The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. J Am Soc Nephrol. 2004; 15(11): 2792-800.
25. Tilahun AY, Theuer JE, Patel R, David CS, Rajagopalan G. Detrimental effect of the proteasome inhibitor, bortezomib in bacterial superantigen- and lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. Mol. Ther. 2010; 18(6):1143-54.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: sergei_goncharov@bigmir.net

Матеріал надійшов до редакції 23.10.2013

Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач

Індукція оксидативного стресу в мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерону

Виходячи з того, що гостра стадія ішемічного інсульту супроводжується розвитком цереброкардіального синдрому на моделі фокальної ішемії–реперфузії головного мозку досліджували оксидативний стрес у мітохондріях серця щурів і можливі механізми кардіопротекторної дії екдистерону. За умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку збільшується швидкість генерації активних форм кисню: супероксидного ($\cdot O_2^-$) та гідроксильного радикалів ($\cdot OH$), пулів стабільного пероксиду водню (H_2O_2). Накопичуються продукти перекисного окиснення ліпідів (дієнові кон'югати та малоновий діальдегід), внаслідок активації ксантиноксидазного (маркер сечова кислота), ліпооксигеназного (маркер лейкотрієн C_4) і циклооксигеназного (маркер тромбоксан B_2) шляхів генерування $\cdot O_2^-$. У тварин, які отримували екдистерон протягом 18 днів зменшувалися швидкість генерації активних форм кисню, пули продуктів перекисного окиснення ліпідів, інгібувалися шляхи генерування $\cdot O_2^-$, зменшується смертність тварин. Отримані результати підтверджують розвиток оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів, потужні антирадикальні властивості екдистерону, його кардіопротекторну дію за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

Ключові слова: фокальна ішемія–реперфузія головного мозку, цереброкардіальний синдром, мітохондрії серця, оксидативний стрес.

ВСТУП

Інсульт головного мозку щороку вражає від 100 до 120 тис. жителів України та належить до найбільш тяжких форм цереброваскулярних захворювань. Гостра стадія ішемічного інсульту супроводжується функціональними порушеннями серцево-судинної системи, які зумовлюють високу ймовірність виникнення патологічних змін у серці [1]. Зокрема, розвиток цереброкардіального синдрому, проявами якого є значне підвищення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран, порушення електрогенезу, патологічні морфологічні зміни кардіоміоцитів, погіршує перебіг ішемічного інсульту [2]. Ступінь гіперперфузії головного мозку корелює з кардіальними порушеннями [1]. ПОЛ, як наслідок розвитку оксидативного стресу в кардіоміоцитах, значною мірою спричинене

цереброкардіальним синдромом, є результатом надмірної генерації активних форм кисню (АФК) у мітохондріях [3]. Окисне пошкодження білкових і ліпідних компонентів внутрішньої мембрани мітохондрій збільшує неспецифічну проникність останньої внаслідок відкриття пори перемінної проникності [4]. Ці процеси ініціюють розвиток апоптозу кардіоміоцитів і порушення функції серця [5]. Відомо, що деякі гормональні препарати, в тому числі стероїдний гормон кальцитріол (гормональна форма вітаміну D_3) [6] мають кардіопротекторну дію. Екдистерон – природний його аналог [7], має потужні антирадикальні та антиоксидантні властивості [6], активує фосфатидилінозитольний [8], сфінгомієліновий [9], а також РІЗК/ПКВ та eNOS/NO сигнальні каскади [10], які є регуляторами апоптозу. Ці власти-

© Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач

вості екдистерону зумовлюють його здатність інгібувати як кальцій-, так і АФК-залежне відкривання мітохондріальної пори перемінної проникності.

Мета нашої роботи – дослідити особливості розвитку оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку та можливі механізми кардіопротекторної дії екдистерону.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 280–320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Тварин поділили на 4 групи по 8 тварин у кожній. Інтактні тварини ввійшли до 1-ї контрольної групи, до 2-ї щури, котрих утримували в стандартних умовах і яким моделювали фокальну ішемію–реперфузію головного мозку оперативним шляхом. Тварини 3-ї та 4-ї груп отримували екдистерон протягом 18 діб 100 мкг/100 г на добу, з питною водою у вигляді препарата «Біоспон», який являє собою екстракт екдистерону з рослини *Serratula coronata* (експериментальне виробництво Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України). Крім того тваринам 4-ї групи оперативно моделювали фокальну ішемію–реперфузію головного мозку.

Оскільки ішемічний інсульт часто викликається оклюзією середньої мозкової артерії або однієї з її гілок, для дослідження було обрано модель ізольованої оклюзії – МСАО (від англ. middle cerebral artery occlusion) [11, 12]. Вона може бути використана для експериментального дослідження ішемічного інсульту тому, що відповідає тромбоемболічному типу останнього [13, 14]. Моделювали ішемічний інсульт під наркозом (внутрішньоочередово вводили розчин кетаміну з розрахунку 75 мг/кг). Під час операції у внутрішню сонну артерію вводили оклюдер, який потрапляв у просвіт передньої мозкової артерії та блоку-

вав середню мозкову артерію. Для оклюзії останньої використовували монофіламентний оклюдер 4/0 («Dossol corp.», США). Моделювання МСАО здійснювали протягом 60 хв, потім його видаляли. Після пробудження тварин перевіряли наявність фокального ішемічно–реперфузійного пошкодження головного мозку. Для цього щура утримували за хвіст на відстані 1–2 см від поверхні. В нормі щури симетрично витягують обидві кінцівки у напрямку до підлоги. При наявності фокального ішемічно–реперфузійного пошкодження головного мозку визначається тонічна флексія контралатеральної передньої лапи. Тварин, у яких цей феномен не спостерігався, в дослід не брали. Визначали відсоток тварин, що вижили протягом 24 год після оперативного втручання в 2-й і 4-й групах, а також біохімічні показники, що характеризують інтенсивність різних шляхів генерації АФК і ПОЛ, у мітохондріях серця тварин усіх груп. Для цього у щурів 1-ї та 3-ї груп, а також через 24 год після фокальної ішемії–реперфузії головного мозку, у тварин 2-ї та 4-ї груп, що вижили, після декапітації виділяли мітохондрії з тканин серця послідовним центрифугуванням гомогенату. Осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при 4 °С. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі. В отриманих мітохондріях досліджували маркери оксидативного стресу, визначаючи швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ (за окисненням цитохрому С) [15], швидкість генерації $\cdot\text{OH}$ (методом окиснення дезоксирибози) [16], вміст H_2O_2 (лактопероксидазним методом) [17]. Також досліджували інтенсивність ліпоксигеназного (маркер лейкотрієн $\text{C}_4 - \text{LTC}_4$), циклооксигеназного (маркер тромбоксан $\text{B}_2 - \text{TxB}_2$) та ксантинооксидазного (маркер сечова кислота) шляхів генерації $\cdot\text{O}_2^-$. Вміст ейкозаноїдів визначали RIA-методом, використовуючи відповідні добірки реактивів фірми „Amersham” (Англія) і «DuPont» (США), сечової кислоти – в колориметричній реакції за допомогою

добірки реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). Інтенсивність неферментативного вільнорадикального ПОЛ оцінювали за вмістом маркерів цього процесу – дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), а також вільного негемового заліза – активатора утворення в реакції Фентона $\cdot\text{OH}$, що є ініціатором ПОЛ. Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при $\lambda=232$ нм гептанових екстрактів проб [18], МДА – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [19], заліза – модифікованим фотометричним методом, використовуючи реактиви фірми «Філісіт-Діагностика». 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

Внаслідок значного інгібування екдистероном генерації АФК (табл. 1), особливо токсичного ініціатора ПОЛ $\cdot\text{OH}$ -радикала, в мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку виживали 100 % тварин 4-ї групи порівняно зі щурами 2-ї групи, які його не отримували (з 8 тварин через 24 год вижило 5 – 62,5 %). Відомо, що фізіологічні дози АФК, згідно з теорією „гормезису” (оксидативний стрес здатний максимально адаптувати захисні сили і адаптивні можливості організму за умов дії стресових чинників), можуть відігравати регуляторну роль в адаптації організму, у тому числі органів серцево-судинної системи, до

змін навколишнього чи внутрішнього середовища. Але також відомо, що за умов патології, в нашому випадку за умов фокальної ішемії–реперфузії, коли утворення АФК збільшується надмірно як в організмі в цілому, так і в міокарді серця, воно є однією з ланок розвитку цереброкардіального синдрому [2, 20]. Через 24 год після моделювання фокальної ішемії–реперфузії в мітохондріях серця щурів спостерігається як значне збільшення генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$, так і надмірне зростання пулів стабільного H_2O_2 (див. табл.1). Це вказує на розвиток оксидативного стресу в мітохондріях і відповідає механізму розвитку цереброкардіального синдрому. При цьому в мітохондріях серця тварин, які отримували екдистерон, спостерігаються як значно менші рівні генерації АФК ($\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$), так і суттєве зниження вмісту H_2O_2 .

Зменшення генерації $\cdot\text{O}_2^-$ у тварин 3-ї групи порівняно з інтактним контролем може свідчити про адаптогенну дію екдистерону в мітохондріях серця за фізіологічних умов [6, 21]. При розвитку оксидативного стресу в мітохондріях серця внаслідок фокальної ішемії–реперфузії він проявив потужну антирадикальну дію, зокрема, інгібуючи всі три досліджені нами шляхи генерації $\cdot\text{O}_2^-$, що підтверджується нижчими рівнями маркерів (табл. 2).

Як відомо, важливими шляхами генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в мітохондріях серця, особливо при оксидативному стресі, є дихальний ланцюг, а також діяльність ксантинооксидази, циклооксигенази, ліпооксигенази тощо. У процесі деградації пуринових нуклеотидів при роботі ксантинооксидази одночасно утворюються $\cdot\text{O}_2^-$

Таблиця 1. Вміст активних форм кисню і H_2O_2 в мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії головного мозку ($\text{M}\pm\text{m}$)

Умови досліджу	$\cdot\text{O}_2^-$, ум. од	H_2O_2 , пмоль/мг білка	$\cdot\text{OH}$, ум. од
Контроль (n=8)	4,61±0,58	4,77±1,64	0,42±0,05
Ішемія–реперфузія (n=5)	15,06±2,11 *	397,32±142,79 *	2,51±0,79 *
Екдистерон (n=8)	2,72±0,61	18,03±8,3	0,56±0,02 *
Екдистерон і ішемія–реперфузія (n=8)	4,56±1,09 **	60,78±10,42 **	0,76±0,14 **

Примітка. У табл.1–3: *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно 2-ї групи.

і сечова кислота. Остання є маркером ксантиноксидазного шляху генерації супероксиду. Вміст сечової кислоти в мітохондріях серця щурів збільшився у тварин 2-ї групи порівняно з контролем ($P < 0,05$; див. табл. 2). У тварин 4-ї групи, достовірно менше зростання вмісту сечової кислоти після фокальної ішемії–реперфузії головного мозку порівняно зі значеннями у тварин 2-ї групи.

Під дією фосфоліпази А2 з фосфоліпідів клітинних мембран відщеплюється арахідонова кислота. Вільна арахідонова кислота в свою чергу може циклооксигеназним шляхом перетворюватися на простагландини та стабільний TxV_2 , а ліпоксигеназним – у лейкотрієни, в т.ч. пептидолейкотрієн LTC_4 .

У тварин 2-ї групи після фокальної ішемії–реперфузії вміст TxV_2 та LTC_4 збільшувалися порівняно з контрольними тваринами ($P < 0,05$; див. табл. 2). У тварин 4-ї групи їх збільшення було достовірно меншим порівняно з показниками тварин 2-ї групи.

Отримані результати вказують, що екдистерону властива інгібуюча дія на всі три досліджені шляхи генерації O_2^- . Зниження ферментативного окиснення вільної арахідонової кислоти та пригнічення генерації O_2^- передбачає не лише можливе інгібування активності ліпідних оксидаз, але і пригнічення гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою А2, тобто здатність екдистерону запобігати пошкодженню мембран мітохондрій міокарда за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

Як відомо, в процесі ПОЛ утворюються

нестійкі гідроперекиси ліпідів, розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних і кінцевих продуктів (ДК, МДА тощо), що є високотоксичними сполуками. Вони не лише негативно впливають на мембрани, але й ініціюють мітохондрійзалежний процес апоптозу пошкоджених клітин внаслідок відкривання мітохондріальної пори. Надмірна активація ПОЛ у мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку може ініціювати набухання мітохондрій з роз'єднанням окисного фосфорилування й інактивацією тіолових ферментів, що беруть участь у диханні та гліколізі [22, 23]. Відомо [9, 21], що екдистерон може уповільнювати ланцюгову реакцію ПОЛ внаслідок зменшення генерації її ініціатора O_2^- , що цілком підтверджують наші результати (див. табл. 1, 3).

У мітохондріях серця тварин 2-ї групи ми отримали (табл. 3) достовірне збільшення вмісту ДК та МДА порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи, які отримували екдистерон, збільшення цих показників після фокальної ішемії–реперфузії головного мозку було достовірно нижчим порівняно зі значеннями у тварин 2-ї групи. У тварин 3-ї групи вміст ДК був навіть нижчим, ніж у 1-й групі ($P < 0,05$; див. табл. 3).

У тварин 2-ї групи вміст вільного заліза в мітохондріях серця на порядок перевищував такий у тварин 1-ї групи, тоді як у тварин 4-ї групи, він зростав в значно меншій мірі (див. табл. 3). Надмірне збільшення пулу вільного заліза в мітохондріях серця за фокальної

Таблиця 2. Вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала в мітохондріях серця щурів за умов ішемії–реперфузії головного мозку ($M \pm m$)

Умови досліджу	Сечова кислота, нмоль/мг білка	Тромбоксан V_2 , пмоль/мг білка	Лейкотрієн C_4 , пмоль/мг білка
Контроль (n=8)	1,17 ± 0,22	1,92 ± 0,65	0,44 ± 0,06
Ішемія–реперфузія (n=5)	18,14 ± 5,56 *	5,48 ± 1,91*	2,61 ± 0,89 *
Екдистерон (n=8)	1,97 ± 0,04	1,49 ± 0,02	0,69 ± 0,02
Екдистерон і ішемія–реперфузія (n=8)	2,62 ± 0,42 **	1,97 ± 0,37 **	0,87 ± 0,14 **

Таблиця 3. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку (M±m)

Умови досліджу	Дієнові кон'югати, нг/мг білка	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	Вільне залізо, пмоль/мг білка
Контроль (n=8)	2,73± 0,58	2,22 ±0,45	50,17 ±7,84
Ішемія–реперфузія (n=5)	27,12 ± 9,51 *	10,07 ±3,42 *	500,78±188,66 *
Екдистерон (n=8)	0,94 ± 0,23 *	1,76±0,25	70,44 ±13,77
Екдистерон і ішемія–реперфузія (n=8)	8,13 ± 0,92 **	3,65 ±0,65 **	123,34 ±48,16 **

ішемії–реперфузії може бути причиною дуже інтенсивного утворення (див. табл. 1) $\cdot\text{OH}$, що є ініціатором ПОЛ, в реакції Фентона, оскільки Fe^{2+} є потужним активатором цієї реакції. Не виключено, що саме більш низький вміст вільного заліза тварин 4-ї групи порівняно з 2-ю зумовлює і значно меншу інтенсивність проходження реакції Фентона, а, отже, і генерації $\cdot\text{OH}$ (див. табл. 1) і, як наслідок, процесу ПОЛ (див. табл. 3). Це може бути одним з важливих біохімічних механізмів кардіопротекторної дії екдистерону за фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

ВИСНОВКИ

1. Попереднє профілактичне введення екдистерону призводило до 100 % виживання тварин після фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

2. У мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку розвивається оксидативний стрес, що підтверджується багаторазовим збільшенням генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$, а також значним збільшенням пулів стабільного H_2O_2 в мітохондріях, при цьому значно активуються ксантиноксидазний, циклооксигеназний та ліпооксигеназний шляхи генерації $\cdot\text{O}_2^-$, підтвердженням чого є збільшення концентрації сечової кислоти, TxB_2 та LTC_4 як маркерів цих процесів.

3. За умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку в мітохондріях серця значно зростає інтенсивність ПОЛ, про що

свідчить підвищення пулів ДК і МДА внаслідок активації генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала, що є ініціатором ПОЛ, в реакції Фентона, на що вказує збільшення вмісту вільного заліза, каталізатора цієї реакції, в мітохондріях.

4. Попереднє введення екдистерону суттєво зменшує прояви оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів з фокальною ішемією–реперфузією головного мозку. Це супроводжується пригніченням генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$, зменшенням пулу стабільного H_2O_2 в мітохондріях серця внаслідок інгібування ксантиноксидазного, циклооксигеназного та ліпооксигеназного шляхів генерації $\cdot\text{O}_2^-$, що пригнічує ПОЛ в мітохондріях серця та підтверджує потужні антирадикальні властивості екдистерону та його кардіопротекторну дію.

Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач

ИНДУКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА ВО ВРЕМЯ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКДИСТЕРОНА

Исходя из факта, что острая стадия ишемического инсульта сопровождается развитием церебробкардиального синдрома, проявляющегося оксидативным стрессом, накоплением продуктов перекисного окисления липидов в кардиомиоцитах, морфофункциональные изменения в миокарде, на модели фокальной ишемии–реперфузии головного мозга исследовали оксидативный стресс в митохондриях сердца крыс и возможные механизмы кардиопротекторного действия экдистерона. В условиях фокальной ишемии–реперфузии головного мозга увеличивается скорость генерации активных форм кислорода:

супероксидного (O_2^-) і гидроксильного радикалов ($\text{OH}\cdot$), пулов стабільного пероксида водорода (H_2O_2). Накапливаються продукти перекисного окислення ліпидов (диеновые коньюгаты і малоновий діальдегід), вследствие активации ксантинооксидазного (маркер мочева кислота), ліпооксигеназного (маркер лейкотриєн C_4) і циклооксигеназного (маркер тромбоксан B_2) путей генерирования O_2^- . У животних, получавших ектистерон в течение 18 сут, в условиях фокальної ішемії–реперфузії головного мозга, наблюдалось уменьшение скорости генерации активных форм кислорода, ингибирование путей генерирования O_2^- , уменьшились пулы продуктов перекисного окислення ліпидов, выросла выживаемость животных. Полученные результаты подтверждают развитие оксидативного стресса в митохондриях сердца крыс, мощные антирадикальные свойства ектистерона, его кардиопротекторное действие, в условиях фокальної ішемії–реперфузії головного мозга. Ключевые слова: фокальная ішемія–реперфузія головного мозга, цереброкардіальний синдром, митохондрії серця, оксидативний стресс.

R.R. Sharipov, A.V. Kotsiuruba, B.S. Kopyak, V.F. Sagach

INDUCTION OF OXIDATIVE STRESS IN HEART MITOCHONDRIA OF BRAIN FOCAL ISCHEMIA-REPERFUSION AND PROTECTIVE EFFECT OF ECDYSTERONE

Based on the fact that the acute phase of ischemic stroke is accompanied by the development of heart damage, manifestations of which are oxidative stress, morphological changes in the myocardium, in the model of brain focal ischemia – reperfusion, we investigated the oxidative stress in rat heart mitochondria and possible mechanisms of cardioprotective effect of ecdysterone. Under the conditions of brain focal ischemia – reperfusion, there is an increase rate of the generation of reactive oxygen species: superoxide (O_2^-) and hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$), pools of stable hydrogen peroxide (H_2O_2), accumulate products of lipid peroxidation (diene conjugates and malonic dialdehyde), as a result of activation xanthine oxidase (marker uric acid), lipoxygenase (marker leukotriene C_4) and cyclooxygenase (marker tromboxane B_2) ways of O_2^- generating. In animals that received ecdysterone for 18 days, under conditions of brain focal ischemia – reperfusion, the rate of reactive oxygen species generation and the pools of lipid peroxidation products were decreased, and the survival of animals was increased. The obtained results support the development of oxidative stress in heart mitochondria of rats, powerful antiradical properties of ecdysterone, its cardioprotective effect, in conditions of brain focal ischemia - reperfusion.

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

REFERENCES

1. Dolgov AM. Tserebrokardialny syndrome in ischemic

- stroke. Herald of intensive therapy 1995;(2):15-18. [In Russian].
2. Zhdanov GN, Gerasimov MM. Studying the content of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the serum of patients with acute phase of ischemic stroke. Cytokines and Inflammation 2006;5(1):27-30. [In Russian].
3. Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. Oncogene. 2000;19(2):307-314.
4. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK et al. Calcium and mitochondria. FEBS Lett. 2004;567(1):96-102.
5. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(4):414-419.
6. Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. J Insect Sci. 2003;3(7):1-30.
7. Tóth N, Hunyadi A, Báthori M, Zádor E. Phytoecdysteroids and Vitamin D Analogues – Similarities in Structure and Mode of Action. Curr. Med. Chem. 2010;17(18):1974-1994.
8. Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Mehed' OF et al. The (27)-steroid hormones ecdysterone and calcitriol activate the phosphoinositol cycle in its membrane phase / Ukr Biokhim Zh. 1999;71(1):27-32. [In Ukrainian].
9. Kotsyuruba AB, Bukhanevich OM, Tuganova AB and Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Identification of sphingomyelin as the effector mechanism of the early effect. Ukr Biokhim Zh. 1995;67(2):53-58. [In Ukrainian].
10. Sagach VF, Korkach YP, Kotsyuruba AV et al. Inhibition of opening mitochondrial pore by ecdysterone in the heart of old rats / Fiziol Zh. 2008;54(4):3-10. [In Ukrainian].
11. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. ILAR J. 2003;44(2):85-95.
12. Smrcka M, Otevrel F, Kuchtickova S et al. Experimental model of reversible focal ischemia in the rat / Scripta medica (BRNO) 2001;(74):391-398.
13. Hossmann K-A. Animal models of cerebral ischemia. I. Review of literature. Cerebrovasc Dis. 1991;1:2-15.
14. Takizawa S, Hakim AM. Animal models of cerebral ischemia. Rat models. Cerebrovasc. Dis. 1991;1:16-21.
15. Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B et al. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. J Biol Chem. 1996;271(9):5125-5130.
16. Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. Biochemistry. 1998;37(2):552-557.
17. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. Biochem J. 1982;203(3):551-8.
18. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. Lab

- Work. 1988;(2):60-64. [In Russian]
19. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 1978;86(1):271-278.
 20. Mayer SA, Lin J, Homma S et al. Myocardial injury and left ventricular performance after subarachnoid hemorrhage. Stroke. 1999;30(4):780-786.
 21. Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Tuhanova AV, Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Modulation of intracellular pools of arachidonic acid and products of its oxidative metabolism. Ukr Biokhim Zh. 1995;67(2):45-52. [In Ukrainian].
 22. Gusev EI, Skvortsova VI, Kovalenko AV, Sokolov MA. Mechanisms of brain tissue damage in acute focal cerebral ischemia. Zh Nevrol Psikhiatr. 1999;99(2):65-70. [In Russian].
 23. Tarasov NI, Tepliakov AI, Malakhovich EV et al. State of lipid peroxidation, blood antioxidant defense in patients with myocardial infarction aggravated by circulatory insufficiency. Ter Arkh. 2002;74(12):12-15. [In Russian].

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
Egiptian77@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.03.2014*

Ю.М. Колесник, М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов

Маркери ремоделювання міокарда щурів при артеріальній гіпертензії та експериментальному цукровому діабеті: роль мітохондріальної дисфункції

Досліджували експресію кардіотрофіну-1, анексину V, тайтину та колагену I типу в міокарді щурів лінії Вістар (контроль), а також у щурів зі спонтанною гіпертензією та з експериментальним цукровим діабетом і без нього. На мітохондріях, ізольованих із тканини серця, вивчали проникність мітохондріальної пори під впливом Ca^{2+} . Встановлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією та супутнім діабетом питомих вміст кардіотрофіну-1, анексину V та колагену I типу у міокарді був достовірно вищим порівняно зі значеннями у контрольних щурів і щурів з гіпертензією без діабету. Питомий вміст тайтину був на 27 % нижчим у тварин з гіпертензією та діабетом, ніж у щурів зі спонтанною гіпертензією без діабету. Вказані зміни експресії кардіотрофіну-1, анексину V, тайтину та колагену I типу асоціювалися з найбільшою чутливістю мітохондріальної пори до Ca^{2+} у щурів зі спонтанною гіпертензією та супутнім цукровим діабетом.

Ключові слова: кардіотрофін-1, анексин V, тайтин, колаген I типу, мітохондріальна пора, міокард, щури, гіпертензія, цукровий діабет.

ВСТУП

Артеріальна гіпертензія залишається одним з найбільш поширених захворювань і відіграє провідну роль у структурі загальної та кардіоваскулярної смертності [1]. Старіння населення у всьому світі, збільшення тривалості життя змушує розглядати цю проблему крізь призму коморбідних станів. У клінічній практиці гіпертензія часто поєднується із цукровим діабетом, що значно погіршує прогноз [2]. Обидва захворювання тісно пов'язані між собою спільними патогенетичними механізмами, ключовими з яких є інсулінорезистентність, активація симпатичної та ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, прозапальна активація, оксидативний стрес тощо [3–6]. Одним з ключових органів ураження при обох захворюваннях є серце [7]. Патологічне ремоделювання серцевого м'яза полягає у формуванні гіпертрофії та розвитку інтерстиціального фіброзу, переважно за

рахунок накопичення колагену I та III типу, а також ініціації процесів апоптозу кардіоміоцитів. Ці зміни є морфологічним підґрунтям до формування діастолічної дисфункції та потенціально злоякісних аритмій [8, 9]. Важливим аспектом досліджень є пошук адекватних маркерів, що характеризують фундаментальні процеси патологічного ремоделювання міокарда. Вони повинні відповідати наступним вимогам: мати кардіальне походження, відображувати певний патологічний процес, бути прогностично значущими та чутливими до впливу антигіпертензивної терапії [10].

Переважаюча частина досліджень формування міокардіального фіброзу присвячена процесам синтезу та деградації колагену I і III типу та активації системи матричних металопротеїназ [11–14]. Але в останні роки активно вивчається роль гігантського білка тайтину, що контролює пружність міокарда та є регулятором адаптаційної відповіді на зміни екстрацелюлярного матриксу. Тайтин формує

третю філаментну систему в міофібрилах разом з актином та міозином. Існують дані, що збільшення міокардіальної жорсткості при гіпертензії та діабеті є результатом координованих змін вмісту колагену та тайтину [15].

Серед перспективних маркерів, що відображає процеси гіпертрофії при гіпертензії та діабеті, розглядається кардіотрофін-1 [16, 17]. Цей представник сімейства інтерлейкіну-6 здатен стимулювати гіпертрофію та гіперплазію кардіоміоцитів. Експресія кардіотрофіну-1 збільшується у відповідь на розтягнення камер серця та підвищену міокардіальну жорсткість ще до реакції системи натрійуретичних пептидів.

Формування “гіпертензивного” серця включає також ранню ініціацію процесу апоптозу. Високоспецифічним маркером ідентифікації кардіоміоцитів, що знаходяться у стані апоптозу, розглядається анексин V. Він має високу афінність до фосфатидилсерину, який експресується на поверхні апоптотичних клітин. Його транслокація з внутрішньої до зовнішньої мембрани кардіоміоцита є однією з найбільш ранніх стадій апоптозу.

Одним з головних «диригентів» ремоделювання міокарда при поєднанні діабету та гіпертензії вважається мітохондріальна дисфункція [18, 19]. У деяких працях було показано, що системне підвищення артеріального тиску може бути результатом енергодефіциту [20, 21]. Важливим регулятором діяльності мітохондрій є гігантська пора. Вона являє собою високоселективний потенціалзалежний іонний канал внутрішньої мембрани мітохондрій діаметром 3 нм [22]. Перевантаження кальцієм призводить до відкриття пори, роз'єднання процесу окисного фосфорилування. У результаті відбувається надлишкове надходження води до мітохондрій, їх набрякання та розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани з виходом проапоптотичних факторів у цитозоль. Вважається, що мітохондрії беруть участь у ключових патологічних процесах, що зумовлюють морфофункціональний стан міокарда при

гіпертензії та діабеті, а саме – гіпертрофії, апоптозі та інтерстиціальному фіброзі. Проте ця проблема вивчена недостатньо.

Метою нашої роботи стало вивчити експресію маркерів гіпертрофії, фіброзу та апоптозу у щурів зі спонтанною гіпертензією та експериментальним цукровим діабетом, а також з'ясувати можливу роль мітохондріальної дисфункції в цих процесах.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Запорізького державного медичного університету. Експериментальних щурів-самців було розподілено на три групи по 10 тварин у кожній. До I групи (контроль) ввійшли щури лінії Вістар масою 220–270 г, до II – щури зі спонтанною гіпертензією (SHR), масою 220–300 г, до III – щури лінії SHR, масою 220–300 г у яких моделювали цукровий діабет одноразовим інтраперитоніальним введенням стрептозоточину у дозі 50 мг/кг, розчиненого у 1 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) після 12-годинного голодування. Протягом першої доби щурів III групи поїли 20%-м розчином глюкози, а протягом другої – 10%-м. Дослідження проведено згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідженнях», що узгоджені з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей».

У всіх тварин вимірювали систолічний артеріальний тиск методом плетизмографії за допомогою прилада Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series («Transonic Systems Inc.», США). Реєстрацію проводили тричі.

Після декапітації тварин під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) виділяли фрагменти міокарда, переважно з верхівки серця. Мітохондріальну фракцію отримували методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30K («Sigma

Laborzentrifugen GmbH», Німеччина) при 4 °C [23]. Спочатку гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g для осадження клітинних фрагментів, а потім 15 хв при 11000 g. Для реєстрації відкриття мітохондріальної пори вносили суспензію мітохондрій до інкубаційної суміші, що складалася з (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 0,5, глутамату – 2, малату – 1, тріс-НСІ-буфера – 20 (рН 7,4). Процес відкриття пори досліджували спектрофотометричним методом на приладі Libra S32 PC («Biochrom Ltd.», Велика Британія). До інкубаційного середовища вносили 50 мкмоль/л Ca^{2+} . Інтенсивність процесу відкриття мітохондріальної пори характеризували зниженням оптичної щільності досліджуваних зразків (DE).

Дослідження маркерів міокардіального фіброзу, гіпертрофії та апоптозу проводили методом імуногістохімії. Фрагменти лівого шлуночка тварин фіксували у рідині Буена та після гістологічної обробки заливали у парапласт («McCormick», США). На ротатійному мікромомі Microm-325 («Microm Corp.», Німеччина) отримували серійні зрізи з різних відділів лівого шлуночка товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували та демаскували в РТ-модулі («Thermo Scientific», США) у цитратному буферному розчині («Thermo Scientific», США).

Для визначення експресії колагену I типу та тайтину гістологічні зрізи інкубували з мишачими моноклональними антитілами («Abcam», США) у розчині 1:1000 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Потім інкубували з овечими антитілами до імуноглобуліну G (IgG) миші, кон'югованими з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш гліцерин–фосфатний буфер (9:1).

Для визначення вмісту кардіотрофіну-1, що є потужним індуктором гіпертрофії міокарда, проводили інкубацію зразків з кролячими поліклональними антитілами («Novus Biologicals», США) у розведенні 1:200 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Як вторинні

антитіла використовували козячі антитіла до IgG кролика, які були кон'юговані з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш «гліцерин/фосфатний буфер» (9:1).

При дослідженні клітинної загибелі через апоптоз інкубували зразки міокарда з кролячими поліклональними антитілами до анексіну V («Abcam Inc.», США) у розведенні 1:200 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Потім проводили інкубацію з козячими антитілами до IgG кролика, кон'югованими з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш гліцерин–фосфатний буфер (9:1).

Гістологічні зрізи досліджували в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією («Carl Zeiss», Німеччина) на мікроскопі AxioImager-M2 («Carl Zeiss», Німеччина). Зображення отримували з відеокамери AxioCam-5HRm («Carl Zeiss», Німеччина) та записували у вигляді комп'ютерного файлу з наступною обробкою системою цифрового аналізу зображення AxioVision 4.8.2 («Carl Zeiss», Німеччина, № ліцензії KONS18473).

Для кожного із маркерних білків (тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексіну V) у кожній експериментальній серії досліджували не менше ніж 100 відеокадрів, в яких в автоматичному режимі виділялися зони зі статистично значущою флюоресценцією, після математичної обробки яких статистичному аналізу піддавали такі показники:

1) питома площа матеріалу, імунореактивного до маркерного білка, відносно площі міокарда у відеокадрі. Цей показник відображує інтенсивність експресії досліджуваних маркерів у міокарді;

2) інтенсивність флюоресценції імунореактивного матеріалу в умовних одиницях флюоресценції, яка відображує концентрацію маркерного білка у міокарді;

3) питомий вміст досліджуваних маркерних білків у міокарді, який розраховувався як множина питомої площі імунореактивного ма-

теріалу та інтенсивності її флюоресценції. За цим показником можна оцінювати загальний рівень експресії маркерного білка у міокарді.

Для характеристики фібротичних змін у міокарді додатково розраховували тайтин/колагеновий коефіцієнт, як співвідношення питомого вмісту тайтину в міокарді до питомого вмісту колагену I типу.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакету програм «Statistica 6.0» («StatSoft», США, № ліцензії AXXR712D833214FAN5). Порівняльний аналіз у групах проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з використання критерію Н'юмена-Кейлса *post hoc*. Статистично значущими вважали відмінності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Значення систолічного артеріального тиску у щурів лінії Вістар становило 126 ± 3 мм рт.ст., а у щурів лінії SHR – 155 ± 5 мм рт.ст. ($P < 0,05$).

При дослідженні міокардіального фіброзу було зареєстровано, що питомий вміст колагену I типу був вдвічі вищим у щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з контролем. А у щурів зі спонтанною гіпертензією з експериментальним цукровим діабетом (III група) цей показник збільшувався майже у 5 разів (таблиця).

Важливим чинником формування надлишкового фіброзу при діабеті є глікозування колагену, що робить його стійким до протеолізу [24]. Також гіперглікемія здатна підвищувати експресію ангіотензину-II, β -трансформуючого фактора росту, знижувати активність матриксних металопроїназ, що впливають на стан екстрацелюлярного матриксу [25]. Дія глюкози збільшує експресію генів колагену I, III та VI типу у кардіальних фібробластах, а також впливає на їх міграцію, проліферацію та диференціацію [26]. Внаслідок цього збільшується міокардіальна жорсткість, що призводить до порушення діастолічної функції міокарда.

Проте формування міокардіального фібро-

Показники експресії тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексіну V в міокарді щурів ($M \pm m$)

Показник	Контроль (I група)	Щури зі спонтанною гіпертензією (II група)	Щури зі спонтанною гіпертензією та діабетом (III група)
Площа флюоресценції до тайтину, %	100 \pm 1,6	123,6 \pm 0,9*,***	102 \pm 0,97
Інтенсивність флюоресценції тайтину, %	100 \pm 5,26	126,3 \pm 4,2*,***	110,5 \pm 5,26
Питомий вміст тайтину, %	100 \pm 4,98	152,9 \pm 5,11*,***	111,6 \pm 4,8
Площа флюоресценції до колагену I типу, %	100 \pm 7,5	135 \pm 6,25*	140 \pm 6,05*
Інтенсивність флюоресценції колагену I типу, %	100 \pm 5,88	132,3 \pm 2,94*,***	323 \pm 2,94*,**
Питомий вміст колагену I типу, %	100 \pm 10,6	205,2 \pm 13,2*,***	506,6 \pm 25,9*,**
Тайтин/колагеновий коефіцієнт, %	100 \pm 5,3	74,3 \pm 4,8*,***	22,1 \pm 1,85*,**
Площа флюоресценції до кардіотрофіну-1, %	100 \pm 1,43	142,8 \pm 1,43*,***	126,9 \pm 1,76*,**
Інтенсивність флюоресценції кардіотрофіну-1, %	100 \pm 2,16	122,3 \pm 4,31*,***	270,5 \pm 12,2*,**
Питомий вміст кардіотрофіну-1, %	100 \pm 3,03	118,3 \pm 4,63***	315 \pm 13,3*,**
Площа флюоресценції до анексіну V, %	100 \pm 1,15	111,5 \pm 1*,***	128,8 \pm 0,65*,**
Інтенсивність флюоресценції анексіну V, %	100 \pm 3,17	119 \pm 3,97*	119 \pm 4,76*
Питомий вміст анексіну V, %	100 \pm 3,1	107 \pm 3,4	110,4 \pm 4,3

Примітка. Результати представлено у відсотках відносно контролю (100 %). * $P < 0,05$ щодо контролю, ** $P < 0,05$ щодо значень щурів II групи, *** $P < 0,05$ щодо значень щурів III групи.

зу є досить складним процесом. Дослідженнями останніх років встановлено важливу роль гігантського білка тайтину, що контролює пружність міокарда. Його молекули, перекриваючи відстань від М-лінії до Z-диска, формують третю філаментну систему в міофібрилах. У міокарді тайтин має дві ізоформи - N2BA и N2B, що відрізняються ступенем пружності (у співвідношенні 30:70 у нормі). За нашими результатами, у щурів лінії SHR без діабету (II група) зареєстровано достовірне збільшення площі, інтенсивності флуоресценції та питомого вмісту тайтину у міокарді порівняно з контролем. Водночас при моделюванні цукрового діабету вказані параметри не відрізнялися від контрольних значень. А питомий вміст тайтину у щурів лінії SHR з діабетом (III група) був нижчим, ніж у щурів зі спонтанною гіпертензією (II група; див. таблицю). Раніше Ge та співавт. [27] зафіксували зниження експресії мРНК тайтину у “нормотензивних” щурів лінії Sprague-Dawley із стрептозотоциніндукованим діабетом. Взаємовідношення колагену і тайтину, їх вплив на міокардіальну жорсткість є недостатньо вивченими. Вважається, що тайтин контролює розтягнення міофібрил у фізіологічних межах, а колаген перешкоджає надмірному розтягненню міокарда. Нами було запропоновано коефіцієнт співвідношення між питомим вмістом тайтину та колагену I типу, який засвідчив найбільшу схильність до прогресування фібротичних змін у III групі щурів. Поступове зниження загального вмісту тайтину призводить до маніфестації серцевої недостатності, а на більш ранніх стадіях хвороби змінюється тільки ізоформний склад цього протеїну [28]. Так, Wagen [29] виявив зменшення вмісту розтяжної N2BA-ізоформи тайтину у щурів лінії SHR. Дослідження щодо впливу фіброзу на стан та ізоформний склад тайтину є суперечливими. У праці Chung та співавт. [30] у експериментальних мишів з генетично дефектним тайтином міокардіальна жорсткість збільшувалася незалежно від вираженості

фіброзу, що оцінювали за рівнем експресії колагену I типа. Автори дійшли висновку, що для збільшення жорсткості міокарда вже є достатнім ізольоване порушення функціонування тайтину. Інші дослідники вважають, що зміни тайтину є адаптаційною відповіддю на зміни екстрацелюлярного матриксу. У праці Makagenko та співавт. [28] зниження загального вмісту та переважання більш розтяжної N2BA-ізоформи білка при ішемічній кардіоміопатії асоціювалося з надлишковим накопиченням колагену та десміну.

Формування гіпертрофії є першим компенсаторним механізмом адаптації до збільшеного судинного опору при гіпертензії. На клітинному рівні цей процес характеризується збільшенням розмірів кардіоміоцитів. Кардіотрофін-1 секретується кардіоміоцитами та фібробластами у відповідь на біомеханічний стрес і під впливом ангіотензину-II. Після взаємодії із гетеродимерним рецепторним комплексом «глікопротеїн g130/рецептор фактора інгібіції лейкемії» кардіотрофін-1 активує різні сигнальні шляхи росту кардіоміоцитів. За нашими результатами у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом реєструвалася найбільша експресія кардіотрофіну-1. Питомий вміст цього ліганда перевищував у 3,15 раза значення у контрольних тварин та в 2,67 раза – у щурів зі спонтанною гіпертензією. Pemberton та співавт. [31] продемонстрували, що у щурів лінії SHR тканинна концентрація кардіотрофіну-1 була на 25 % вищою порівняно з тваринами лінії Вістар-Кіото з нормальним тиском. Високий вміст кардіотрофіну-1 саме у тварин III групи може бути пов'язаним з безпосереднім впливом гіперглікемії [17]. Кардіотрофін-1 впливає на синтез ядерного фактора κВ, що стимулює гіпертрофію міокарда. Існують дані, що він відіграє важливу протективну роль відносно процесу апоптозу. У дослідженні Lopez і співавт. [12] наявність у культурі клітин кардіотрофіну-1 достовірно знижувала інтенсивність апоптозу кардіоміоцитів при стимуляції ангіотензином II

і реактивними формами кисню. У нашому дослідженні процес апоптозу оцінювали за рівнем експресії анексину V. Площа та інтенсивність флуоресценції цього маркера були достовірно вищими у тварин з гіпертензією. Найбільше значення цього показника було у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом. Раніше Ravassa та співавт. [32] продемонстрували, що апоптотичний індекс кардіоміоцитів у щурів лінії SHR був у 1,38 раза вищим, ніж у тварин з нормальним тиском (лінія Вістар).

Таким чином, моделювання у щурів зі спонтанною гіпертензією експериментального цукрового діабету призводить до більш вираженого фіброзу, що відбувається без компенсаторного підвищення вмісту тайтину. При цьому реєструється також збільшення концентрації маркерів гіпертрофії та апоптозу.

Одним з головних чинників вищеописаних змін міокарда при поєднанні гіпертензії та цукрового діабету може бути мітохондріальна дисфункція. За результатами нашого дослідження, ступінь кальційіндукованого відкриття мітохондріальної пори був достовірно вищим у щурів зі спонтанною гіпертензією, ніж у контрольних тварин. Оптична щільність суспензій мітохондрій у тварин різних груп була такою:

Щури лінії Вістар (контроль) $0,018 \pm 0,001$

Щури зі спонтанною гіпертензією $0,146 \pm 0,012^*$

Щури зі спонтанною гіпертензією та експериментальним цукровим діабетом $0,348 \pm 0,01^*, **$

* $P < 0,05$ щодо контролю, ** $P < 0,05$ щодо значень у тварин зі спонтанною гіпертензією.

У щурів з гіпертензією та супутнім цукровим діабетом рівень набухання мітохондрій збільшувався майже вдвічі порівняно з тваринами з гіпертензією.

Раніше нами було встановлено, що за несприятливого метаболічного фону (гіперглікемія, інсулінорезистентність) реєструється дефіцит аденілових нуклеотидів і лактату в мітохондріальній фракції кардіоміоцитів, що

є передумовою виникнення енергодефіциту [33]. Дисфункція мітохондрій супроводжується також інтенсивною генерацією активних форм кисню, що призводить до пошкодження білків і ліпідів, а також інших клітинних компонентів. Було виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом збільшується вміст продуктів окисної модифікації білків – альдегід- і кетонфенілгідрозонів. Іншим важливим фактором, який зумовлює мітохондріальну дисфункцію, є дефіцит оксиду азоту, що відіграє важливу роль у патогенезі гіпертензії. Раніше було встановлено, що у щурів лінії SHR з експериментальним цукровим діабетом знижується утворення нітрит-аніона та NO-синтази як у мітохондріях, так і в цитозолі міокарда [34]. При цьому у великій кількості з'являються цитотоксичні деривати NO, які знижують активність ендотеліальної NO-синтази. З іншого боку, реєструється пригнічення антиоксидантної системи клітини, зокрема тіол-дисульфідної.

Мітохондрії є чутливими до змін екстрацелюлярного матриксу міокарда, але, в свою чергу, можуть безпосередньо впливати на нього. Важливе значення у функціонуванні мітохондрій і формуванні міокардіального фіброзу має ангіотензин-II, активація котрого є однією з центральних ланок патогенезу як гіпертензії, так і діабету. За даними Коваленка та співавт. [35], у щурів зі спонтанною гіпертензією активність ангіотензинперетворюючого ферменту на 135 % вища, ніж у тварин з нормальним тиском. Ангіотензин-II стимулює надмірне утворення активних форм кисню у цитозолі та мітохондріях, порушуючи функціонування останніх. Після зв'язування з рецептором 1-го типу на поверхні плазматичної мембрани кардіоміоцита ангіотензин-II активує інтегринопосередковані зміни організації цитоскелета та екстрацелюлярного матриксу. Це не лише змінює механічні властивості міокарда, але й впливає на розподіл, структуру та функціонування мітохондрій [36]. При цьому формується «хибне коло», коли мітохондрії як найбільші продуценти

реактивних форм кисню через зміну своєї ультраструктури стають більш вразливими до їх токсичної дії. Альтернативним механізмом є активація реактивними формами кисню та ангіотензином – II трансформуючого фактора росту β , що є потужним індуктором синтезу колагену фібробластами [37].

В умовах цукрового діабету зниження кількості та порушення ультраструктури мітохондрій, їх дисфункція призводять до сповільнення процесу окиснення вільних жирних кислот, акумуляції ліпідів у цитозолі. Це порушує передачу внутрішньоклітинних сигнальних ефектів інсуліну [38].

Відомо, що мітохондрії беруть участь у процесі апоптозу. Так, навіть тимчасове та зворотне зниження вмісту АТФ у клітинах стимулює апоптоз через активацію білка p53, формування апоптосом та індукцію системи каспаз. Дефіцит макроергів, перевантаження кальцієм зумовлюють зниження мембранного потенціалу, відкриття мітохондріальної пори та визволення проапоптотичних факторів у цитозоль. У щурів лінії SHR переважну роль в ініціацію каспазопосередкованого шляху апоптозу має саме мітохондріальний шлях, що виникає в результаті енергодефіциту [39]. Механізмами, що можуть вплинути на апоптотичні процеси, є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій іонами кальцію та пригнічення утворення вільних радикалів, попередження відкриття мітохондріальної пори та інгібування білка BCL₂ [40].

Сучасні схеми лікування артеріальної гіпертензії, що базуються на блокуванні нейрогуморальних систем, певною мірою поліпшили прогноз пацієнтів. Але вони лише опосередковано впливають на оксидативний стрес, що є однією з причин кардіальної патології. Оскільки мітохондрії є головними продуцентами реактивних форм кисню, то ці органели являють собою важливі мішені для нових терапевтичних засобів. Доведено позитивний вплив сірководню, α -ліпоевої кислоти, пластохінону, в обмеженні мітохондріальної дисфункції [41]. Зокрема,

використання донаторів сірководню у щурів зі спонтанною гіпертензією чинило стабілізуювальну дію на мембрани мітохондрій, підвищуючи резистентність органел до природного індуктора відкриття мітохондріальної пори Ca²⁺ [42]. Іншим способом обмеження утворення реактивних форм кисню є конкурентна активація цитохромоксидази донаторами NO, зокрема динітрозольними сполуками заліза. Вони вважаються клітинним депо NO та здатні вивільняти його при дефіциті. В експерименті з ізольованими мітохондріями донатори NO знижували утворення супероксиду. Запатентована форма динітрозольних сполук заліза «оксаком» на разі проходить клінічні випробування [43]. У дослідженні Мойбенка та співавт. [40] використання активатора K_{АТФ}-каналів флокаліну запобігало перевантаженню мітохондрій Ca²⁺, відкриванню мітохондріальної транспортної пори, попереджуючи процес апоптозу.

Отже, експериментальний цукровий діабет у щурів зі спонтанною гіпертензією значно поглиблює існуючу мітохондріальну дисфункцію. Отримані результати вказують на важливу роль мітохондрій у процесах ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, формування фіброзу та гіпертрофії, а також апоптозу кардіоміоцитів. Пошкодження цих органел призводить до надлишкової генерації активних форм кисню, що значно впливає на морфофункціональний стан міокарда. Застосування нових лікарських засобів, що здатні корегувати мітохондріальну дисфункцію, може відкрити нові терапевтичні можливості щодо покращення прогнозу хворих на артеріальну гіпертензію та цукровий діабет.

Ю.М. Колесник, М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов

МАРКЕРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА У КРЫС ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО САХАРНОМ ДИАБЕТЕ: РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Исследовали экспрессию кардиотрофина-1, аннексина V, тайтина и коллагена I типа в миокарде крыс линии Вистар

(контроль), а также крыс со спонтанной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом и без него. В митохондриях, изолированных из ткани сердца, изучали проницаемость митохондриальной поры под воздействием Ca^{2+} . Установили, что у крыс со спонтанной гипертензией и сопутствующим диабетом удельное содержание кардиотрофина-1, аннексина V и коллагена I типа в миокарде было достоверно выше по сравнению с животными с нормальным артериальным давлением и крысами с гипертензией без диабета. Удельное содержание тайтина было на 27 % ниже у крыс с гипертензией и диабетом, чем у животных с гипертензией без диабета. Указанные изменения экспрессии кардиотрофина-1, аннексина V, тайтина и коллагена I типа ассоциировались с наибольшей чувствительностью митохондриальной поры к Ca^{2+} у крыс со спонтанной гипертензией и сопутствующим сахарным диабетом.

Ключевые слова: кардиотрофин-1, аннексин V, тайтин, коллаген I типа, митохондриальная пора, миокард, крысы, гипертензия, сахарный диабет.

Y.M. Kolesnyk, M.Y. Kolesnyk, A.V. Abramov

PATHOLOGICAL REMODELING OF MYOCARDIUM IN SPONTANEOUS HYPERTENSIVE RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS: THE ROLE OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

The expression of cardiotrophin-1, annexin V, titin and type I collagen was investigated in myocardium of normotensive Wistar rats and spontaneous hypertensive rats with and without experimental diabetes. The Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore was assessed in mitochondria isolated from rat hearts. The contents of cardiotrophin-1, annexin V and type I collagen in spontaneous hypertensive rats with diabetes were higher compared with that detected in the groups of normotensive rats and rats with diabetes. The cardiac titin level was 27 % lower in animals with hypertension and diabetes compared to spontaneous hypertensive rats without diabetes. The changes of cardiotrophin-1, annexin V, titin and type I collagen expression were associated with higher sensitivity of mitochondrial pore to Ca^{2+} in myocardium of spontaneous hypertensive rats with diabetes.

Key words: cardiotrophin-1, annexin V, titin, type I collagen, mitochondrial pore, myocardium, rats, hypertension, diabetes mellitus.

Zaporizhzhya State Medical University

REFERENCES

1. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2013; 34: 2159-219.
2. Colosia A, Palencia R, Khan S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2013; 6: 327-38.
3. Cheung B, Li C. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? Curr Atheroscler Rep. 2012; 14: 160-6.
4. Okoduwa S, Umar A, Ibrahim S, Bello F. Relationship of oxidative stress with type 2 diabetes and hypertension. J Diabetology. 2013; 1: 1-10.
5. Savoia C, Schiffrin E. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. Clin Sci. (Lond). 2007; 112(7): 375-84.
6. Van Buren P, Toto R. The pathogenesis and management of hypertension in diabetic kidney disease. Med Clin North Am. 2013; 97(1): 31-51.
7. Izzo R, Simone G, Trimarco V, Gerds E, Giudice R, Vaccaro O et al. Hypertensive target organ damage predicts incident diabetes mellitus. Eur Heart J. 2013; 34 (44): 3419-26.
8. Russo C, Jin Z, Homma S, Rundek T, Elkind M, Sacco R et al. Effect of diabetes and hypertension on left ventricular diastolic function in a high-risk population without evidence of heart disease. Eur J Heart Fail. 2010; 12 (5): 454-61.
9. Wachtera R, Lüersa C, Kletaa S, Griebela K, Herrmann-Lingenb C, Binderc L. et al. Impact of diabetes on left ventricular diastolic function in patients with arterial hypertension. Eur J Heart Fail. 2007; 9 (5): 469-76.
10. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N. Biochemical markers of myocardial remodeling in hypertensive heart disease. Cardiovas Res. 2009; 81: 509-18.
11. Androulakis E, Tousoulis D, Papageorgiou N, Latsios G, Siasos G, Stefanadis C. The role of matrix metalloproteinases in essential hypertension. Curr Top Med Chem. 2012; 12(10):1149-58.
12. Lopez N, Diez J, Fortuno M. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. Cytokine. 2005; 30 (5): 282-92.
13. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca A, Tayebjee M, Franz M. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. J Hypertens. 2012; 30(1): 3-16.
14. Stakos D, Tziakas D, Chalikias G, Mitrousi K, Tsigalou C, Boudoulas H. Associations between collagen synthesis and degradation and aortic function in arterial hypertension. Am J Hypertens. 2010; 23(5): 488-94.
15. Hamdani N, Paulus W. Myocardial titin and collagen in cardiac diastolic dysfunction: partners in crime. Circulation. 2013; 128: 5-8.
16. Calabrò P, Limongelli G, Riegler L. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. J Mol Cell Cardiol. 2009; 46(2): 142-8.

17. Jougasaki M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. *Adv Clin Chem.* 2010; 52: 41-76.
18. Kim J, Wei Y, Sowers J. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 2008; 102: 401-14.
19. Puddu P, Puddu G, Cravero E, Pascalis S, Muscari A. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2007; 29 (7): 427-34.
20. Postnov YV. [Insufficient ATP generation due to mitochondria calcium overload as a source of blood pressure elevation in primary hypertension]. *Kardiologiya.* 2005;10: 4-11. Russian.
21. Liang M. Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease. *Kidney Int.* 2011; 80: 15-16.
22. Gustafsson A, Gottlieb R. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovascular Research.* 2008; 77: 334-43.
23. Akopova OV, Sagach VF. [Induction of the mitochondrial pore opening as affected by Ca^{2+} in the rat myocardium]. *Ukr Biochem J.* 2004; 76(1): 48-55. Ukrainian.
24. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003; 21(1): 3-12.
25. Asbun J, Villarreal F. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 693-700.
26. Shamhart P, Luther D, Adapala R, Bryant J, Petersen K, Meszaros J. Hyperglycemia enhances function and differentiation of adult rat cardiac fibroblasts. *Can J Physiol and Pharmacol.* 2013; 10: 84-90.
27. Ge M, Ma S, Tao L. The effect of gypenosides on cardiac function and expression of cytoskeletal genes of myocardium in diabetic cardiomyopathy rats. *Am J Chin Med.* 2009; 37(6): 1059-68.
28. Makarenko I, Opitz C, Leake M, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey J. et al. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res.* 2004; 95: 708-16.
29. Warren C, Jordan M, Roos K, Krzesinski P, Greaser M. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res.* 2003; 59 (1): 86-94.
30. Chung C, Hutchinson K, Methawasin M, Saripalli C, Smith J, Hidalgo C et al. Shortening of the elastic tandem immunoglobulin segment of titin leads to diastolic dysfunction. *Circul.* 2013; 128: 19-28.
31. Pemberton C, Raudsepp S, Yandle T, Cameron V, Richards A. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch. *Cardiovasc Res.* 2005; 68: 109-17.
32. Ravassa S, Fortuño M, González A, López B, Zalba G, Fortuño A et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 36: 1065-71.
33. Kolesnyk MY, Belenichev IF, Dzyak GV, Checkman IS. [The peculiarities of mitochondria functioning in myocardium of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes and atherosclerosis]. *Zaporozhnye Medical Journal.* 2012; 2: 26-31. Russian.
34. Kolesnyk MY. [The abnormalities in nitric oxide system in cardiomyocytes of spontaneous hypertensive rats with experimental hyperglycemia and atherosclerosis]. *Tavricheskiy Mediko-Biol Vestnik.* 2012; 15(3): 154-58. Russian.
35. Kovalenko VN, Talaeva TV, Shumakov VA, Bratus VV. [Arterial hypertension and systemic metabolic disturbances in the pathogenesis of essential hypertension]. *Ukr NAMS Journal.* 2012;18: 40-54. Russian.
36. Cavanagh E, Ferder M, Inserra F, Ferder L. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296: 550-58.
37. Yudi P, Yvette P, Tamara C, John P, Lijnen J. Role of reactive oxygen species in the TGF-beta1-induced collagen production and differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts [abstract]. *J Clin Hypertension.* 2013; 15: 177.
38. Coletta D, Mandarino L. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance from the outside in: extracellular matrix, the cytoskeleton, and mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol. Metab.* 2011; 301: 749-55.
39. Azova MM, Blagonravov ML, Demurov EA, Frolov VA. [Energy deficit as a possible factor for the induction of caspase-dependent apoptosis in left ventricular myocardial cells during genetically determined and secondary arterial hypertension]. *Bull Exp Biology and Medicine.* 2012; 153 (6): 800-2. Russian.
40. Strutynskyi RB, Nagibin VS, Strutynska NA, Ianchii OR, Moibenko AA. [Influence of focalin on development of apoptosis and necrosis at anoxia-reoxygenation of culture rats neonatal cardiomyocytes] *Fiziol Z.* 2013; 59(3): 3-9. Ukrainian.
41. Lakomkin VL, Abramov AA, Kapelko VI. [Mitochondrial antioxidant SKQ1 decreases intensity of ventricular arrhythmias caused by epinephrine]. *Kardiologiya.* 2011; 11: 60-3. Russian.
42. Strutynska NA, Dorofeyeva N, Vavilova GL, Sagach VF. [Hydrogen sulfide inhibits Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore opening in spontaneously hypertensive rats]. *Fiziol Z.* 2013; 59 (1): 3-10. Ukrainian.
43. Pisarenko OI, Serebryakova LI, Tskitishvili OV, Studneva IM, Vanin AF. [Myocardial infarction remodelling in rats with dinitrosyl iron complex with glutathione]. *Regional Circ and Microcirc.* 2008; 7 (2): 46-47. Russian.

Д.О. Пашевін, С.В. Гончаров, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко

Зміни активності трипептидил-пептидази II у тканинах аорти при експериментальному атеросклерозі та артеріальній гіпертензії

Зміни активності внутрішньоклітинних протеолітичних систем – важлива ланка в механізмах атеросклеротичного пошкодження судинної стінки та артеріальної гіпертензії. Однією з маловивчених гігантських протеаз є трипептидил-пептидаза (ТПП) II, що забезпечує гідроліз пептидів, які утворюються після протеасомного протеолізу. В експериментах з моделювання холестеринового атеросклерозу у кролів (протягом 2 міс отримували корм зі 1%-м вмістом холестерину) встановлено суттєве зниження (на 64 %, $P < 0,05$) активності ТПП II у тканинах аорти. Показано, що холестеринова дієта зі спонтанною гіпертензією щурів також знижує активність досліджуваної протеази (на 50 %, $P < 0,05$), яка у щурів лінії Вістар не змінювалася. Застосування препаратів кверцетину запобігало пригніченню активності в тканинах аорти кролів при експериментальній гіперхолестеринемії та у щурів лінії SHR. Наші результати свідчать, що зміни активності ТПП II призводять до ушкодження судинної стінки при атеросклерозі та артеріальній гіпертензії. Ключові слова: трипептидил-пептидаза II, атеросклероз, артеріальна гіпертензія.

ВСТУП

Регуляція обміну внутрішньоклітинних протеїнів – один з ключових процесів у життєдіяльності клітини, а його порушення спричинює розвиток багатьох патологічних змін. Основною системою, що залучається до регуляції кількості та контролю якості білків клітини, є протеасомний протеоліз, що відзначається високою специфічністю відносно субстрату та швидкості його утилізації [1]. Протеасомна деградація є основним, але не єдиним фактором, що спричинює протеоліз, вона доповнюється так званими постпротеасомними протеазами, зокрема трипептидил-пептидазою II (ТПП II) [2–4]. Головна роль цієї гігантської протеази полягає у розрізанні на трипептиди тих залишків білка, що залишаються після протеасомного протеолізу, а за умов його порушення ТПП II може частково перебирати на себе функції протеасоми [5]. Крім цієї протеази, до про-

цесингу продуктів протеасомного протеолізу мають відношення й інші внутрішньоклітинні пептидази (LAP, TOP, BH, PSA), але тільки ТПП II здатна до деградації пептидів довжиною понад 15 амінокислотних залишків [3].

ТПП II – це серинова пептидаза, що складається з двох ланцюгів, які побудовані з ідентичних субодиниць (молекулярна маса 138 кДа), і, залежно від їх кількості, маса комплексу ТПП II може сягати 2000 кДа та навіть більше. Основна функція цієї протеази – відщеплення трипептидів від вільного NH_2 -кінця цитоплазматичних олігопептидів, що утворюються різними ендопептидазами та протеасомою. Крім власне завершення протеолізу білків-мішеней, ТПП II також бере участь і в підготовці до презентації пептидів у головному комплексі гістосумісності (ГКГС) I класу [4]. Нещодавно розпочаті дослідження ролі ТПП II у патогенезі різних захворювань. У культурах клітин тимоми та лімфоми EL4, що піддавали дії протеа-

© Д.О. Пашевін, С.В. Гончаров, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко

сомного інгібітора, з часом чутливість до його цитотоксичної дії знижувалася. Цей ефект пояснюють збільшенням активності ТПП II, що супроводжувала зниження цитотоксичного впливу [1]. При ушкодженні клітини іонізуючим випромінюванням H_2O_2 або ушкодженні мітохондрій відбувається транслокація з цитоплазми з накопиченням в ядрі ТПП II. Одночасно у ТПП-нокаутних тварин відзначалася підвищена чутливість до іонізуючого випромінювання [7]. Важливе значення також відводиться цій системі в механізмах м'язової дистрофії [8].

Мета нашого дослідження – визначити зміни активності ТПП II при експериментальному атеросклерозі та артеріальній гіпертензії.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на 28 кролях обох статей масою $2,95 \pm 0,35$ кг. Тварини були розділені на 3 групи. До I контрольної групи ввійшли 8 кролів, до II – 10 кролів, які щодня впродовж 8 тиж отримували корм зі вмістом холестерину (1 %), до III – 10 кролів, які паралельно з холестериновою дією отримували препарати кверцетину.

Інші дослідження проводили на щурах ліній Вістар масою 294 ± 22 г і SHR масою 294 ± 27 г, які були поділені на 5 груп: I – контрольна, щури лінії Вістар (n=8), II – щури лінії SHR (n=16), III – щури лінії Вістар, що отримували корм зі вмістом 3%-го холестерину (n=8), IV – щури лінії SHR, що перебували на раціоні з 3%-м вмістом холестерину (n=8), та V – щури лінії SHR (n=8), що отримували щодня таблетовану форму кверцетину – квертин протягом 8 тиж у дозі 15 г/кг. Квертин подрібнювали та домішували до стандартного корму, пресуючи гранули для згодовування щурам. Гіпертензію у щурів лінії SHR підтверджували вимірюванням тиску неінвазивним методом у хвостовій артерії за допомогою вимірювального комплексу сфігмоманометра S-2 («HSE», Німеччина).

Наявність та частоту пульсу реєстрували за допомогою осцилоскопа НМ303-4 («НАМЕГ GmbH», Німеччина). У дослід брали щурів із систолічним тиском понад 150 ± 3 мм рт.ст.

Мірою активності ТПП II була інтенсивність гідролізу специфічного флюорогенного субстрату, яку визначали на спектрофлюориметрі «Hitachi-4000» (довжина хвилі збудження/емісії (λ_x/λ_m) – 380/465). Для підтвердження специфічності гідролізу використовували селективний інгібітор. Відсоток зменшення активності гідролізу відповідних субстратів під дією вказаного інгібітора трактували як активність ТПП II і виражали в мікромолях амідометилкумарину на 1 мг білка за 1 хв.

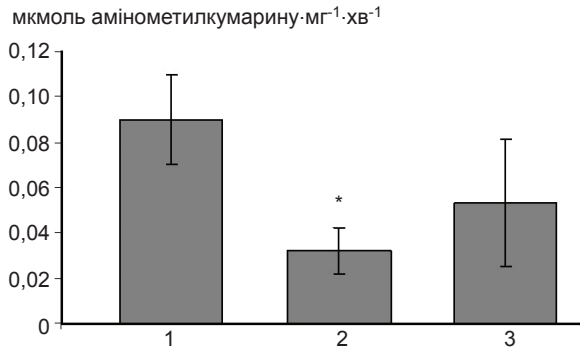
Для дослідження активності ТПП II у тканинах тварин піддавали евтаназії за допомогою повітряної емболії (кролі) та декапітації під уретановим наркозом (щури). Аорту подрібнювали в скляному гомогенізаторі в тріс-НСІ-буфері (рН 7,4), центрифугували (900 г протягом 10 хв), а супернатант використовували для біохімічного дослідження. Вміст білка в гомогенатах аорти визначали за методом Lowry [6]. Активність протеази виражали в мікромолях амідометилкумарину на 1 мг білка за 1 хв. Флюорогенні субстрати та інгібітори, виготовлені фірмою «Sigma» (США).

Отримані результати обробляли математично з використанням комп'ютерних програм Origin 7.0 і Excel. Достовірність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про суттєвий вплив гіперхолестеринової дієти на активність ТПП II в тканинах аорти кролів, яка знижувалася на 64 % порівняно з контролем ($P < 0,05$). Введення препаратів кверцетину припиняло холестериніндуковане зниження цього показника (рис 1).

Подібні результати спостерігались і при моделюванні холестеринозу у щурів зі спон-



Зміни активності трипептидил-пептидази II в тканинах аорти кролів при моделюванні холестеринного атеросклерозу та впливу кверцетину: 1 – контроль, 2 – дієта зі вмістом холестерину (1%), 3 – холестеринова дієта і вплив кверцетину. *P<0,05 порівняно з контролем

танною гіпертензією. Активність ТПП II у контрольних та у дослідних щурів не відрізнялася. Проте 8 тиж холестеринної дієти практично не змінювали її у щурів лінії Вістар, але у SHR-групи вона значно знижувала активність (на 50%) порівняно з досліджуваними тваринами, які не перебували на дієті. Вплив кверцетину попереджував зниження активності ТПП II у щурів лінії SHR (на 35% порівняно з SHR без лікування).

Зміни активності ТПП II в тканинах аорти щурів зі спонтанною гіпертензією при моделюванні холестеринного атеросклерозу та впливу кверцетину:

Щури лінії Вістар	0,0257 ± 0,009
Щури лінії Вістар, що перебували на 3%-й холестеринній дієті	0,0212 ± 0,009
Щури зі спонтанною гіпертензією	0,0258 ± 0,011
Щури зі спонтанною гіпертензією, що перебували на 3%-й холестеринній дієті	0,013 ± 0,008*
Щури зі спонтанною гіпертензією, яким згодовували кверцетин	0,017 ± 0,007

*P<0,05 порівняно з групою 3.

Дані наших попередніх досліджень вказують на те, що атеросклеротичні зміни су-

проводжуються підвищенням протеасомної активності у тканинах аорти та лейкоцитах крові [10], а згідно з результатами цього дослідження активність ТПП II знижувалась як у кролів, так і у щурів зі спонтанною гіпертензією за умов гіперхолестеринемії. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що такий дисбаланс у системі утилізації внутрішньоклітинних протеїнів між протеасомою і ТПП II є однією з ланок патогенезу атеросклеротичного процесу. Водночас слід зазначити, що конкретна роль такої невідповідності у механізмах атерогенезу не визначена. Найбільш вірогідним наслідком такої ситуації має бути накопичення в клітинах олігопептидів, що не зазнали «тримінгу» за допомогою ТПП II. Це може провокувати зміну профілю пептидів, що презентуються в складі ГКГС I на клітинній стінці та кількість комплексів гістосумісності, що презентуються на мембрані [11]. Таке явище в свою чергу викличе аутоімунне ушкодження, значення якого в атеросклерозі добре вивчено [1, 12]. Іншим відомим фактором ушкодження судинної стінки є оксидативний стрес. Дослідження Preta та співавт. [3, 13] свідчать, що ушкодження ДНК супроводжуються транслокацією ТПП II в ядро, і автори вважають, що це має значення у ДНК-репарації (в тому числі і за умов оксидативного стресу) [3]. Якщо дотримуватися такої точки зору, то зниження активності ТПП II у клітинах судинної стінки при атеросклеротичному процесі повинно підвищувати чутливість ДНК до структурних порушень і зменшувати антиоксидантний захист клітин.

Також добре відомо, що атеросклероз є асоційованою з віком патологією. Нуаї та співавт. [4] показали, що у мишей, нокаутуваних за геном ТПП II, відбувається активація програм клітинної смерті, асоційована з фенотипом «імуностаріння». Ознаки передчасного старіння у ТПП II-дефіцитних мишей найбільш яскраво виражені у фібробластах та CD-8 Т-лімфоцитах. Автори наголошують на роль у цьому процесі пошкодження

ДНК, індукованого вільними радикалами [14]. Про участь досліджуваної протеази в механізмах ДНК-репарації вказувалося вище [13]. Отже, зниження активності ТРР II в аорті кролів, а також щурів лінії SHR за умов гіперхолестеринемії опосередковано свідчить про передчасне старіння клітин аорти. Варто додатково нагадати, що саме у кролів та у щурів лінії SHR, що перебували на гіперхолестериневій дієті, були ознаки атерогенезу. Більше того, при нокауті ТПП II спостерігається хронічне запалення на тлі імунodefіциту [14]. Проявами цього була інфільтрація печінки лімфоцитами, зрілими гранулоцитами, а також підвищення NFκB в ізольованих спленоцитах, що характерно для вікових змін в імунній системі. Одночасно роль запалення як принципового механізму концепції «відповідь на ушкодження» в атерогенезі нині вважається ключовою та доведена багатьма дослідженнями [15–17]. Про участь ТПП II в цьому процесі практично нічого не відомо. Ми вперше встановили зменшення активності згаданого фермента у кролів і щурів з експериментальним атеросклерозом та показали, що ангіопротективний препарат кверцетин запобігає його зниженню і одночасно перешкоджає розвитку атеросклерозу. Можливим механізмом впливу кверцетину на активність ТПП II може бути його здатність до пригнічення протеасомного протеолізу [10]. За нашими результатами, інтерференція однієї з субодиниць протеасоми підвищувала активність ТПП II в тканинах серця [18]. Таким чином, ця реакція може розглядатися як компенсація підвищення активності протеасоми, що узгоджується з результатами інших дослідників [1]. Отже, нами встановлено значення ТПП II при експериментальному атеросклерозі та доведено, що ангіопротективний ефект кверцетину включає попередження зменшення ТПП II залежного протеолізу в аорті кролів і щурів при експериментальній гіперхолестеринемії. Наші результати вперше піднімають питання про значення гігантської протеази ТПП II у судинній патології.

**Д.А. Пашевин, С.В. Гончаров,
Л.В. Тумановская, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко**

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТРИПЕПТИДИЛ-ПЕПТИДАЗИ II В ТКАНЯХ АОРТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Изменения активности внутриклеточных протеолитических систем – являются важным звеном в механизмах атеросклеротического повреждения сосудистой стенки, а также в патогенезе артериальной гипертензии. Нами изучалась одна из гигантских пептидил-пептидаза (ТПП II), которая обеспечивает гидролиз пептидов, образующихся после протеасомного протеолиза. В экспериментах по моделированию холестеринового атеросклероза у кроликов (на протяжении 2 мес получали корм с содержанием холестерина (1 %) установлено значительное снижение (на 60 %, $P < 0,05$) активности ТПП II в тканях аорты. Также показано, что холестериновая диета крыс со спонтанной гипертензией также снижает активность ТПП II (на 50 %, $P < 0,05$), которая у крыс линии Вистар при этом не изменялась. Применение препаратов кверцетина предотвращало угнетение активности ТПП II в тканях аорты кроликов при экспериментальной гиперхолестеринемии и у крыс со спонтанной гипертензией. Эти результаты свидетельствуют о том, что изменения активности этого фермента ведут к повреждению сосудистой стенки при атеросклерозе и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: трипептидил-пептидаза II, атеросклероз, артериальная гипертензия.

**D.O. Pashevin, S.V.Goncharov, L.V. Tumanovska,
V.E. Dosenko, O.O. Moibenko**

THE CHANGES IN THE ACTIVITY OF TRIPEPTIDYL PEPTIDASE II IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS AND HYPERTENSION

The changes in the activity of intracellular proteolytic systems are important mechanisms in the damage of blood vessels walls and arterial hypertension. Tripeptidyl peptidase II (TPP II) is one of the giant intracellular protease that is still poorly known. It fulfils hydrolysis of peptides, coming from proteasomal proteolysis. Modeling of cholesterol atherosclerosis in rabbits (1 % of cholesterol in diet for 2 month) results in the significant decrease of TPP II activity in aorta tissues. This diet in spontaneously hypertensive rats (SHR) leads to a decrease of TPP II activity in aorta tissues (on 50%, $P < 0,05$) but has no influence on the activity of TPP II in Wistar rats. Application of Quercetin prevents the inhibition of TPP II activity in aorta tissues of rabbits and SHR at experimental hypercholesterolemia. The data received show that changes in the activity of TPP II play

an important role in pathogenesis of blood vessels wall in atherosclerosis and arterial hypertension.

Key words: Tripeptidyl peptidase II, cholesterol atherosclerosis, arterial hypertension.

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

REFERENCES

- Powell S.R., Herrmann J., Lerman A. The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease // *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 109; 295-346.
- Zhang J., Wong J., Gao G. Tripeptidyl peptidase II serves as an alternative to impaired proteasome to maintain viral growth in the host cells. *H. FEBS Lett.* 2011; 585(1); 261-5.
- Rockel B., Kopec K., Lupas A. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 24; 237-45
- Preta G., de Klark R., Gavioli R. The Enigma of Tripeptidyl-Peptidase II: Dual Roles in Housekeeping and Stress. *J. Oncol.* 2010;
- Glas R., Bogyo M., McMaster J.S. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature.* 1998; 392;618-22.
- van Endert P. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(99); 1553-67.
- Preta G, de Klark R, Glas R. Arole for nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in reactive oxygen species-dependent DNA damage responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 389(4); 575-9.
- Wray C.J., Tomkinson B., Robb B.W. Tripeptidyl-peptidase II expression and activity are increased in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296; 41-7.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; (193); 265-275.
- Pashevina D.O., Tumanovska L.V., Dosenko V.E. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes // *Pharmacol Rep.* 201; 63(4); 1009-18.
- Reits E., Neijssen J., Herberts C. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation // *J Immunity.* 2004; 20(4); 495-506.
- Grundtman C., Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis // *Curr Opin Lipidol.* 2011; 22(5); 327-34.
- Preta G., de Klark R., Chakraborti S. MAP kinase-signaling controls nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in response to DNA damage and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 27; 324-30.
- Huai J., Firat E., Nil A. Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPPII knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(13); 5177-82.
- Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(10); 709-21.
- Rohla M., Weiss T.W. Metabolic syndrome, inflammation and atherothrombosis . *Hamostaseologie;* 2013; 34 (1); 283-94.
- Woollard K.J. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clin Sci. (Lond).* 2013; 125(5); 221-35.
- Kyrychenko VO, Nagibin VS, Tumanovska LV. Knockdown of PSMB7 Induces Autophagy in Cardiomyocyte Cultures: Possible Role in Endoplasmic Reticulum Stress . *Pathobiology.* 2014; 81(1);8-14
- Geier E., Pfeifer G., Wilm M. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science.* 1999; 283;978-81.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: den-win@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 11.11.2013

О. В. Максимчук

Вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот на експресію ферментів про- та антиоксидантної системи в печінці щурів

Омега-3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) через модуляцію активності транскрипційних факторів включаються у регуляцію багатьох фізіологічних процесів у клітині. Проте малодослідженими залишаються властивості цих сполук щодо впливу на про- та антиоксидантні процеси в клітинах печінки. Метою роботи є дослідження змін експресії цитохрому P450 2E1 (CYP2E1), який проявляє потужну прооксидантну активність, та гемоксигенази-1 (HO-1; від англ. heme-oxygenase), що характеризується антиапоптотичними та протизапальними властивостями, а також оцінка активності ферментів-антиоксидантів у печінці експериментальних тварин при дії ω -3 ПНЖК. У результаті проведеного експерименту в печінці щурів, яким щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали ω -3 ПНЖК, було виявлено значне підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 та HO-1. Разом з тим не було виявлено достовірних змін відносно контролю активності ферментів-антиоксидантів – супероксиддисмутази і каталази. Імовірно, збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 через залежну від активних форм кисню активацію сигнальних шляхів призводить до індукції експресії таких ферментів із цитопротекторними властивостями, як HO-1. Така CYP2E1-залежна активація експресії HO-1 може бути одним з механізмів прояву антиоксидантних, антиапоптотичних і протизапальних властивостей ω -3 ПНЖК.

Ключові слова: цитохром P450 2E1, ω -3 поліненасичені жирні кислоти, гемоксигеназа-1, каталаза, супероксиддисмутаза.

ВСТУП

Підтримання про- та антиоксидантного балансу або фізіологічної рівноваги процесів окиснення/відновлення і утворення/нівелювання активних форм кисню (АФК) та їхніх метаболітів за постійної наявності молекулярного кисню в клітині є надзвичайно важливим критерієм її гомеостазу [1]. У гепатоцитах реакції окиснення та генерування АФК відбуваються з високою інтенсивністю, і тому постійно існує загроза зрушення балансу у оксидативний бік, а також розвитку оксидативного стресу. Але на противагу цьому функціонує потужна антиоксидантна система, ресурси якої (за рівнем експресії ферментів-антиоксидантів) у гепатоцитах чи не найвищі порівняно із іншими клітинами.

Така особливість регуляції про-та антиоксидантного балансу в печінці головним чином визначається її детоксикаційною функцією. Відомо, що першим етапом детоксикації є окиснення субстратів, що супроводжується вивільненням АФК та утворенням радикальних сполук. Останні на другому етапі детоксикації знешкоджуються, що відбувається за безпосередньої участі ферментів системи антиоксидантного захисту [2–4]. До ферментів детоксикаційної системи, що проявляють прооксидантні властивості, належить цитохром P450-монооксигеназа (КФ 1.14.14.1), зокрема, одна з його ізоформ P450 2E1 (CYP2E1). Монооксигеназна активність ферменту щодо окиснення ксенобіотиків супроводжується вивільненням високореактивних радикальних сполук та утворенням

© О. В. Максимчук

АФК [3, 4]. Крім того, цитохром P450 2E1 виявляє високу оксидазну активність – за відсутності субстратів здійснює неповне відновлення молекули кисню до його активних форм [4]. Утворені при функціонуванні ферменту АФК, зокрема пероксид водню, – це біологічноактивні молекули, які є вторинними месенджерами у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, які контролюють різноманітні фізіологічні процеси [5, 6]. Таким чином, цитохром P450 2E1 долучається до створення фізіологічного вмісту АФК у клітині, що потрібно для регуляції багатьох внутрішньоклітинних механізмів, зокрема підтримки про- та антиоксидантного балансу, апоптозу, запалення тощо. Разом з тим підвищення рівня експресії цитохрому P450 2E1 спричиняє надлишкове утворення АФК та їхніх метаболітів, що може призвести до виснаження системи антиоксидантного захисту, посилення пероксидних процесів і розвитку оксидативного стресу в клітині [4, 7].

Серед ферментів системи антиоксидантного захисту клітин печінки найбільш досліджуваними є супероксиддисмутаза – СОД (КФ 1.15.1.1), яка каталізує перетворення супероксид-аніон-радикала до пероксиду водню, та каталаза (КФ 1.11.1.6), що розкладає останній на воду та молекулярний кисень [2]. Проте за останні роки все більше вивчають антиоксидантні властивості й іншого ферменту – гемоксигенази-1 (КФ 1.14.99.3). Відомо, що гемоксигеназа-1 (НО-1; від англ. hemoxygenase) належить до родини білків теплового шоку. Цей фермент розщеплює молекулу гему до монооксиду вуглецю, білівердину та двовалентного заліза [8]. НО-1 визначає вміст у клітинах гемовмісних білків, до яких, зокрема, належать цитохром P450 і його ізоформи. Виявлено, що в клітинах печінки транскрипція гена НО-1, як і інших стресових білків, індукується у відповідь на хімічні і фізичні чинники, а також при підвищенні концентрацій цитокінів та при оксидативному стресі [9], тобто за умов, при яких ресструється надлишковий вміст АФК

та їхніх метаболітів. При цьому підвищення експресії НО-1 навіть розглядають як адаптивну відповідь клітини на порушення її гомеостазу, спричинене будь-якими стресовими факторами. І за таких умов цитопротекторний вплив цього ферменту складається у супресії АФК-індукованих механізмів апоптозу та запалення [8, 9].

Отже про- та антиоксидантний баланс у клітинах печінки підтримується завдяки функціонуванню певних ферментів детоксикаційної системи, що мають про- та антиоксидантні властивості. Їхня експресія регулюється багатьма зовнішніми та внутрішніми чинниками, які діють на всіх етапах біосинтезу – від ініціації транскрипції генів до пострансляційних модифікацій білків. Серед таких чинників розглядають дію органічних сполук, зокрема поліненасичених жирних кислот, які можуть проявляти властивості біологічно активних речовин і значно впливати на метаболічні процеси [10].

За останні роки зріс науково-практичний інтерес щодо досліджень властивостей ω -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), а також можливості використання цих речовин як біодобавок та лікарських засобів для профілактики та лікування цілої низки захворювань. Найбільш досліджуваними представниками цієї групи речовин є α -ліноленова, ейкозапентаєнова і докозагексаєнова кислоти. ω -3 ПНЖК – незамінні органічні речовини. Вони не синтезуються *de novo* у власних клітинах ссавців, тому повинні постійно надходити в організм ззовні [11]. Після потрапляння до клітин печінки ω -3 ПНЖК вбудовуються у фосфоліпідний шар біомембран, що значно поліпшує трансмембранний транспорт і функціонування комплексів мембранно-асоційованих ферментів [10, 11]. Вільні ω -3 ПНЖК через активування або пригнічення експресії певних транскрипційних факторів залучаються у регуляцію багатьох метаболічних процесів у печінці [10]. При цьому малодослідженими залишаються властивості ω -3 ПНЖК щодо впливу на про- та

антиоксидантні процеси в клітинах цього органа.

Мета нашої роботи – дослідження змін експресії цитохрому P450 2E1 та HO-1, а також оцінка активності ферментів-антиоксидантів СОД та каталази у печінці експериментальних тварин при довготривалому введенні ω -3 ПНЖК.

МЕТОДИКА

В експерименті було використано 12 самців щурів лінії Вістар віком 3 міс із масою тіла 200–250 г розведення віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ). Щурів утримували у стандартних умовах: інвертований добовий світловий режим при 18–20 °С. Тварин було розподілено порівну на контрольну та дослідну групи. Дослідним тваринам щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали ω -3 ПНЖК (препарат епадол, що містить 45 % суміші ω -3 ПНЖК тваринного походження, виробництва Київського вітамінного заводу). Добова доза препарату становила 0,1 мг / 100 г [12]. Дослідження проводили згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Вміст білків CYP2E1 та HO-1 у печінці визначали методом імуноблотингу, використовуючи специфічні поліклональні антитіла: anti-CYP2E1 (отримані у відділі молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України), anti-HO-1 та anti- β -actin (“Sigma”, США). Тотальний лізат клітин печінки та білковий екстракт отримували за методикою, описаною в роботі [13].

Тотальний білок кожного зразка (по 50 мкг) розділяли за допомогою електрофорезу у 12%-му поліакриламідному гелі за наявності 0,1% додецилсульфату натрію за методом Лемлі [14]. Імуноблотинг із застосуванням anti-CYP2E1 здійснювали як описано в роботі [13], а з використанням anti-HO-1 та anti- β -actin проводили згідно з рекомендаціями фірми виробника (“Sigma”, США). Результати

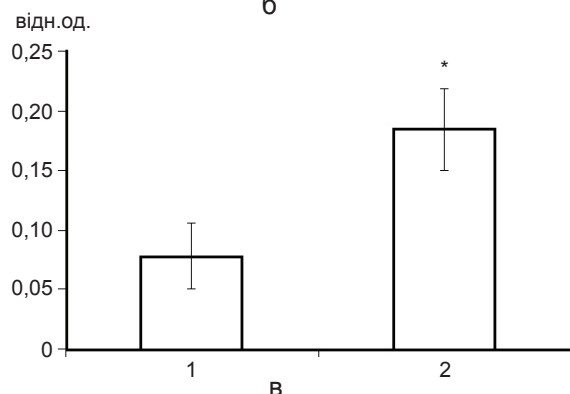
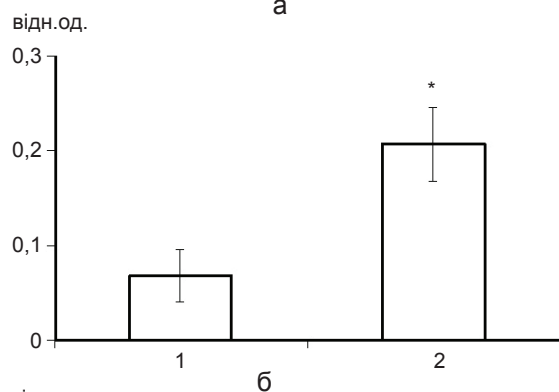
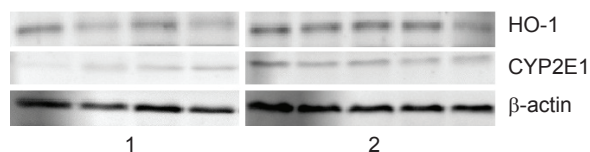
візуалізували та обраховували за допомогою спеціального обладнання ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software (“Bio-Rad”, США). Вміст білків CYP2E1 та HO-1 у печінці тварин було представлено у відносних одиницях, що вираховували як відношення кількості досліджуваних білків до білка β -актин в одному і тому зразку. Білок β -актин було використано як внутрішній контроль завантаження тотального білка до гелю.

Активність ферментів каталази та СОД вимірювали згідно методів [15, 16]. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи пакет програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Достовірність визначали за критерієм t Стьюдента. Відмінності вважали достовірними при $P \leq 0,05$. Результати представлено у вигляді середніх значень для $n = 4-6$ із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у печінці дослідних щурів, яким упродовж 4 тиж до стандартного раціону додавали ω -3 ПНЖК, було виявлено підвищення вмісту прооксидантного ферменту цитохрому P450 2E1 більш ніж у 2,5 раза порівняно із контролем (рисунок, а, в). Це могло бути спричинено змінами експресії ферменту на всіх етапах регуляції його біосинтезу. Імовірно, ω -3 ПНЖК можуть впливати на транскрипцію гена цитохрому через активацію певних транскрипційних факторів, що індукують експресію ферментів мікосомного окиснення жирних кислот [10], до яких, як відомо, і належить CYP2E1. Отже, така індукція транскрипції гена цитохрому може призводити до збільшення його вмісту в клітині. Крім того, можливо, ω -3 ПНЖК, як і інші субстрати, стабілізують молекулу CYP2E1, що спричинює накопичення ферменту в клітині [17]. Про це можуть свідчити дані відносно того, що ω -3 ПНЖК виявляються ефективними альтернативними субстратами у шляхах CYP-залежного метаболізму

арахідонової кислоти у гепатоцитах [11]. Водночас у печінці дослідних тварин було виявлено триразове збільшення вмісту HO-1 (див. рисунок, а, б). Це, можливо, пов'язано зі спричиненою ω -3 ПНЖК активацією транскрипційного фактора Nrf2 (від англ. nuclear



Експресія цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) і гемоксигенази-1 (HO-1) у печінці експериментальних щурів: а – імуноблотинг з використанням специфічних антитіл: anti-HO-1, anti-CYP2E1 та anti- β -actin, б – середній вміст HO-1, в – середній вміст цитохрому P450 2E1. 1 – контроль, 2 – ω -3 ПНЖК. * $P \leq 0,05$

factor erythroid 2-related factor 2), який, як відомо, позитивно регулює транскрипцію багатьох генів ферментів антиоксидантної системи, до яких належить HO-1 [18, 19]. Але не було виявлено достовірних змін відносно контролю активності інших ферментів-антиоксидантів – СОД і каталази (таблиця). Подібні результати були отримані й іншими авторами при дослідженні впливу ω -3 ПНЖК на рівень експресії маркерів оксидативного стресу у адипоцитах [18]. Ймовірно, підвищення експресії саме HO-1 попереджує значне порушення про- та антиоксидантного балансу та пов'язані з цим зміни активності СОД і каталази.

Відомо, що збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 супроводжується посиленням генерування активних форм кисню, надлишкове накопичення яких у клітині може призвести до виснаження системи антиоксидантного захисту та інтенсифікації процесів пероксидного окиснення [4, 5, 7]. Водночас на культурі НерG2 E47, яка характеризується підвищеним рівнем експресії цього ферменту було показано, що CYP2E1-залежне збільшення вмісту АФК в клітинах спричиняє активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема деяких протеїнкіназних каскадів MAPK (від англ. mitogen-activated protein kinase) [5]. Це у свою чергу призводить до модуляції активності цілої низки редоксчутливих транскрипційних факторів, зокрема до підвищення експресії Nrf2 [5, 6]. В наслідок цього в клітині збільшується вміст антиоксидантних факторів, зокрема стресових білків [5, 7]. Такий ефект і було показано в умовах нашого експерименту – в печінці дослідних щурів виявлено значне збільшення вмісту HO-1.

Активність ферментів антиоксидантної системи у гомогенатах печінки експериментальних тварин (M \pm m)

Схема досліджу	Каталаза, мкмоль/хв · мг білка	Супероксидисмутаза, ум.од./мг білка
Контроль	439,8 \pm 53,4	3,50 \pm 0,61
Тварини, яким додавали ω -3 поліненасичені жирні кислоти	480,1 \pm 42,4	2,67 \pm 0,85

Отже, в печінці щурів, яким щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали ω -3 ПНЖК, було виявлено значне підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 та HO-1. Разом з тим не було показано достовірних змін відносно контролю рівня активності ферментів антиоксидантної системи – СОД і каталази.

Використовуючи отримані результати та дані літератури можна зробити таке припущення. Довготривале введення ω -3 ПНЖК збільшує вміст цитохрому P450 2E1 у печінці експериментальних тварин, що посилює генерування активних радикальних сполук (АФК та їхніх метаболітів) в клітинах. Кисневі радикали у свою чергу через активацію МАРК-сигнальних шляхів підвищують активність транскрипційного фактора Nrf2, що призводить до індукції експресії ферментів із цитопротекторними властивостями, зокрема HO-1. Отже, така СYP2E1-залежна індукція експресії HO-1 може бути одним з механізмів прояву антиоксидантних, антиапоптотичних і протизапальних властивостей ω -3 ПНЖК.

Автор статті висловлює подяку провідному науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України А.М. Шиш за допомогу у проведенні біохімічних досліджень та у роботі з тваринами.

О. В. Максимчук

ВЛИЯНИЕ ω -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТОВ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) путем модуляции активности транскрипционных факторов включаются в регуляцию многих физиологических процессов в клетке. Однако малоисследуемыми остаются свойства этих соединений влиять на про- и антиоксидантные процессы в клетках печени. Целью работы является исследование изменений экспрессии цитохрома P450 2E1 (CYP2E1), который проявляет мощную прооксидантную активность, и гемоксигеназы 1 (HO-1; от англ. hemoxygenase), для которой характерны антиапопто-

тические и противовоспалительные свойства, а также оценка активности ферментов-антиоксидантов в печени экспериментальных животных при действии ω -3 ПНЖК. В результате проведенного эксперимента в печени крыс, которым ежедневно на протяжении 4 нед к стандартному рациону вивария добавляли ω -3 ПНЖК, было выявлено значительное повышение содержания цитохрома P450 2E1 и HO-1. Одновременно с этим, не было выявлено достоверных изменений относительно контроля активности ферментов-антиоксидантов – супероксиддисмутазы и каталазы. Вероятно, увеличение содержания цитохрома P450 2E1 путем зависимой от активных форм кислорода активации определенных сигнальных путей приводит к индукции экспрессии таких ферментов с цитопротекторными свойствами, как HO-1. Эта СYP2E1-зависимая активация экспрессии HO-1, возможно, является одним из механизмов проявления антиоксидантных, антиапоптотических и противовоспалительных свойств ω -3 ПНЖК.

Ключевые слова: цитохром P450 2E1, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты, гемоксигеназа 1, каталаза, супероксиддисмутаза.

O. V. Maksymchuk

THE INFLUENCE OF OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON THE EXPRESSION OF ENZYMES OF THE PRO-OXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE RAT LIVER

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are involved in the regulation of many physiological processes by modulating the activity of transcription factors. However, the properties of the compounds to influence the pro - antioxidant processes in liver are poorly investigated. We aimed to study the changes in expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) with a strong prooxidant activity, and heme oxygenase 1 (HO-1), which is characterized by anti-apoptotic and anti-inflammatory properties, and evaluation of the activity of antioxidant enzymes in the liver of experimental animals under the action of omega-3 PUFAs. It was shown a significant increase in cytochrome P450 2E1 and heme oxygenase 1 expression in the liver of rats treated with the omega-3 PUFAs (per os, daily for 4 weeks). At the same time, there were no changes in the activity of antioxidant enzymes - superoxide dismutase and catalase. Probably an increase of the level of cytochrome P450 2E1 leads to induction of expression of enzymes with cytoprotective properties, such as heme oxygenase-1, by ROS-dependent activation of certain signaling pathways. Such CYP2E1-dependent activation of expression of HO-1 is one of the possible mechanisms of manifestation of antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties of omega-3 PUFAs. Key words: Cytochrome P450 2E1, omega-3 polyunsaturated fatty acids, heme oxygenase-1, catalase, superoxide dismutase.

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. 1999 Sep 15;342 (Pt 3):481-96.
2. Kuznetsova EE, Gorokhova VG, Gorokhov AG, Sergeyeva AS, Kuril'skaya TE, Pivovarov YuI, Runovich AA. Microsomal oxidation in physiological and pathologic processes. *Bulletin ESSC SB RAMS*. 2007; 56(4):170-180. Russian
3. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2001 May;58(5-6):737-47.
4. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res*. 2005 Jan 6;569(1-2):101-10.
5. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29693-700.
6. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999 Jan;11(1):1-14.
7. Cederbaum A.I. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;21 Suppl 3:S22-5.
8. Origassa C, Câmara N. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. *World J Hepatol*. 2013 Oct 27;5(10):541-549.
9. Abdalla MY, Mathahs MM, Ahmad IM. Protective role of heme oxygenase-1 in liver. *Biologia*. 2012 Aug;67(4):623-28.
10. Jump D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):242-7.
11. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep*. 2010 May-Jun;62(3):536-47.
12. Shysh AM, Kukoba TV, Tumanov's'ka LV, Moïbenko OO. Phospholipid membrane modification as a protection factor of the myocardium during stress injury. *Fiziol Zh*. 2005;51(2):17-23. Ukrainian
13. Maksymchuk OV, Chashchyn MO. Stress-induced changes in the content of cytochrome P450 2E1 in the liver of mice with chronic psychoemotional overexertion. *Fiziol Zh*. 2013;59(4):67-73. Ukrainian
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
15. Koroliuk M, Ivanova L, Maiorova I, Tokarev V. A method of determining catalase activity. *Lab Delo*. 1988;(1):16-9. Russian
16. Stephanov OV, editor. *Preclinical studies of drugs*. Kyiv: Avicena: 2001.
17. Kitam VO, Maksymchuk OV, Chashchyn MO. The possible mechanisms of CYP2E1 interactions with HSP90 and the influence of ethanol on them. *BMC Struct Biol*. 2012 Dec 17;12:33. doi: 10.1186/1472-6807-12-33. Cited in PubMed; PMID:23241420
18. Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 4;430(1):225-30.
19. Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL, Chen HW. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- κ B pathways. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):204-12.

Ин-т молекул. біології і генетики НАН України, Київ
E-mail: o.maksymchuk@ukr.net

Матеріал надійшов до
редакції 23.12.2013

Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельський, В.А. Барановський

Зміни у функціонуванні шлунка щура після інтрагастрального введення корвітину в підвищених дозах

Внутрішньошлункове введення корвітину в дозах 10, 20 і 40 мг/кг зумовлює дозозалежне збільшення таких показників шлункової секреції, як об'єм шлункового соку і загальна продукція хлористоводневої кислоти (ХК). Концентрація останньої у шлунковому соку дозозалежно зростає лише після введення корвітину в дозах 20 і 40 мг/кг. Незначне посилення продукції гексозамінів і цистеїну спостерігалося тоді, коли досліджуваний препарат вводили в дозі 10 мг/кг, а при більших концентраціях вони знаходилися на рівні контрольних значень. Продукція білка зростає у відповідь на дію 10 і 20 мг/кг корвітину, проте зменшується до значень нижчих від контрольних після введення 40 мг/кг препарату. Об'ємна швидкість кровотоку в слизовій оболонці шлунка (СОШ) збільшується після застосування корвітину в дозі 10 мг/кг, не відрізняється від вихідних значень після введення 20 мг/кг препарату та істотно зменшується у відповідь на 40 мг/кг флавоноїду. Одержані нами результати свідчать про те, що одноразове внутрішньошлункове застосування корвітину у дозі 10 мг/кг активує роботу захисних механізмів СОШ, в дозах 20 та 40 мг/кг не впливає на них, проте поступово зменшує швидкість кровотоку у слизовій, викликає порушення синтезу білка та гіперсекрецію ХК у порожнину шлунка, що, як наслідок, може призводити до порушення процесу травлення та цілісності СОШ. Ключові слова: шлунок, корвітин, кровотік, шлункова секреція, хлористоводнева кислота, білок, гексозаміни, цистеїн.

ВСТУП

Флавоноїди – це група натуральних субстанцій, досить поширених у рослинному світі у вигляді вторинних метаболітів. У них виявлено цілу низку лікувальних властивостей, зокрема антиоксидантні, антигіпертензивні, антидіабетичні, антизапальні, антипухлинні, антиульцерогенні тощо [1]. Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавонон) є одним з найбільш відомих представників даної групи. В значних кількостях його виявлено в гречці, броколі, цибулі, яблуках, різних ягодах, червоному вині тощо. За останні роки доведено, що в організмі ссавців кверцетин взаємодіє з багатьма біохімічними сигнальними механізмами як у фізіологічних, так і в патологічних умовах. В основу біохімічного і фармакологічного ефекту кверцетину, як і більшості

флавоноїдів, закладена вибіркова пригнічувальна дія на цілу низку життєво важливих ферментів клітини, що надає цим сполукам статусу специфічних біорегуляторів великої кількості ферментних процесів [1, 2]. Наразі відомо, що спрямованість клітинних ефектів флавоноїдів часто залежить від використаної дози (парадоксальна поведінка біофлавоноїдів) [3]. Показано, що введення кверцетину в культуру клітин у малих кількостях стимулює їх розвиток, підвищує антиоксидантний статус, тоді як збільшення концентрації викликає негативні явища: зменшення кількості тіолів, зниження активності ферментів, зокрема супероксиддисмутази, каталази і глутатіон-S-трансферази, а також погіршення їх загального антиоксидантного статусу [4].

Істотним недоліком, що протягом тривалого часу заважав широкому використанню

© Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельський, В.А. Барановський

кверцетину, була його мала біодоступність через слабку розчинність у воді. Тому в експерименті для досягнення потрібних ефектів при пероральному введенні цієї сполуки доводилося використовувати дози препарату 200 мг/кг і більші. За останнє десятиріччя для підвищення біодоступності флавоноїдів було розроблено різні системи доставки їх в клітину, зокрема це ліпосоми, мікросфери, наночастинки, трансферосоми, етосоми тощо. Завдяки цьому збільшилася терапевтична ефективність біофлавоноїдів [5]. В Україні створено свою модифіковану форму кверцетину – корвітин. Останній добре розчиняється у воді і фізіологічному розчині, що дає змогу йому швидко проникати в кров'яне русло і розноситися по всьому організму, до всіх тканин і клітин. У живих системах корвітин демонструє ті самі біохімічні ефекти, що й кверцетин, зокрема діє як сильний антиоксидант та інгібітор ферментів [6].

Натуральні антиоксиданти дедалі більше використовуються як терапевтичні препарати чи харчові добавки, і їх перелік постійно зростає. У зв'язку з цим постають питання щодо більш глибокого дослідження їх ефектів для встановлення оптимальних доз і норм споживання. Отримані знання можуть стати основою у створенні нових високоефективних нетоксичних препаратів для профілактики та лікування різних патологічних станів, зокрема й захворювань шлунка.

Кверцетин є превалюючим біофлавоноїдом нашого харчового раціону і потрапляє до організму через шлунок, проте його вплив на цей орган досліджений недостатньо через його низку біодоступність. Модифікована форма кверцетину – корвітин має добру розчинність, але його дія на шлунок не вивчалася. Ми вперше провели такі дослідження *in vivo* на щурах і показали, що ця сполука при введенні в шлунок у дозах 2,5 і 5 мг/кг дозозалежно посилювала роботу захисних механізмів у слизовій оболонці шлунка (СОШ) щура, при цьому не змінювала об'єму шлункового соку, загальної продукції хлористоводневої

кислоти (ХК) і загального білка [7].

Метою нашої роботи було вивчити вплив корвітину на показники шлункової секреції та об'ємну швидкість кровотоку в СОШ щура при одноразовому внутрішньошлунковому введенні препарату в дозах 10, 20 і 40 мг/кг.

МЕТОДИКА

Всю роботу проводили з дотриманням існуючих Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментах (Страсбург, 1986). Дослідження проведено в гострих експериментах на самицях білих щурів масою 220–280 г, яких утримували у віварії в умовах природного освітлення на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Щурів було поділено на 4 групи, по 6-8 тварин у кожній. Шлункову секрецію стимулювали 4-годинним перев'язуванням пілоруса [8]. Напередодні досліджень щурів тримали голодними протягом 24 год, оскільки досліджуваний препарат вводили інтрагастрально. Щурів наркотизували за допомогою тіопенталу натрію (35 мг/кг, внутрішньоочеревинно), після чого відкривали черевну порожнину та діставали шлунок. Пілоричну частину шлунка перев'язували лігатурою і через металеву орогастральну трубку в нього вводили: тваринам 1-ї групи (контроль) – фізіологічний розчин (5 мл/кг), 2, 3 і 4-ї груп – корвітин у дозах 10, 20 і 40 мг/кг відповідно, розчинений у фізіологічному розчині, об'ємом 5 мл/кг. Через 4 год щурів виводили з досліду цервікальною дислокацією, шлунки видаляли, а їх вміст збирали в градуйовані пробірки. У зібраних пробах шлункового соку визначали: його загальний об'єм, рН, концентрацію ХК, загальну продукцію ХК, білка, гексозамінів (у розрахунку на глюкозамін) та вільного цистеїну. Для визначення концентрації білка, гексозамінів і цистеїну від кожної проби відбирали 0,2 мл соку. Решту – центрифугували протягом 10 хв при 3500 хв⁻¹, супернатант переносили

в хімічні склянки, додавали до нього 5 мл дистильованої води, визначали його рН (іономір "рН-150") і титрували 0,01 N розчином NaOH до рН 7,0 для визначення продукції ХК. Вміст білка визначали спектрофотометрично за біуретовою реакцією [9], а гексозамінів і цистеїнів – за допомогою хроматографії на папері FN1. Для цього ХК шлункового соку нейтралізували 23%-м розчином аміаку в дистильованій воді у співвідношенні 0,2 : 0,1. Вільні амінокислоти екстрагували сумішшю ацетон-етанолу (3 : 1), екстракт висушували в конусоподібній пробірці. Сухий залишок розчиняли в суміші етанол-вода (1 : 1). Невеликі порції (5 мкл) наносили на хроматограму. Розділення вільних амінокислот проводили в системі розчинника, до складу якого входить: ізоаміловий спирт, бутанол, оцтова кислота, мурашина кислота і вода (9 : 5 : 5 : 1 : 5). Хроматограми фарбували 0,2 %-м розчином нінгідрину в ацетоні. Кількісну оцінку показників здійснювали на приладі «Денситометр ДО-1М» з попередньою побудовою калібрувальної кривої [10].

Швидкість кровотоку в СОШ реєстрували методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією, використовуючи полярограф LP-9, осцилограф Н071М і модифіковані нами платинові електроди [11]. Всього було 3 групи щурів (у загальному списку групи №№ 5, 6 і 7). Після 24 год голодування тварин наркотизували уретаном (1,0 г/кг, внутрішньоочередово), здійснювали лапаротомію, в шлунку робили розріз довжиною 5–6 мм, через який промивали шлунок фізіологічним розчином ($37,0 \pm 0,5$ С°), після чого в його слизову оболонку занурювали модифікований нами електрод. Корвітин вводили внутрішньошлунково тваринам 5, 6 і 7-ї груп в дозах 10, 20 і 40 мг/кг відповідно. Розрахунок об'ємної швидкості кровотоку в СОШ проводили за кривою зниження рівня напруги водню в ній після припинення генерації Н₂. Вихідні значення об'ємної швидкості кровоплину в СОШ кожної тварини визначали до моменту введення корвітину.

Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за стандартними методами варіаційної статистики з використанням W-тесту Шапіро–Вілка та критерію t Стьюдента. Відмінності між окремими групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під впливом корвітину об'єм шлункового соку у щурів дозозалежно зростав від $3,67 \pm 0,16$ мл у контрольній групі до $4,54 \pm 0,15$ ($P < 0,01$), $5,15 \pm 0,21$ ($P < 0,001$) та $8,1 \pm 0,32$ мл ($P < 0,001$) в групах тварин, яким вводили препарат у дозах 10, 20 та 40 мг/кг відповідно (рис. 1). Разом зі збільшенням кількості соку при введенні вказаних доз корвітину так само дозозалежно зростала у порівнянні з контролем, і загальна продукція ХК: від $47,7 \pm 2,97$ до $61,7 \pm 2,9$ мкмоль/год ($P < 0,01$), $123,2 \pm 11,3$ мкмоль/год ($P < 0,001$), $253,2 \pm 12,2$ мкмоль/год ($P < 0,001$) відповідно. Проте, концентрація ХК дозозалежно зростала порівняно з контролем лише після введення щурам корвітину в дозах 20 і 40 мг/кг, тоді як у дозі 10 мг/кг цей показник не змінювався. рН соку в групах 2, 3, 4 відносно групи 1, у тварин якої воно становило $2,78 \pm 0,03$, навпаки, зменшувалося: $2,65 \pm 0,03$ ($P < 0,01$), $2,59 \pm 0,05$ ($P < 0,01$), та $2,33 \pm 0,03$ ($P < 0,001$) відповідно.

На рис. 2 наведено результати впливу корвітину, що вводили в дозах 10, 20 та 40 мг/кг, на загальну продукцію білка, гексозамінів і цистеїну. Продукція білка дозозалежно зростала після введення корвітину в дозі 10 і 20 мг/кг, тоді як при 40 мг/кг спостерігалася протилежна реакція – зменшення кількості протеїнів у шлунку до значень, що були нижчими за контроль. Корвітин у дозі 10 мг/кг посилював загальну продукцію цистеїну: якщо в контрольній групі тварин вона відповідала $0,16 \pm 0,01$ мкмоль/год, то після введення корвітину – $0,22 \pm 0,02$ мкмоль/год ($P < 0,01$). Так само збільшувалася продукція гексозамінів: з $1,6 \pm 0,07$ мкмоль/мл у контролі до $2,38 \pm 0,02$

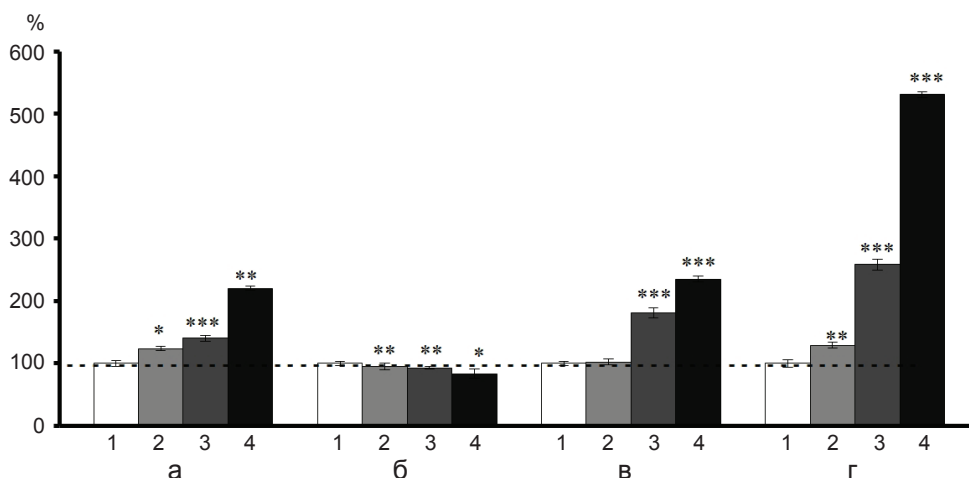


Рис. 1. Зміни показників шлункової секреції у щурів з перев'язаним пілорусом після внутрішньошлункового введення корвітину в різних дозах: а – об'єм шлункового соку, б – рН шлункового соку, в – концентрація хлористоводневої кислоти, г – загальна продукція хлористоводневої кислоти; 1 – контроль (фізіологічний розчин), 2, 3, 4 – корвітин у дозах 10, 3, 20, 4, 40 мг/кг відповідно. За 100 % прийняті значення в інтактній групі тварин (контроль). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ порівняно з контролем

мкмоль/мл ($P < 0,01$) в експериментальній групі. У відповідь на 20 і 40 мг/кг корвітину продукція як цистеїну, так і гексозамінів не відрізнялася від такої інтактної групи тварин.

Порівняння об'ємної швидкості кровотоку в СОШ до і після введення корвітину засвідчило, що останній у дозі 10 мг/кг викликав збільшення цього показника з $47,8 \pm 2,7$ до $77,75 \pm 6,26$ мл/хв · 100 г тканини ($P < 0,01$), при дозі 20 мг/кг вірогідних відмінностей не

спостерігали: $41,9 \pm 3,4$ щодо $36,8 \pm 2,7$ мл/хв · 100 г тканини, проте коли в шлунок препарат надходив у дозі 40 мг/кг, то об'ємна швидкість кровотоку в СОШ зменшувалася з $68,0 \pm 6,3$ до $26,9 \pm 0,5$ мл/хв · 100 г тканини ($P < 0,001$; рис. 3).

Шлунковий слиз, який утворюється поверхневими епітеліальними клітинами СОШ, захищає стінку шлунка від механічних і хімічних ушкоджуючих впливів. Він може

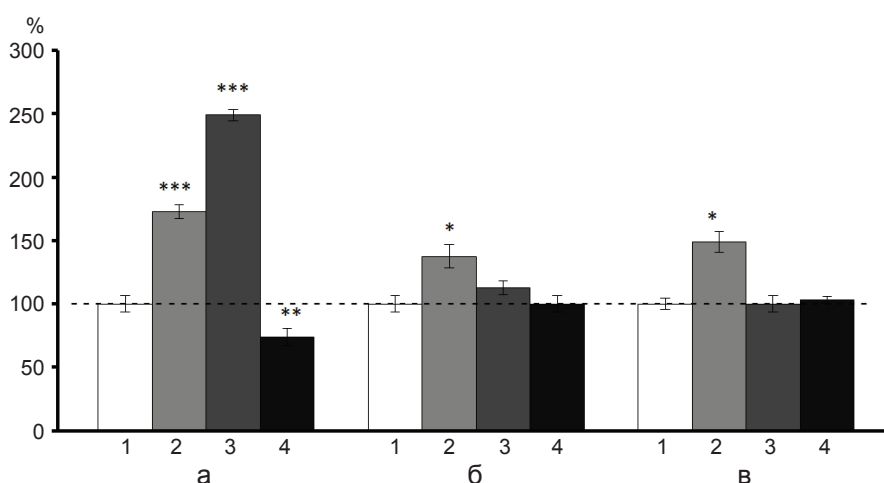


Рис. 2. Вплив корвітину на продукцію загального білка (а), гексозамінів (б) та цистеїну (в) у шлунку щура з перев'язаним пілорусом: 1 – інтактна група тварин (контроль); 2, 3, 4 – корвітин в дозах 10; 20 і 40 мг/кг відповідно. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ – порівняно з контролем

діяти як антиоксидант, нейтралізуючи вільні кисневі радикали СОШ. Протекторні можливості слизового бар'єра залежать не лише від його хімічної структури, але й від кількості чи товщини шару, який покриває поверхню СОШ. Зменшення кількості слизу робить останню вразливою до дії кислоти, аспірину чи медіаторів стресу [12]. Коли кисневі радикали генеруються поверхневим епітелієм, що містить слиз, то останній може їх вимивати. Навіть якщо слизопродукуючі клітини ушкоджуються екстрацелюлярними кисневими радикалами, внутрішньоклітинний слиз може вивільнитися в шлунок і знешкодити їх [13]. Перев'язування пілоруса супроводжується порушенням шлункового слизового бар'єра [14]. Гексозаміни є важливими компонентами шлункового слизу. В експерименті вони інактивують вільні радикали, нормалізують біосинтез білка, активність пепсину та кислотність шлункового соку. Їх також можна віднести до активних агентів травного процесу в шлунку, оскільки вони абсорбують травні ферменти. Тому зменшення кількості слизу в шлунку є передумовою не лише підвищення вразливості СОШ до дії шкідливих агентів як ендогенних, так і екзогенних, але й порушення процесу травлення [12, 15].

Шлунковий сік містить до 20 вільних амінокислот, концентрація яких тут менша,

ніж у плазмі крові. Обраний нами метод хроматографії дає змогу виявити їх у повному складі. Амінокислоти накопичуються в шлунку внаслідок секреції з клітин СОШ і внутрішнього місцевого гідролізу протеїнів і пептидів протеазами, які є в шлунковому соку. Їх вивільнення в порожнину шлунка не залежить від активності блукаючого нерва і продукції ХК [16]. З усіх виявлених нами амінокислот (19) ми розраховували лише продукцію однієї – цистеїну. Захисні властивості притаманні як цистеїну, так і сполукам, що з нього утворюються, зокрема глутатіону. Разом з простагландинами і поліамінами він є ендогенним протектором навіть при його мінімальній кількості в СОШ [17].

Кровотік, як і слиз, і сульфгідрильні сполуки, відіграє важливу роль у збереженні цілісності внутрішньої поверхні шлунка. Кров, що циркулює в мікросудинах СОШ, транспортує до клітин кисень, а також макро- і мікронутрієнти (білки, жири, вуглеводи, мінерали та вітаміни), необхідні для підтримання нормальної життєдіяльності та забезпечення функцій клітин, та виводить токсичні метаболіти. Вся СОШ пронизана густою капілярною сіткою, особливо поблизу шлункових залоз і поверхневих клітин, що продукують слиз [18]. Від стану кровотоку залежить її нормальне функціонування, тому зрозуміло,

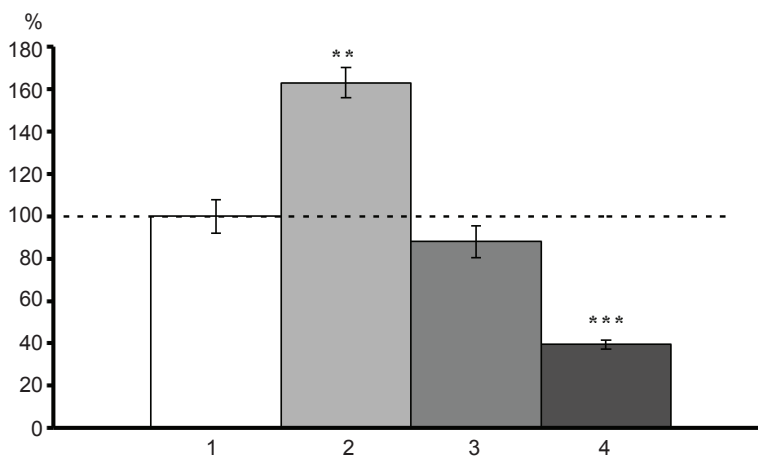


Рис. 3. Зміни об'ємної швидкості кровотоку в слизовій оболонці шлунка щурів (у відсотках від вихідного рівня – 1) після внутрішньошлункового введення корвітину у дозах 10 мг/кг – 2, 20 мг/кг – 3 та 40 мг/кг – 4. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно з вихідним рівнем

що фактори, які можуть його змінювати, будуть опосередковано впливати на всю СОШ. У попередній праці при використанні корвітину в дозах 2,5 і 5 мг/кг ми спостерігали стимуляцію секреції гексозамінів і цистеїну в порожнину шлунка на тлі дозозалежного збільшення об'ємної швидкості кровотоку в СОШ, проте як концентрація білка, так і продукція ХК не виходили за межі норми [7]. Дані літератури свідчать, що кверцетин в малих дозах захищає клітини від окисдаивних ушкоджень, а у великих – навпаки, може вступати в реакції редокс-циклу в клітинних системах, діючи як прооксидант (генерує H_2O_2) [3, 19]. В експерименті на щурах було встановлено, що внаслідок застосування кверцетину в підвищених кількостях у тканинах накопичуються продукти його аутооксидзації, які мають хіноїдальну природу та можуть реагувати в клітинах з глутатионом, змінюючи структуру та зменшуючи кількість активних молекул останнього [20].

Результати проведеної роботи свідчать, що у відповідь на введення в шлунок 10 і 20 мг/кг корвітину вміст протеїнів зростав, проте знижувався при дозі 40 мг/кг. Зменшення продукції білка в шлунку збігалось з різким погіршенням кровопостачання СОШ, а разом з цим – і надходженням амінокислот, які необхідні для синтезу білкових молекул. Одночасно з поступовим збільшенням кількості корвітину на одиницю маси зростало надходження ХК у порожнину шлунка. Незважаючи на те, що збільшувався об'єм шлункового соку, концентрація ХК істотно зростала, що вказує на її гіперсекрецію. Для пояснення тих змін у функціонуванні шлунка, які ми спостерігали при збільшенні дози корвітину, зокрема, послаблення швидкості кровотоку, гіперсекрецію ХК, можна залучити дані інших авторів, які свідчать, що в малих концентраціях кверцетин стимулює синтез простагландинів, проте збільшення його дозування викликало протилежні ефекти, тобто зменшення їх продукції [21]. Як відомо, простагландини беруть участь у

регуляції багатьох функцій шлунка, включаючи кровотік у його слизовій, секрецію слизу та ХК, зокрема простагландину E_2 [18, 22]. Згідно з даними Чіезе [23], одержаних *in vitro*, велика кількість кверцетину (220 мкмоль/л) пригнічує активність ендотеліної NO-синтази, а отже і продукцію NO. Як відомо, останній є тим фактором, який, з одного боку, регулює швидкість кровотоку в СОШ [24], а з іншого – кислу шлункову секрецію [25]. З продукцією NO в шлунку також тісно корелюють синтез і секреція гексозамінів [26]. Звісно, до тих змін, котрі викликав корвітин у функціонуванні шлунка щура і які ми спостерігали, можуть бути причетні й інші механізми, для виявлення яких варто продовжити наші дослідження.

Одержані нами результати свідчать про те, що корвітин, уведений у шлунок щура з перев'язаним пілорусом в дозах більших, ніж 10 мг/кг, поступово призводить до значного послаблення швидкості кровотоку в СОШ, порушує нормальний синтез загального білка та викликає гіперсекрецію ХК у порожнину шлунка, що може спричинювати як порушення цілісності СОШ, так і процесу перетравлювання їжі.

**Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова,
С.П. Весельський, В.А. Барановський**

ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЖЕЛУДКА КРЫСЫ ПОСЛЕ ИНТРАГА- СТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КОРВИТИНА В ПОВЫШЕННЫХ ДОЗАХ

В результате внутрижелудочного введения корвитина в дозах 10, 20 и 40 мг/кг дозозависимо увеличивались такие показатели желудочной секреции, как объем желудочного сока и общая продукция хлористоводородной кислоты (ХК). Усиление продукции гексозаминов и цистеина наблюдалось лишь тогда, когда исследуемый препарат вводили в дозе 10 мг/кг, а при больших количествах они находились на уровне контрольных значений. Продукция белка возрастала в ответ на действия 10 и 20 мг/кг корвитина, однако становилась ниже контрольных значений после введения 40 мг/кг препарата. Объемная скорость кровотока в слизистой оболочке желудка (СОЖ) возрастала после использования корвитина в дозе 10 мг/кг, не отличалась от исходного уровня после 20 мг/кг препарата и существенно

уменьшалась в ответ на 40 мг/кг флавоноида. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что разовое внутрижелудочное применение корвитина в дозе 10 мг/кг активизирует работу защитных механизмов, в дозах 20 и 40 мг/кг не влияет на таковые, однако постепенно уменьшает скорость кровотока в СОЖ, вызывает нарушение синтеза белка и гиперсекрецию ХК в полость желудка, что может привести как к нарушению пищеварительного процесса, так и целостности СОЖ.

Ключевые слова: желудок, корвитин, кровоток, желудочная секреция, соляная кислота, белок, гексозамин, цистеин.

**T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova,
S.P. Veselsky, V.A. Baranovsky**

CHANGES IN GASTRIC FUNCTIONS IN RATS AFTER INTRAGASTRIC INTRODUCTION OF CORVITIN AT HIGH DOSES

Intragastric administration of corvutin at doses of 10, 20 and 40 mg/kg dose-dependently increased the volume of gastric juice and the total production of hydrochloric acid (HA). Amplification of hexosamines and cysteine production was observed only when the study drug was administered at a dose of 10 mg/kg. When corvutin was used at 20 and 40 mg/kg, these parameters were at the level of control values. Protein production increased in response to 10 and 20 mg/kg corvutin, but fell below the control values after administration of 40 mg/kg of the drug. The level of blood flow in the gastric mucosa increased following administration of 10 mg/kg corvutin, was not different from the baseline after 20 mg/kg of the drug and significantly decreased in response to 40 mg/kg of flavonoid. Our results indicate that a single intragastric application of corvutin at dose of 10 mg/kg activates gastric defense mechanisms. At 20 and 40 mg/kg, corvutin does not affect them but gradually reduces blood flow in gastric mucosa, causes a disturbance of protein synthesis and hypersecretion of HA into the cavity of the stomach, which can lead to disruption of the digestive process and the integrity of gastric mucosa.

Key words: stomach, gastric mucosa, corvutin, blood flow, gastric secretion, hydrochloric acid, protein, hexosamines, cysteine

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

1. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids of mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673-751.
2. Gutzeit HO, Henker Y, Kind B, Franz A. Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(2):490-495.
3. Marozieni A, Nemeikaite-Ceniene A, Vidziunaite R, Ce-

- nas N. Correlation between mammalian cell cytotoxicity of flavonoids and the redox potential of phenoxyl radical/phenol couple. *Acta Biochim Pol* 2012;59(2):299-305.
4. Ranavat P, Pathak CM, Khanduja KL. A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction. *Phytother Res* 2013;27(6):802-10.
5. Kesarwani K, Gupta R, Mukerjee A. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;4:253-266.
6. Mokhort NA, Shalamay AS, Frantsuzova SB. Study of pharmacotherapeutic properties dosage forms of quercetin. In: Moibenko AA. *Bioflavonoids as organoprotectors (quercetin, corvutin, quertin)*. Kiev: Naukova Dumka; 2012. p.74-117.
7. Vovkun TV, Yanchuk PI, Shtanova LY, Veselskiy SP, Baranowskii VA. Effect of Corvutin on secretory processes and blood flow in the gastric mucosa of rats. *Physiol Zh.* 2013;59(1):40-47.
8. Shay H, Komarov S, Fels SS, Meranze D, Gruenshtein M, Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.* 1945;5:43-61.
9. Kochetkov GA. *A practical guide to enzymology*. Moscow: Higher School; 1980. 272 p.
10. Korobeinikova EM, Mescherynova TV. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Lab Work* 1981;4:221-224.
11. Yanchuk PI, Palatniy TP, Rusinchuk YI. Modified electrode for registration of local blood flow in the gastric mucosa by hydrogen clearance. *Rus Physiol J.* 2005;91(9):1108-1110.
12. Cross C, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet.* 1984;1:1328 -1330.
13. Seno K, Joh T, Yokoyama Y, Itoh M. Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. *J Lab Clin Med* 1995;126(3):287-293.
14. Sairam K, Rao ChV, Babu DM, Kumar V, Agrawal VK, Goel RK. Antiulcerogenic activity of methanol extract of *Emblia officinalis*. *J Ethnopharm* 2002;82(1):1-9.
15. Santhosh S, Anandan R, Sini TK, Mathew PT. Protective effect of glucosamine against ibuprofen-induced peptic ulcer in rats. *J Gastroenter Hepatol.* 2007;22(6):949-53.
16. Komorowska M, Szafran H, Szafran Z, Popiela T. Free amino acids in basal and vagally stimulated gastric secretion. *Acta Physiol Pol* 1989;40(5):496-503.
17. Szabo S, Nagy L, Plebani M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta* 1992;206(1):95-105.
18. Laine L, Takeuchi K, Tarnawsky A. Gastric mucosal defence and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterol* 2008;135(1):41-60.
19. Robaszekiewicz A, Balcerzyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int.* 2007;31(10):1245-50.
20. Dunnick JK, Hailey JR. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam Appl Toxicol.* 1992;19(3):423-31.
21. Banerjee N, Van der Vliet A, Ziboh VA. Downregulation

- of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. Prostaglandin Leukotr Essent Fatty Acids. 202;66 Suppl 5:485-92.
22. Araki H, Ukawa H, Sugawa Y, Yagi K, Suzuki K, Takeuchi K. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E₂ in rat stomach. Aliment Pharm and Ther. 2000;14 Suppl 1:116-124.
23. Chiesi M, Shwaller R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. Biochem Pharm. 1995;49(4):495-501.
24. Whittle BJ. Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation^integrity in the balance. Br J Pharmacol. 1993;110:3-17.
25. Shtanova LY. Effects of exogenous and endogenous nitric oxide on gastric acid secretion in rats. Physics of the Alive. 2008;16(1):128-133.
26. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Relationship between constitutive nitric oxide synthase activity and mucus level in the gastric mucosa of rats with stress. Pharmacol Res. 1998;38(5):393-400.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: shtanova@ukr.net

Матеріал надійшов до
редакції 25.10.2013

І.П. Вашека, С.П. Весельський, З.А. Горенко,
О.А. Грінченко, Л.С. Карбовська, М.Ю. Макачук

Вплив аміліну на спектр холатів у жовчі щурів

У гострих дослідах на щурах з канюльованою загальною жовчною протокою досліджено вплив аміліну на рівень секреції жовчі та спектр жовчних кислот у ній. Показано, що амілін, введений підшкірно, у дозі 1 мг/кг, не змінює об'єм секретованої жовчі. При цьому у жовчі збільшується концентрація таурохолевої кислоти, а таурокон'югатів хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот зменшується, глікохолатів – залишається незмінною, а вільних жовчних кислот зменшується. Такий перерозподіл жовчнокислотного спектра призводить до збільшення коефіцієнта кон'югації. Амілін змінює в секретованій жовчі співвідношення між три- та дигідроксисихолоновими кислотами, що призводить до збільшення коефіцієнта гідроксилювання. Це дає підстави стверджувати, що гормон посилює процеси кон'югації і гідроксилювання в гепатоцитах, покращуючи детергентні властивості жовчі, а саме її здатність утримувати холестерин у розчиненому стані. Амілін у найменшій ефективній дозі не змінює концентрацію глюкози в крові щурів.

Ключові слова: амілін, жовчоутворення, таурохолати, глікохолати, вільні жовчні кислоти.

ВСТУП

Родина кальцитонінових пептидів – це група білкових гормонів до яких належить кальцитонін, кальцитонін-генспоріднений пептид (КГСП), аденомедулін та амілін. Відомо, що останній синтезується в β -клітинах підшлункової залози та косекретується з інсуліном у відповідь на підвищення концентрації глюкози в крові [1, 2]. Таким чином, амілін разом з інсуліном та глюкагоном бере участь в підтриманні гомеостазу глюкози [3, 4]. В останні десятиліття в літературі з'явилися праці, які свідчать про ефективність застосування аміліну при лікуванні цукрового діабету [5]. Так, було показано, що у хворих на цукровий діабет гормон зменшує коливання вмісту глюкози в крові впродовж доби та після вживання їжі. Тому нині синтетичний аналог аміліну прамлентид (“Symlin”), використовується в медичній практиці при комплексному лікуванні цукрового діабету. Крім регуляції концентрації глюкози амілін виконує низку інших важливих функцій в організмі людини і тварин. Він може активувати

ренін-ангіотензинову систему, стимулюючи реабсорбцію води та натрію в проксимальних канальцях нирок, і, залежно від дози, чинити як гіпер-, так і гіпотензивний вплив [6, 7, 8, 9]. Важливою функцією аміліну є його вплив на діяльність органів шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Показано, що він пригнічує моторику ШКТ, гальмує евакуацію шлункового вмісту та подальший транзит хімусу до кишечника [10]. Однак є лише поодинокі дослідження щодо впливу аміліну на діяльність гепатобіліарної системи [11]. Зокрема, Young зі співавт. повідомляють, що амілін пригнічує скорочення жовчного міхура та зменшує об'єм секретованої жовчі у мишей [11]. Наразі залишається практично не вивченим вплив гормону на якісний склад жовчі. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив аміліну на рівень секреції жовчі та спектр жовчних кислот у ній.

МЕТОДИКА

Гострі досліди проведені на самцях білих лабораторних щурів масою 200–250 г. Тварини знаходилися на звичайному харчовому

© І.П. Вашека, С.П. Весельський, З.А. Горенко, О.А. Грінченко, Л.С. Карбовська, М.Ю. Макачук

раціоні віварію, а за 18–20 год перед дослідом вони підлягали харчовій депривації з вільним доступом до води. Щоб уникнути похибок в оцінці отриманих результатів, пов'язаних із впливом добового обмінного ритму на холерез, дослідження проводили в один і той самий час доби (10.00–15.00). Оперативне втручання здійснювали під тіопенталовим наркозом (75 мг/кг у 1 мл фізіологічного розчину, внутрішньоочеревинно), під час якого у відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили тонку канюлю, з'єднану з мікропіпеткою, в яку збирали жовч. Тваринам дослідної групи підшкірно вводили амелін (Diabetes Associated Peptide Amide human, «Sigma», США) в дозі 1 мг/кг маси тіла (це найменша ефективна доза гормону [11]), розчинений у фізіологічному розчині з розрахунку об'єму 1 мл/кг. Контролем були досліди із підшкірним введенням тваринам відповідного об'єму фізіологічного розчину. Після ін'єкції амеліну збирали 6 півгодинних порцій жовчі, враховуючи її об'єм (в мікролітрах). У кожній відібраній пробі жовчі методом тонкошарової хроматографії та за допомогою денситометра ДО-1М визначали концентрації вільних (холева – ХК, хенодезоксихолева – ХДХК і дезоксихолева – ДХК) та кон'югованих (таурохолева – ТХК, таурохенодезоксихолева – ТХДХК, тауродезоксихолева –

ТДХК, глікохолева – ГХК, глікохенодезоксихолева – ГХДХК та глікодезоксихолева - ГДХК) жовчних кислот [12].

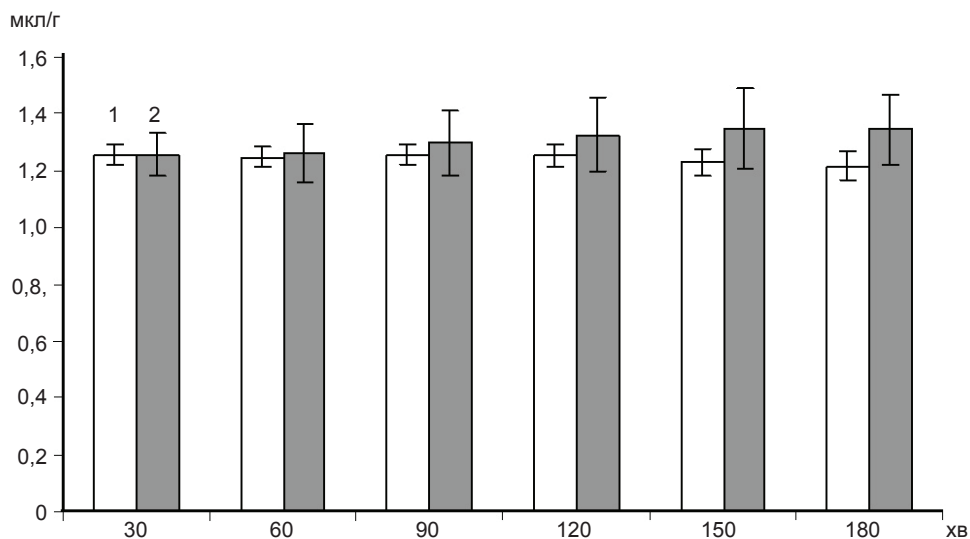
Визначення концентрації глюкози проводили в периферичній капілярній крові щурів, використовуючи глюкометр «Ortium Xceed», на початку досліду (вихідний рівень), через 30 і 60 хв після введення амеліну (дослідна група) або фізіологічного розчину (контрольна).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistica 6.0, використовуючи критерій t Стюдента, оскільки вони мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро–Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності між контролем і дослідом при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших досліджень показали, що амелін, введений підшкірно, в дозі 1 мг/кг не впливає на рівень холерезу у щурів, оскільки застосування пептиду статично вірогідно не змінювало об'єму секретованої жовчі щодо контролю (рисунок).

Під впливом гормону спостерігалася тенденція до збільшення концентрації ТХК у жовчі щурів, але достовірними ці зміни були



Динаміка секреції жовчі у щурів під впливом амеліну: 1 – контроль (n=15), 2 – амелін (n=6)

лише в другій – 17,1 % ($P < 0,01$) та третій – 16,4 % ($P < 0,05$) півгодинних пробах (табл. 1). На відміну від ГХК, концентрація ТХДХК і ТДХК достовірно зменшилася в другій половині досліду і була нижчою за показники контролю в четвертій пробі на 10,8 % ($P < 0,05$), в п'ятій на 13,1 % ($P < 0,05$) і в шостій на 16,9 % ($P < 0,01$; див. табл. 1). При дії амліну концентрація як ГХК, так і суміші ТДХК і ТХДХК не змінилася.

Результати хроматографічного аналізу свідчать, що амлін зменшує концентрацію ХК у першому, другому, третьому, четвертому, п'ятому і шостому півгодинних проміжках ($P < 0,05$; див. табл. 1). Спостерігалось також подібне достовірне зменшення у жовчі і сумарної концентрації ХДХК і ДХК (див. табл. 1).

У жовчі контрольних щурів концентрація як кон'югованих, так і вільних жовчних кислот впродовж досліду зменшується. При дії амліну в перші півтори години значуще збільшуються концентрації кон'югованих холатів, тоді як концентрація вільних жовчних кислот зменшується у порівнянні з контролем. Внаслідок такого перерозподілу жовчних кислот на користь кон'югованих холатів спостерігається збільшення коефіцієнта кон'югації (табл. 2).

Результати наших досліджень показали, що під впливом амліну у жовчі щурів змінюється і співвідношення три- та дигідроксихоланових жовчних кислот (табл. 3). У жовчі контрольних тварин концентрація як три-, так і дигідроксильованих холатів впродовж 3 год спостереження зменшується. При цьому відсоткове співвідношення між цими групами кислот змінюється і становить в першій пробі 73,5:26,5 % а в останній – 75:25 %. Внаслідок таких змін значення коефіцієнта гідроксилування зростає від 2,77 на початку досліду до 3,0 наприкінці (див. табл. 3). Під впливом амліну концентрація тригідроксихоланових жовчних кислот статистично достовірно збільшується в другій та третій півгодинах досліду. Так, якщо в контролі відсоткове співвідношення три- – дигідроксихоланові

жовчні кислоти становило в другій півгодинах 73,9:26,1 %, а в третій – 74:26 %, то після застосування амліну воно було 75,6:24,4 % та 76,7:23,3 % відповідно. Коефіцієнт гідроксилування при цьому збільшився і становив у другі 30 хв спостереження 3,10 і в треті – 3,30 тоді як у контролі – 2,83 та 2,85 відповідно. Крім того, при дії амліну зменшується концентрація дигідроксихоланових жовчних кислот у другій половині досліду. У контролі співвідношення три- – дигідроксихолатами було в четвертій пробі 74,5:25,5 %, в п'ятій – 74,9:25,1 % і в шостій – 75:25 %, а під впливом амліну ці значення становили 77:33 %; 77,2:22,8 %; 76,8:23,2 % відповідно. При цьому коефіцієнт гідроксилування збільшився у четвертій півгодинах досліду до 3,35, в п'ятій – 3,38 і в шостій – 3,31 щодо відповідних зачень у контролі 2,91; 2,98; 3,0. Отже, при дії амліну збільшується коефіцієнт гідроксилування, що свідчить про покращення детергентних властивостей жовчі.

Відомо, що амлін має анорексичний вплив на організм людини і тварин. Зокрема показано, що після його підшкірного введення пригнічується апетит у щурів та зменшується кількість спожитої ними їжі [13, 14]. А результати обстеження хворих на діабет свідчать, що після застосування амліну прискорюється відчуття насичення та зменшується надмірна маса тіла [15]. За даними літератури апетит і відчуття насичення залежать від концентрації глюкози в крові, тому ми дослідили як вона змінюється у щурів при дії амліну [16, 17]. Результати наших досліджень показали, що при введенні амліну цей показник у контрольній і дослідній групах на початку досліду становив $3,38 \pm 0,18$ і $3,24 \pm 0,14$ ммоль/л, через 30 і 60 хв – $2,44 \pm 0,05$; $2,73 \pm 0,10$ і $2,86 \pm 0,25$; $2,95 \pm 0,15$ ммоль/л відповідно. Отже, введення амліну в найменшій ефективній дозі не змінювало концентрацію глюкози в крові.

Нині відомо, що рецептори до амліну представлені не лише в центральній нервовій системі, де вони експресуються в ділянці агеа

postrema і прилеглих ядрах прозорої перетинки, а й в м'язах, нирках, селезінці, ШКТ і печінці [3, 18, 19, 20]. Не існує єдиної думки щодо їхньої локалізації на клітинах печінки.

Так, Коортманс зі співавт. [21] повідомляють, що амелін регулює обмін глюкози в гепатоцитах щурів, зв'язуючись з невідомими рецепторами. Stephens зі співавт. [22] показали, що

Таблиця 1. Вплив амеліну на концентрацію (мг/дл) жовчних кислот у жовчі щурів (M±m)

Жовчні кислоти	Півгодинні проміжки часу	Контроль (n=15)	Амелін (n=6)
Таурохолева кислота	1	176,8±5,06	185,1±5,95
	2	177,1±4,72	207,4±5,80**
	3	173,7±4,21	202,1±5,86**
	4	168,6±4,36	184,6±6,81
	5	164,8±4,27	171,3±5,25
	6	160,2±4,25	161,1±5,60
Таурохенодезоксихолева і тауродезоксихолева кислота	1	87,2±2,58	89,0±4,74
	2	86,1±2,42	91,0±4,47
	3	84,8±2,26	81,4±2,33
	4	81,4±2,23	72,6±2,02*
	5	77,9±2,44	67,7±1,62*
	6	75,1±2,51	62,4±2,29**
Глікохолева кислота	1	141,0±4,98	135,4±5,16
	2	140,4±3,80	150,9±5,23
	3	139,4±3,59	145,1±5,87
	4	135,0±3,71	134,2±3,73
	5	130,9±3,78	126,6±4,52
	6	127,0±4,09	106,1±3,30
Глікохенодезоксихолева і глікодезоксихолева	1	24,9±2,32	23,8±2,63
	2	23,8±1,88	22,7±1,95
	3	23,7±1,65	21,6±2,03
	4	22,0±1,49	20,3±1,95
	5	20,4±1,40	18,2±1,36
	6	20,0±1,63	15,9±0,83
Холева кислота	1	28,3±1,81	21,5±1,56*
	2	29,4±1,55	21,7±2,68*
	3	26,2±1,49	20,0±2,13*
	4	25,8±1,44	19,7±1,67*
	5	23,5±1,45	18,3±1,27*
	6	22,9±1,29	17,8±1,09*
Хенодезоксихолева і дезоксихолева	1	11,0±0,62	8,83±0,64*
	2	11,1±0,49	8,98±1,83*
	3	10,5±0,58	8,48±0,54*
	4	9,60±0,35	8,14±0,43*
	5	8,90±0,26	7,64±0,44*
	6	8,30±0,48	7,58±0,35

Примітки. Тут і в табл. 2 і 3. *P<0,05; **P<0,01 щодо контролю.

Таблиця 2. Зміни коефіцієнта кон'югації під впливом аміліну (M±m)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Контроль (n=15)	Амілін(n=6)
Сумарна концентрація кон'югованих жовчних кислот, мг/дл	1	415,1±9,45	433,3±16,4
	2	417,4±7,95	471,9±15,8**
	3	413,6±8,01	450,2±14,3*
	4	411,0±11,7	411,8±11,9
	5	397,9±11,5	383,8±10,2
	6	386,3±11,8	345,6±10,6
Сумарна концентрація вільних жовчних кислот, мг/дл	1	39,1±2,49	31,1±2,24*
	2	39,2±2,01	30,7±3,04*
	3	37,2±2,01	28,4±2,66*
	4	34,8±1,88	27,9±2,05*
	5	32,2±1,68	25,9±1,67*
	6	31,2±1,69	25,3±1,42*
Коефіцієнт кон'югації	1	10,6	13,9
	2	10,6	15,4
	3	11,1	15,9
	4	11,8	14,8
	5	12,4	14,8
	6	12,4	13,7

Таблиця 3. Зміни коефіцієнта гідроксилування під впливом аміліну (M±m)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Контроль(n=15)	Амілін(n=6)
Сумарна концентрація тригідроксихоланових жовчних кислот, мг/дл	1	344,6±7,35	342,0±9,72
	2	342,4±5,98	380,0±7,82*
	3	337,1±5,42	367,2±9,08*
	4	328,4±5,47	338,6±9,52
	5	319,1±5,41	316,2±7,65
	6	310,1±5,78	285,0±8,40*
Сумарна концентрація дигідроксихоланових жовчних кислот, мг/дл	1	124,1±3,43	122,4±6,23
	2	120,7±2,70	122,6±5,66
	3	118,2±1,97	111,4±3,60
	4	112,5±2,09	101,1±2,90**
	5	107±2,21	93,6±2,87**
	6	103,4±2,15	86,0±2,88***
Коефіцієнт гідроксилування	1	2,77	2,79
	2	2,83	3,10
	3	2,85	3,30
	4	2,91	3,35
	5	2,98	3,38
	6	3,0	3,31

рецептори до гормону відсутні на гепатоцитах і локалізовані на непаренхімних клітинах печінки щурів. Однак вони суперечать даним Houslay зі співавт. [23], які в досліджах на ізольованих гепатоцитах щурів з'ясували, що амелін, зв'язуючись з мембранними рецепторами, підвищує вміст внутрішньоклітинного цАМФ. Тому ми можемо припускати можливість існування різних механізмів дії гормону. Відомо, що на базолатеральній мембрані гепатоцитів наявний транспортер жовчних кислот NTCP, який має високу спорідненість до таурохолатів і є чутливим до коливання внутрішньоклітинного вмісту цАМФ [24]. Так, якщо амелін зв'язується з власними рецепторами на гепатоцитах і підвищує цей показник, можна припускати, що гормон активує базолатеральний транспортер NTCP і забезпечує перенесення таурохолевої кислоти з крові до гепатоцита. Крім того, на каналікулярній мембрані розташовані транспортери кон'югованих жовчних кислот – Mdr2 і BSEP, які мають високу спорідненість до кон'югованих з таурином жовчних кислот і також чутливі до коливань внутрішньоклітинного вмісту цАМФ [25, 26]. Зважаючи на це ми можемо припускати, що амелін, зв'язуючись з власними рецепторами, посилює як перенесення таурохолевої кислоти з синусоїда в гепатоцит, так і її транспорт у жовч.

Крім безпосередньої дії на гепатоцити через власні рецептори, амелін може опосередковано впливати на зовнішньосекреторну функцію печінки. Відомо що цей гормон є представником родини кальцитонінових пептидів, до якої належать кальцитонін, КГСП та адреномедулін. За даними літератури, всі гормони кальцитонінової родини мають власні рецептори і проявляють перехресну реактивність між собою та власними рецепторами [19, 27, 28, 29, 30]. Результати наших досліджень свідчать, що при дії амеліну зменшується концентрація вільних жовчних кислот у жовчі. У наших попередніх працях було показано, що під впливом кальцитоніну цей показник також знижується [31]. Тому ми

можемо припустити, що амелін може впливати на концентрацію вільних жовчних кислот, взаємодіючи з кальцитоніновими рецепторами C1b, які локалізовані на гепатоцитах [29, 32]. Крім того, за даними літератури, амелін має найвищу спорідненість з рецепторами КГСП, які також наявні на клітинах печінки [9, 18, 19, 33]. До того ж, рецептори до амеліну локалізовані в центральній нервовій системі, зокрема, в ділянці *area postrema* та прилеглих ядрах прозорої перетинки, що вказує на можливість залучення центральних механізмів до реалізації ефектів кальцитоніну на рівні цілісного організму [11, 18].

ВИСНОВКИ

1. Амелін, застосований підшкірно в дозі 1 мг/кг, не впливає на рівень холерезу у щурів.
2. При дії амеліну збільшується концентрація таурохолевої кислоти, а таурококон'югатів хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот зменшується.
3. Під впливом амеліну в жовчі зменшується концентрація вільних жовчних кислот, а глікохолатів залишається незмінною.
4. Амелін покращує детергентні властивості жовчі, посилюючи кон'югацію та гідроксилування холанових кислот.
5. Амелін за найменшої ефективної дози не змінює концентрацію глюкози в крові щурів.

И.П. Вашека, С.П. Весельский, З.А. Горенко, О.А. Гринченко, Л.С. Карбовская, Н.Е. Макаrchук

ВЛИЯНИЕ АМИЛИНА НА СПЕКТР ХОЛАТОВ В ЖЕЛЧИ КРЫС

В острых опытах на крысах с канюлированным общим желчным протоком изучали влияние амилина на уровень секреции желчи и спектр желчных кислот в ней. Показано, что амилин, введенный подкожно в дозе 1 мг/кг, не влияет на объем секретируемой желчи. При этом в желчи увеличивается концентрация таурохолевої кислоты, а таурококон'югатів хенодезоксихолевої и дезоксихолевої кислот уменьшается, тогда как гликохолатов остается неизменной, а свободных желчных кислот уменьшается. Такое перераспределение желчнокислотного спектра приводит к увеличению коэффициента кон'югации. Амилин изменяет в секретируемой желчи соотношение между

три- и дигидроксихолановыми кислотами, что приводит к увеличению коэффициента гидроксирования. Это даёт основания утверждать, что этот гормонин влияет на процессы конъюгации и гидроксирования холановых кислот в гепатоцитах, улучшая детергентные свойства желчи, а именно ее способность удерживать холестерин в растворенном состоянии. Амилин в наименьшей эффективной дозе не изменяет концентрацию глюкозы в крови крыс.

Ключевые слова: амилин, желчеобразование, таурохолаты, гликохолаты, свободные желчные кислоты.

**I.P.Vasheka, S.P.Veselsky, Z.A.Gorenko,
O.A.Grinchenko, L.S.Karbovska, M.Y.Makarchuk**

THE INFLUENCE OF AMYLIN ON THE BILE ACID SPECTRUM IN RATS

In acute experiments on the rats with cannulated common biliary duct, the influence of amylin on the level of bile secretion and bile acids spectrum was investigated. It was shown that subcutaneous administration of amylin at the dose 1 mg/kg body weight doesn't affect the volume of secreted bile. Under these conditions, the concentration of taurocholic acid was increased and the concentration of tauroconjugates of cheno-deoxycholic and deoxycholic acids was decreased in the bile. At the same time, the concentration of glycocholates remained constant and of unconjugated bile acids was decreased. This redistribution of bile acids spectrum leads to an increase in the coefficient of conjugation. Amylin changes the ratio of tryglydroxy- and dyglydroxycholates in secreted bile leading to an increase in the coefficient of hydroxylation. These results suggest that amylin enhances the processes of conjugation and hydroxylation of bile acids in hepatocytes that results in improvement of detergent properties of the bile, particularly, the ability of the bile to maintain the cholesterol in dissolved state. At the lowest effective dose, amylin does not alter the concentration of glucose in the blood.

Key words: amylin, bile formation, taurocholates, glycocholates, unconjugated bile acids.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

- Otrebska D. Amylin – new peptide from B-cells of pancreatic islets. *Pol Arch Med Wewn.* 1993 Jun; 89(6):507-511.
- Wookey P, Xuereb L, Tikellis C, Cooper M. Amylin in the periphery. *Scientif World J.* 2003 Mar 24;24(3):163-175.
- Beaumont K, Pittner R, Moore C, Wolfe-Lopez D, Prickett K, Young A, Rink T. Regulation of muscle glycogen metabolism by CGRP and amylin: CGRP receptors not involved. *Br J Pharm.* 1995 July;115(5):713-715.
- Moreno P, Acitores A, Gutierrez-Rojas I, Nuche-Berengue B, El Assar M, Rodriguez-Manas L, Gomis R, Valverde I, Visa M, Malaisse W, Novials A, Gonzalez N, Villanueva-Penacarrillo M. Amylin effect in extrapancreatic tissues

- participating in glucose homeostasis, in normal, insulin-resistant and type 2 diabetic state. *Peptides.* 2011 Oct; 32(10):2077-2085.
- Grunberger G. Novel therapies for the management of type 2 diabetes mellitus: Part 1. Pramlintide and bromocriptine-QR. *J. Diabet.* 2013; 5:110-117.
- Haynes J, Hodgson W, Cooper M. Rat amylin mediates a pressor response in the anaesthetised rat: implications for the association between hypertension and diabetes mellitus. *Diabetolog.* 1997 Mar; 40(3):256-261.
- Yong A, Rink T, Wang M. Dose response characteristics for the hyperglycemic, hypercalcemic, hypotensive and hypocalcemic actions of amylin and calcitonin gene-related peptide-I (CGRP-alpha) in the fasted, anaesthetized rat. *Life Scien.* 1993; 52(27):1717-1726.
- Vine W, Smith P, LaChappell R, Blasé E, Young A. Effects of rat amylin on renal function in the rat. *Horm Metab Res.* 1998 Aug; 30(8):518-522.
- Zhu G, Dudley D, Saltiel A. Amylin increases cyclic AMP formation in L6 myocytes through calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jun 14; 177(2):771-776.
- Gedulin B, Jodka C, Herrmann K, Young A. Role of endogenous amylin in glucagon secretion and gastric emptying in rats demonstrated with the selective antagonist AC187. *Regul Pept.* 2006 Dec 10;137(3):121-127.
- Young A. Amylin. *Pharm.* 2005; 52:229-234.
- SU 1624322 A1 copyright certificate description No. 4411066/14 IPC G 01 N 33/50 A method for determination of bile acids in biological liquid Veselsky S.P., Lyashenko P.S., Lukyanenko I.A. [in Russian]
- Potes C, Lutz T. Brainstem mechanisms of amylin-induced anorexia. *Physiol Behav.* 2010 Jul 14; 100(5):511-518.
- Potes C, Turek V, Cole R, Vu C, Roland B, Roth J, Riediger T, Lutz T. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin's hypophagic action. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 Aug; 299(2):623-631.
- Hermann K, Frias J, Edelman S, Lutz K, Shan K, Chen S, Maggs D, Kolterman O. Pramlintide improved measures of glycemic control and body weight in patients with type 1 diabetes mellitus undergoing continuous subcutaneous insulin infusion therapy. *Postgrad Med.* 2013 May; 125(3):136-144.
- Pan J, Berdanier C. Dietary fat saturation affects glucose metabolism without affecting insulin receptor number and affinity in adipocytes from BHE rats 1. *J Nutr.* 1991 Dec 20; 121:1811-1819.
- Teff K, Petrova M, Havel P, Townsend R. 48-h-Glucose infusion in humans: effect on hormonal responses, hunger and food intake. *Physiol Behav.* 2007 Apr 23; 90(5):733-743.
- Bhogal R, Smith D, Bloom S. Investigation and characterization of binding sites for islet amyloid polypeptide in rat membranes. *Endocrinol.* 1992 Feb;130(2):906-913.
- Chantry A, Leighton B, Day A. Cross-reactivity of amylin with calcitonin-gene-related peptide binding sites in rat liver and skeletal muscle membranes. *Biochem J.* 1991; 277:139-143.

20. Cherrington N, Hartley D, Li N, Johnson D, Klaassen C. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1,2, and 3 (Mrp1, 2 and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharm Experiment Therapeutic*. 2002;30(1):97-104.
21. Koopmans S, Mansfeld A, Jansz H, Krans H, Radder J, Frolich M, Boer S, Kreutter D, Andrews G, Maassen J. Amylin-induced in vivo insulin resistance in conscious rats: the liver is more sensitive to amylin than peripheral tissues. *Diabetolog*. 1991; 34(4):218-224.
22. Stephens T, Heath W, Hermeling R. Presence of liver CGRP/Amylin receptors in only nonparenchymal cells and absence of direct regulation of rat liver glucose metabolism by CGRP/Amylin. *Diabetes*. 1991 Mar; 40:395-400.
23. Houslay M, Morris N, Savage A, Marker A, Bushfield M. Regulation of hepatocyte adenylate cyclase by amylin and CGRP: a single receptor displaying apparent negative cooperatively towards CGRP and simple saturation of kinetics for amylin, a requirement for phosphodiesterase inhibition to observe elevated hepatocyte cyclic AMP levels and the phosphorylation of Gi-2. *J Cel Biochem*. 1994; 55:66-82.
24. Hagenbuch B, Meier P. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest*. 1994 Mar;93(3):1326-1331.
25. Kusters A, Karpen S. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotic*. 2008;38(7-8):1043-1071.
26. Misra S, Varticovski L, Arias I. Mechanisms by which cAMP increases bile secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *AJP – Gastrointest. Liver Physiol*. 2003 Apr 17; 285:316-324.
27. Cornish J, Callon K, Bava U, Kamona S, Cooper G, Reid I. Effects of calcitonin, amylin and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone*. 2001 Aug; 29(2):162-168.
28. Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*. 2008 Nov; 43(5):813-818.
29. Poyner D.R, Sexton P.M, Marshall I, Smith D.M, Quirion R, Born W, Muff R, Fisher J, Foord S.M. International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2002; 54:233-246.
30. Muff R, Born W, Fischer J. Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Diabetolog*. 1991 Apr; 34(4):218-224.
31. Горенко З.А, Карбовська Л.С, Вашека І.П, Весельський С.П. Вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки у щурів. *Фізіол журн*. 2011;57(3):40-48.// Gorenko Z.A, Karbovska L.S, Vascheka I.P, Veselsky S.P. The influence of calcitonin on the liver bile formation function in rats *Fiziol Zh*. 2011;57(3):40-48. [in Ukrainian]
32. Bracq S, Machairas M, Clement B, Pidoux E, Andreoletti M, Moukhtar M.S, Jullienne A. Calcitonin gene expression in normal human liver. *FEBS Lett*. 1993 Sept 27; 331(1-2):15-18.
33. Morishita T, Yamaguchi A, Fujita T, Chiba T. Activation of adenylate cyclase by islet amyloid polypeptide with COOH-terminal amide via calcitonin gene-related peptide receptors on rat liver plasma membranes. *Diabetes*. 1990 Jul; 39(7):875-877.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: iryn4ik4@yandex.ua

Матеріал надійшов
до редакції 13.11.2013

В.Я. Березовський, Л.М. Плотнікова, С.П. Весельський, І.Г. Літовка

Життєдіяльність мезенхімальних стромальних клітин за умов зниженого парціального тиску кисню

Досліджено вплив зниженого парціального тиску кисню (P_{O_2}) на амінокислотний склад культуральної рідини мезенхімальних стромальних клітин (МСК) лінії 4BL людини. Зареєстровано вірогідне зниження концентрації проліну й оксипроліну при 23 мм рт. ст. (3 % кисню) на 31 %, а серину і аспарагінової кислоти на 45 % відносно контролю. Максимальне споживання необхідних для синтезу колагену вільних амінокислот із культуральної рідини (проліну і оксипроліну на 42 %, серину і аспарагінової кислоти на 62 %) спостерігали при P_{O_2} у газовій фазі середовища 38 мм рт. ст. (5 % O_2). При P_{O_2} 76 мм рт. ст. (10 % O_2) нестача амінокислот проліну і оксипроліну становила лише 21 %, а глутаміну і аланіну – 12 % відносно контролю. Таке співвідношення інтенсивності споживання амінокислот може свідчити про те, що максимальна життєдіяльність МСК відбувається при P_{O_2} 38 мм рт. ст.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, амінокислотний склад, парціальний тиск кисню.

ВСТУП

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) широко використовуються у регенеративній медицині та трансплантології. Основними їх джерелами вважають кістковий мозок, жирову тканину, плаценту, пуповину, тощо [1–3]. Ці клітини синтезують такі компоненти позаклітинного матриксу: фібронектин, колаген, гіалуронову кислоту, протеоглікани тощо [4].

У вигляді нерозчинних позаклітинних волокон колаген входить до складу кісток, сухожилля, судин, хрящів і шкіри. Цей фібрилярний білок забезпечує міцність та еластичність сполучної тканини організму. Амінокислотний склад колагену відрізняється від інших білків. Поліпептидний ланцюг молекули колагену складається з 19 амінокислот, основними з яких є гліцин (27,2 %), пролін (15,1 %), глутамінова кислота (11,3 %), аланін (9,5 %). У первинній структурі білка немає триптофану, цистину, а також низький вміст тирозину та метіоніну. Колаген характеризується наявністю оксипроліну й оксилізіну (до

23 %), які не зустрічаються в інших білках. Ці амінокислоти відіграють надзвичайно важливу роль у стабілізації триспиральної конформації молекул білка [5–7].

Парціальний тиск кисню (P_{O_2}) є одним із факторів, що забезпечує функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його систем, тканин і клітин. У дослідженнях *in vivo* та *in vitro* відтворені численні спроби встановити ефекти змін P_{O_2} на фізіологічні процеси МСК. Однак отримані дані про вплив штучної газової суміші на синтез колагену неоднозначні. Це пов'язано насамперед з умовами проведення дослідження: рівнем P_{O_2} , загальною тривалістю дії газових сумішей, співвідношенням періодів гіпо- та реоксигенації [8–10].

Метою нашої роботи було дослідження впливу зниженого P_{O_2} на амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4BL людини.

МЕТОДИКА

Клітинна лінія 4BL – це мультипотентні МСК, одержані з периферичної крові здоро-

вого донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Клітинна лінія отримана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [11].

Для вирощування клітин лінії 4BL використовували середовище Ігла у модифікації Дюльбекко (DMEM, від англ. Dulbecco's modified Eagles medium; "Sigma", США) із додаванням 10%-ї ембріональної сироватки теляти ("Sigma", США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини культивували при 37°C у скляних чашках Петрі (d=35 мм). Контрольну групу клітин тримали в стандартних умовах CO₂-інкубатора: 5 % CO₂ і 95 % повітря (20 % O₂, що відповідає 159 мм рт. ст.). У дослідних варіантах використано три газові суміші зі зниженим парціальним тиском кисню такого складу:

- 1) 3 % O₂ (23 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 92 % N₂;
- 2) 5 % O₂ (38 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 90 % N₂;
- 3) 10 % O₂ (76 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 85 % N₂.

Клітини інкубували протягом 24 год у газових сумішах, потім переносили у CO₂-інкубатор без зміни живильного середовища. Проби культуральної рідини відбирали на 3-тю (72 год) й 4-ту (96 год) добу культивування клітин.

Концентрацію вільних амінокислот (гліцин і метіонін, пролін і оксипролін, серин і аспарагінова кислота, аланін і глутамін) у культуральній рідині визначали методом тонкошарової хроматографії. Для цього до

1 мл безклітинного живильного середовища додавали 2 мл суміші спирту та ацетону (1:3), перемішували і через 30 хв центрифугували (10 хв при 3 000 хв⁻¹). Супернатант випарювали до 1 мл і наносили на хроматографічний папір по 20 мкл. Використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт, бутиловий спирт, оцтову кислоту, мурашину кислоту та воду (9:7:4:2:5 за об'ємом) [12, 13].

Результати обробляли з використанням програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 7,5. Для оцінки вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень показали, що концентрація вільних амінокислот гліцину (дефіцит призводить до порушення структури сполучної тканини) і метіоніну у культуральній рідині (при 10 % O₂) на 3-тю добу культивування вища на 85 % (P<0,05) порівняно з контролем (рис. 1,а). На 4-ту добу цей показник зріс лише на 9 % (див. рис. 1,б). Концентрація амінокислот у 1-й і 2-й дослідних групах (3 % та 5 % O₂) за той самий період була вірогідно більшою на 60 і 47 % відповідно (див. рис. 1,б), порівнюючи з контрольним зразком.

У процесі культивування МСК в умовах зниженого Po₂ на 3-тю добу концентрація

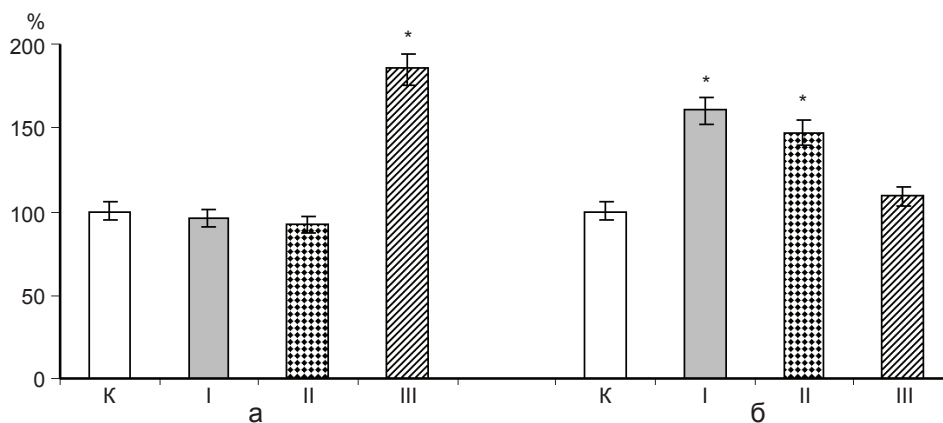


Рис. 1. Концентрація гліцину і метіоніну у культуральній рідині контрольних (К – 20 % O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

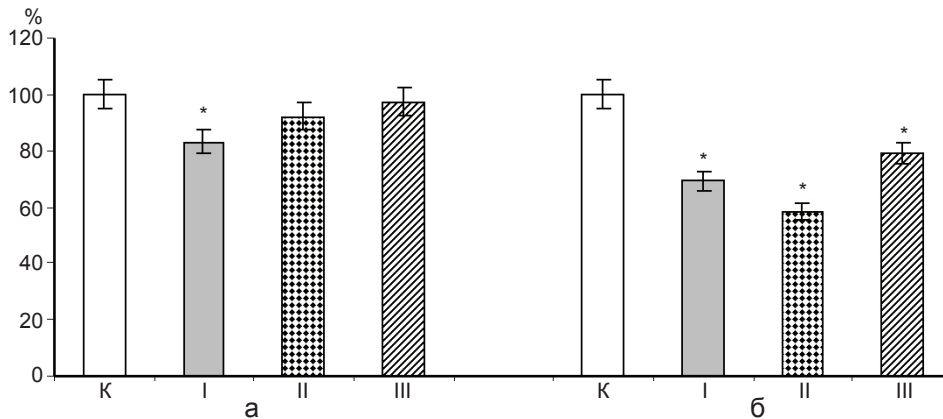


Рис. 2. Концентрація проліну і оксипроліну у культуральній рідині контрольних (К– 20 % O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

проліну (основний елемент колагену) і оксипроліну майже не змінювалася відносно контролю (рис. 2,а). На 4-ту добу їх вміст знизився в усіх дослідних групах: у 1-й на 31 %, у 2-й – 42 %, у 3-й – 21 % (див. рис. 2,б).

Вміст вільних амінокислот серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині МСК знижувався залежно від часу культивування у газовому середовищі з Po₂ 23 і 38 мм рт. ст. (рис. 3,а,б). На 4-ту добу – у 1-й і 2-й групах їх концентрація вірогідно зменшилася на 45 і 62 % (P<0,05) відповідно щодо контролю (див. рис. 3,б).

Концентрація вільного аланіну (бере участь у синтезі колагену) і глутаміну на 3-тю добу культивування клітин у всіх досліджуваних групах не відрізнялася від

значень контролю (рис. 4,а). Тоді як на 4-ту добу їх вміст був вищим у 1-й і 2-й групах на 19 та 23 % відповідно (див. рис. 4,б), і зменшувався у 3-й – на 12 % порівняно з контролем.

Наведені результати дають змогу зробити висновок, що концентрація найбільш значущих для сполучної тканини вільних амінокислот, які безпосередньо беруть участь у синтезі колагену змінювалася по-різному. Аналіз змін вільних амінокислот культуральної рідини МСК лінії 4BL людини показав їх значну чутливість до змін Po₂. Так, ми спостерігали вірогідне зниження концентрацій проліну і оксипроліну; серину та аспарагінової кислоти на 4-ту добу культивування при Po₂ 23 мм рт. ст., проте максимальний ефект отримано

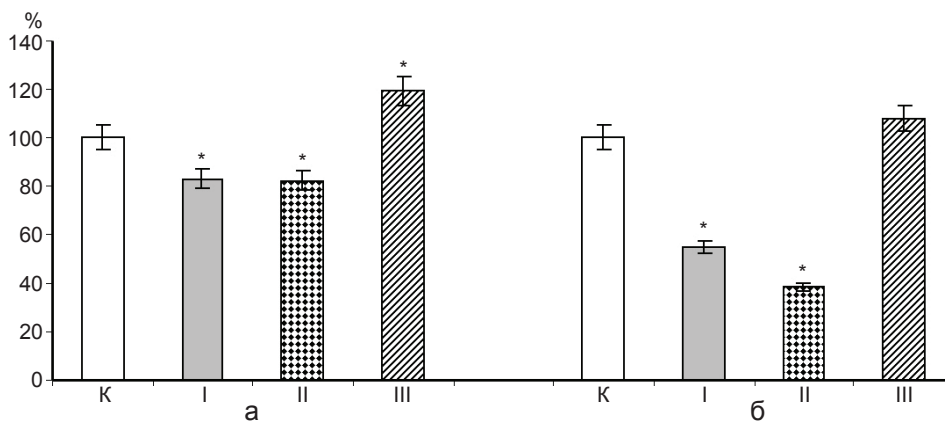


Рис. 3. Концентрація серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині контрольних (К– 20% O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

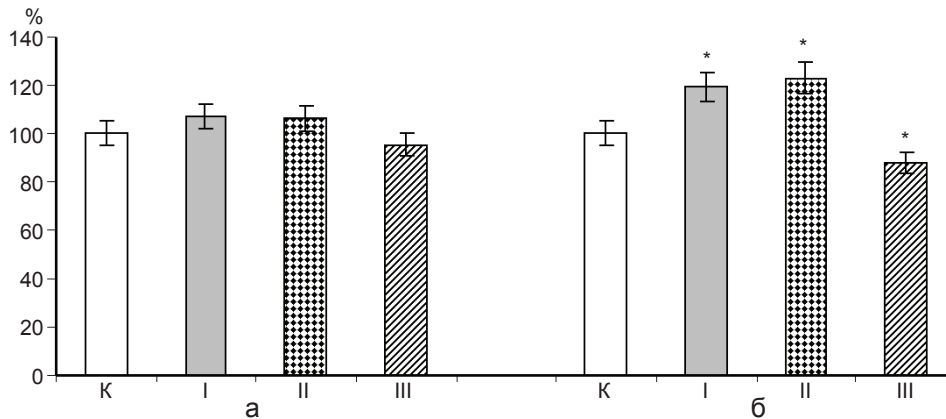


Рис. 4. Концентрація аланіну і глутаміну у культуральній рідині контрольних (К– 20% O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

при Po₂ 38 мм рт. ст. Оскільки мінімальна концентрація речовини виникає в місці її інтенсивного споживання, ми вважаємо, що цей факт свідчить про максимальну інтенсивність життєдіяльності клітин за таких умов. Тому знижений вміст цих амінокислот вказує на інтенсифікацію синтезу колагену. Отримані результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що введення в зону перелому трубчасті кінцівки щурів мультипотентних МСК кісткового мозку, культивованих при 5% кисню сприяло збільшенню коефіцієнта потовщення кісткової мозолі і хрящової тканини [10, 14].

У клітинах постійно підтримується певний стаціонарний вміст амінокислот – фонд (пул) вільних амінокислот. Він оновлюється внаслідок надходження амінокислот і використовується для синтезу біологічно важливих хімічних компонентів клітини. Тобто можна виділити шляхи надходження та використання клітинного пулу амінокислот.

Шляхи надходження вільних амінокислот, що утворюють амінокислотний фонд у клітині при культивуванні *in vitro*: 1. Транспорт амінокислот із живильного середовища, у нашому випадку це DMEM. Враховуючи, що культивування МСК відбувалося без зміни цього середовища протягом 4 днів запаси поживних речовин поступово виснажувались і накопичувались метаболіти. 2. У клітині

з проміжних продуктів окиснення глюкози і циклу лимонної кислоти можуть синтезуватися замінні амінокислоти. До них відносять: гліцин, серин, аланін, аспарагінову кислоту, аспарагін, глутамінову кислоту, глутамін, пролін. Серин синтезується з проміжного продукту гліколізу 3-фосфогліцерату, а аміногрупу отримує від глутамінової кислоти. Гліцин – також замінна амінокислота, основним джерелом якої є серин. 3. Внутрішньоклітинний гідроліз білків (каталізують лізосомальні протеази) [3].

Шляхи використання амінокислотного фонду: 1. Синтез білків і пептидів – це основний шлях споживання амінокислот (75–80% амінокислот клітини йде на їх синтез). 2. Синтез небілкових азотовмісних сполук (пуринових і піримідинових нуклеотидів, холіну, креатину, деяких вітамінів тощо). 3. Синтез глюкози з використанням вуглецевих скелетів глікогенних амінокислот (глюконеогенез). 4. Синтез ліпідів з використанням ацетильних залишків вуглецевих скелетів кетогенних амінокислот. 5. Окиснення до кінцевих продуктів обміну (CO₂, H₂O, NH₃) – це один із шляхів забезпечення клітини енергією (до 10% загальних енергетичних потреб). Усі амінокислоти, які не використовуються в синтезі білків та інших фізіологічно важливих сполук, піддаються розщепленню [3, 12].

За рахунок цих процесів можна пояснити зміни концентрації амінокислот у живиль-

ному середовищі з часом культивування. Як свідчать отримані нами результати, вміст вільного гліцину і метіоніну, серину і аспарагінової кислоти у супернатанті на 4-ту добу культивування знижувався на 76 та 11 % відповідно порівняно з 3-ю добою при P_{O_2} 76 мм рт. ст. (див. рис. 1, 3).

Слід підкреслити, що білковий обмін тісно інтегрований з обміном вуглеводів, ліпідів і нуклеїнових кислот через амінокислоти або α -кетокислоти (α -кетоглутарат, оксалоацетат і піруват). Так, аспарагінова кислота або аланін за допомогою трансамінування знову перетворюються відповідно в оксалоацетат і піруват, які безпосередньо включаються до вуглеводного обміну.

Особливо дефіцитними для життєдіяльності клітин є лізин, метіонін і триптофан (незамінні амінокислоти). Зокрема, метіонін бере участь в обміні жирів, фосфатидів, ціанокобаламіну (вітаміну B12) та фолієвої кислоти [15].

Клітини потребують постійного надходження молекулярного кисню для метаболічних процесів, що включають оксидативне фосфорилування, в якому O_2 є кінцевим акцептором вільних електронів у процесі утворення АТФ. У дослідженнях *in vitro* на МСК із жирової тканини людини Рилова і співавт. [16] показали, що зменшення концентрації кисню (5 % O_2) знижує споживання клітинами глюкози, збільшує молярне співвідношення лактату/глюкози та зменшує трансмембранний потенціал мітохондрій. Це супроводжується підвищенням експресії генів, що кодують усі ферменти гліколітичного шляху катаболізму глюкози. Водночас активується клоногенний потенціал і проліферація МСК.

Дані літератури дають підстави припустити, що основний механізм стимулювальної дії зниженого P_{O_2} реалізується через активацію кисеньчутливих сигнальних сполук. Відомо, що більшість клітин ссавців відповідають на зниження P_{O_2} активацією експресії генів і синтезом білків *de novo*. Встановлені ре-

докс-сенситивні фактори, найвідомішим з яких є білок-активатор-1 (AP-1) та індукований гіпоксією фактор (HIF-1) [17, 18].

ВИСНОВКИ

1. Культивування МСК лінії 4BL людини при зниженому P_{O_2} (23 і 38 мм рт. ст.) протягом 24 год вірогідно зменшує концентрацію деяких вільних амінокислот у культуральній рідині, що беруть участь у синтезі колагену.

2. При інкубації клітин лінії 4BL у газовому середовищі з 76 мм рт. ст. кисню на 4-ту добу зареєстровано в культуральній рідині статистично вірогідне зниження концентрації проліну й оксипроліну (на 21 %), а також аланіну й глутаміну (на 12 %).

3. Максимальна інтенсивність споживання амінокислот, потрібних для синтезу колагену, була при концентрації кисню у газовій фазі культурального середовища 5 % (38 мм рт. ст.).

**В.А. Березовский, Л.Н. Плотникова,
С.П. Весельский, И.Г. Литовка**

ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СНИЖЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Исследовано влияние пониженного парциального давления кислорода (P_{O_2}) на аминокислотный состав культуральной жидкости мезенхимальных стромальных клеток (МСК) линии 4BL человека. Зарегистрировано достоверное снижение концентрации пролина и оксипролина при 23 мм рт. ст. (3 % кислорода) на 31 %, серина и аспарагиновой кислоты на 45 % относительно контроля. Максимальное потребление необходимых для синтеза коллагена свободных аминокислот из культуральной жидкости (пролина и оксипролина на 42 %, серина и аспарагиновой кислоты на 62 %) наблюдали при P_{O_2} в газовой фазе среды 38 мм рт. ст. (5 % O_2). При P_{O_2} 76 мм рт. ст. (10 % O_2) недостача аминокислот пролина и оксипролина составляла лишь 21 %, а глутамина и аланина – 12 % относительно контроля. Такое соотношение интенсивности потребления аминокислот может свидетельствовать о том, что максимальная жизнедеятельность МСК происходит при P_{O_2} 38 мм рт. ст.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, аминокислотный состав, парциальное давление кислорода.

**V.A. Berezovskii, L.N. Plotnikova, S.P. Veselskii,
I.G. Litovka**

THE INFLUENCE OF LOW PARTIAL OXYGEN PRESSURE ON THE BIOLOGICAL PROCESS OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

The influence of low partial oxygen pressure (P_{O_2}) on the amino acid composition in culture medium of human mesenchymal stromal cell (MSC) lines 4BL has been studied. At 23 mm Hg (3% oxygen), a significant decrease (by 31%) in the concentration of proline and hydroxyproline was registered. Under these conditions, the concentration of serine and aspartic acid decreased by 45% compared to the control. Maximum consumption of free amino acids from the culture medium required for the synthesis of collagen (proline and hydroxyproline by 42%, serine and aspartic acid by 62%) was observed at a gas-phase P_{O_2} of 38 mm Hg (5% O_2). At P_{O_2} 76 mm Hg (10% O_2), a lack of amino acids proline and hydroxyproline was only 21%, while that of glutamine and alanine amounted 12% compared to the control. This intensity ratio of consumption of amino acids may indicate that the maximum of MSC vital functions occurs at P_{O_2} 38 mm Hg. Key words: mesenchymal stromal cells, amino acid composition, partial oxygen pressure.

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

REFERENCES

1. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cell from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cell.* 2010; 2 (4): 81–92.
2. Bozo I, Deev R, Pinaev G. Is “fibroblast” a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives? *Cytology.* 2010; 52 (2): 99–109.
3. Taghizadeh R, Cetrulo K. Wharton’s Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta.* 2011; 32 (4): 311–315.
4. Bogdan V, Zafranskaya M, Guyn Y. Collagen synthesis mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro and in autologous. *Proceedings of the International Conference «Fundamental science – medicine».* Minsk, 2013: 90–94.
5. Astakhova V. Osteogenic cell precursors from human bone marrow. Kiev: Phoenix. 2000: 176 p.
6. Berezov T, Korovkin B. *Biological Chemistry.* Moscow: Medicine. 1990: 528 p.
7. Severin E. *Biochemistry.* Textbook for Universities: GEOTAR-MED. 2003: 779 p.
8. Astakhova V, Berezovskii V, Panchenko L, Khasabova I. The stromal cells of human bone-marrow cloning by of low partial oxygen pressure. *Fiziol Zh.* 2001; 47 (1): 40–44.
9. Berezovskii V, Yanko R, Chaka O, Litovka I, Zamorska T. The hypoxic gas mixture of level sanogene effects on lungs reactivity the rats of different age. *Bulletin of Lviv University. Biology Series.* 2012; 59: 227–234.
10. Valyushkina M, Buravkova L. Effect of O_2 in the medium on multipotent mesenchymal progenitor cells from bone marrow of different ages rats. *Med Acad J.* 2012; 12 (3): 57–59.
11. Lukash L, Yatsishina A, Kushniruk V, Pidpala O. Reprogramming of somatic cells in the adult human in vitro. *Factors Experimental evolution of organisms.* 2011; 11: 493–498.
12. Kaznacheeva A, Zlydnev N. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976; 8: 479–480.
13. Korobeinikova E, Meshcheriakova G. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Lab Work.* 1981; 4: 221–224.
14. Buravkova L, Valyushkina M, Andreeva E, Loginov V. Reparative osteogenesis transplantation multipotent bone marrow stromal cells, culturing at a different oxygen tension. *Morphology.* 2011; 139 (1): 81–85.
15. Karaev A. Amino acids – the basis of life. *Disease prevention and health promotion.* 2008; 3: 51–54.
16. Rylova Y, Andreeva E, Buravkova L. Proliferation and metabolic status of mesenchymal stromal cells from adipose tissue in a different oxygen content in the culture medium. *Aerospace and Environ Med.* 2010; 44 (5): 38–41.
17. Semenza G. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Cell.* 2000; 88 (4): 1474–80.
18. Prabhakar N. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001; 90 (5): 1986–94.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Наук.-досл. ін-т фізіології ім. акад. Петра Богача, Київ
E-mail: plotnikov92@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.12.2013*

О.П. Гаділія, М.О. Тимошенко, К.О. Дворщенко, Л.І. Остапченко, В.В. Верещака

Вплив 2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію на про- та антиоксидантний статус у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу

Досліджували профілактичний вплив низькомолекулярної органічної сполуки (2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію) на ерозивно-виразкові ураження в слизовій оболонці шлунка щурів, викликані стресом. Встановлено, що введення цієї субстанції в дозі 1 мг/кг зменшувало площу уражень на 56,7%. 2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію ефективно відновлював порушену про- та антиоксидантну рівновагу в слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу: вміст дієних кон'югатів зменшувався в 1,24 раза, ТБК-активних продуктів – 1,31 раза, шиффових основ – в 1,28 раза. Виявлений вплив сполуки був здійснений через посилення активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіонової системи.

Ключові слова: стрес, ураження слизової оболонки шлунка, про- та антиоксидантна рівновага, 2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію.

ВСТУП

Пептична виразка шлунка (ПВШ) і нині залишається найбільш поширеним захворюванням органів травлення [1–3]. Згідно з сучасними уявленнями, механізм виразкоутворення у шлунку зводиться до порушення взаємодії факторів агресії та захисних властивостей його слизової оболонки (СОШ). Без сумніву, стреси залишаються одними з провідних етіологічних факторів розвитку уражень СОШ [1, 3]. Стресові виразки виникають після важких травм, гострих захворювань різних органів, важких операцій, термінальних станів (шок, колапс), гострої ниркової або печінкової недостатності, важкої гіпоксії тканин. При впливі декількох стресових факторів імовірність виникнення виразки шлунка помітно зростає. Поява виразок та їх рецидивів спричинюється психоемоційним напруженням [4]. Механізм розвитку ПВШ – це порушення балансу в дії чинників, що ушкоджують слизову та факторів, що її захищають. У разі, коли всі органи і системи

працюють у режимі надзвичайної ситуації, відбувається значний викид у кров кортикостероїдів і катехоламінів, що сприяють підвищенню секреторної активності залоз слизової і при цьому знижують її захисні властивості. Також порушується трофіка тканин шлунка, утворюються крововиливи стінки, що в свою чергу сприяє виразкоутворенню. Локалізуються стресові виразки переважно в стінках тіла та дна шлунка. Дуже рідко вони утворюються в дванадцятипалій кишці [2]. Отже, поширеність виразкової хвороби з постійною загрозою ускладнень і відсутність ефективних засобів профілактики рецидивів вимагають пошуку нових нетоксичних профілактичних антивиразкових засобів.

Мета нашої роботи – дослідити профілактичну дію низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) – 2-(2-гідроксифенокси) ацетил-L-пролінат натрію) на ерозивно-виразкові ураження та стан про- та антиоксидантної рівноваги в СОШ щурів за умов дії стресу.

© О.П. Гаділія, М. Тимошенко, К.О. Дворщенко, Л.І. Остапченко, В.В. Верещака

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих лабораторних щурах лінії Вістар розведення віварію Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та згідно з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами [5].

У кожній з полікарбонатних кліток розміром 550x350x180 мм, з кришками з оцинкованої сталі та скляними поїлками утримували по 7 тварин. Підстилка була з тирси листяних порід дерев. У приміщенні, в якому утримували тварин підтримували такі умови: температура – 20–25 °С, вологість – 50–55 %, 12-годинний світловий день. Щурам згодовували стандартний корм фірми “Резон-1” (Україна). Доступ до води був необмеженим.

Усіх тварин піддавали ветеринарному огляду та акліматизації протягом 5 діб. Для дослідження профілактичної дії НМОС щури були поділені методом рандомізації на 3 груп по 10 тварин у кожній: I група – інтактні щури, II та III – щури, у яких викликали виразки СОШ дією стресу. Щурам II групи (стрес-контроль) вводили фізіологічний розчин об'ємом 2 мл/кг за 30 хв до дії ульцерогенного чинника, вони були контролем для III групи. Щурам III групи профілактично за 30 хв до дії ульцерогенного чинника здійснювали ін'єкції 1 мг/кг НМОС, розведеної у фізіологічному розчині з розрахунку 2 мл/кг (сполука синтезована в Московському державному університеті ім. М.В. Ломоносова).

Ерозивно-виразкові ураження СОШ щурів у II і III групах викликали водно-імобілізаційним стресом за Такагі та співавт. [6], згідно з яким тварин знерухомлювали в металевих перфорованих циліндрах з прозорими і перфорованими плексигласовими вікнами в основах, занурювали на 3 год у ванну з водою при 22–23 °С по рівень шиї. Після цього їх декапітували.

Для оцінки стану СОШ щурів після впливу ульцерогенного чинника діставали шлунок, розрізали його за малою кривизною, вивертали слизовою назовні та ретельно промивали фізіологічним розчином. За допомогою експериментального гастроскопа при транслюмінаційному освітленні вивчали стан СОШ при чотикратному збільшенні. У кожному шлунку розраховували кількість і площу виразок.

У СОШ щурів досліджували вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (концентрацію пероксиду водню, дієнових кон'югатів, тіобарбітурової кислоти (ТБК)-активних продуктів та шиффових основ) за стандартними біохімічними методиками [7–9]. Антиоксидантний захист СОШ за умов стресу було оцінено за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонової системи (вмістом відновленого та окисненого глутатіону, активністю глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази) [10–15].

Статистичну та математичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами. Порівняння показників груп проводили за допомогою критерію t Стьюдента для незалежних вибірок при $P < 0,05$. Результати представляли у вигляді середнього значення (M) і помилки середнього (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що водно-імобілізаційний стрес викликав розвиток виразкових уражень СОШ у 100 % тварин. У середньому в одному шлунку було зареєстровано $6,3 \pm 1,1$ виразок. Їх площа на один шлунок приблизно становила $7,21 \pm 1,51$ мм². За умов профілактичного введення НМОС ураження реєстрували у 60 % тварин. При цьому НМОС не суттєво впливала на їх кількість: в одному шлунку в середньому було $5,30 \pm 1,84$ виразок. Проте площа виразок в одному шлунку суттєво зменшувалась і становила $3,12 \pm 0,96$ мм², що було на 56,7 % ($P < 0,05$) менше порівняно з контролем (рисунок).

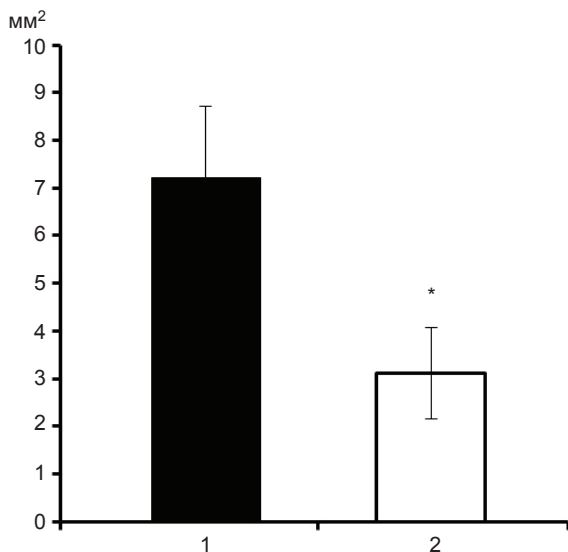


Рис.1. Вплив низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) на площу ерозивно-виразкових уражень у слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних водно-імобілізаційним стресом: 1 – фізіологічний розчин та стрес; 2 – НМОС та стрес. * $P<0,05$ відносно групи щурів, яким вводили фізіологічний розчин

Після дії водно-імобілізаційного стресу вміст продуктів ПОЛ у СОШ щурів різко збільшувався. Так, у порівнянні з інтактним контролем вміст дієнових кон'югатів був більшим у 2,82 раза, а ТБК-активних продуктів – у 2,23 раза, шиффових основ – у 3,01 раза (табл. 1).

Таким чином, стрес призводив до порушення про- та антиоксидантної рівноваги в СОШ, свідченням чого є зниження активності

СОД в 1,28 раза ($P<0,05$). Активність каталази в наших експериментах також зазнавала змін. Після дії стресу вона зростала в 1,33 раза ($P<0,05$) у порівнянні з інтактним контролем, що може свідчити про утворення пероксиду водню (табл. 2).

Дійсно, вміст пероксиду водню в СОШ збільшувався приблизно в 3,3 раза. Відомо, що H_2O_2 може утворюватися під час спонтанної дисмутації супероксид-радикала, який в цій групі підвищувався в 3,3 раза через пригнічення активності СОД. Одержані результати відповідають даним літератури про інтенсифікацію процесів ПОЛ і залучення активних форм кисню (АФК) у формування уражень слизової шлунка, що зумовлені стресом [16].

НМОС зменшувала вміст дієнових кон'югатів в 1,24 раза ($P<0,05$), ТБК-активних продуктів – в 1,31 раза ($P<0,05$), шиффових основ – в 1,28 раза ($P<0,05$) у СОШ щурів порівняно з групою стрес-контролю. В результаті дії стресу підвищувалася активність СОД під впливом НМОС як порівняно з групою стрес-контролю, так і з інтактними тваринами. СОД каталізує реакцію перетворення супероксидного радикала в пероксид водню. Дійсно, в групі щурів, яким вводили НМОС, концентрація пероксиду водню перевищувала показники інтактних тварин в 3,71 раза і не зменшувалася порівняно з

Таблиця 1. Перекисне окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка щурів за умов розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень, викликаних стресом, та профілактичного введення низькомолекулярної органічної сполуки – НМОС ($M\pm m$)

Показник	Інтактний контроль	Фізіологічний розчин	НМОС
H_2O_2 , мкмоль · мг білка ⁻¹	2,1±0,2	6,93±0,61***	7,81±0,72***
Дієнові кон'югати, нмоль · мг білка ⁻¹	71,3±6,4	201,1±18,7***	161,2±16,0**,****
ТБК-активні продукти, нмоль · мг білка ⁻¹	44,2±4,4	98,9±9,4***	75,1±7,2*,****
Шиффові основи, ум. од. · мг білка ⁻¹	1,2±0,1	3,62±0,31***	2,81±0,28*,****

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ щодо інтактного контролю; **** $P<0,05$ щодо групи щурів, яким вводили фізіологічний розчин.

групою стрес-контролю. При цьому за цих умов також було зареєстроване посилення каталазної активності порівняно з групою стрес-контролю. Отже, отримані результати свідчать про активацію антиоксидантного захисту, а саме посилення активності СОД і каталази в СОШ щурів під впливом досліджуваної сполуки.

Важливу роль у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин відіграє глутатіонова система, до складу якої входять відновлений глутатіон і комплекс ферментів – глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази та глутатіонредуктази. Компоненти глутатіонової ланки антиоксидантного захисту інгібують більшість вільнорадикальних реакцій, забезпечують безрадикальне відновлення ліпогідропероксидів, інактивують різноманітні токсичні речовини та сприяють підтриманню антиоксидантного гомеостазу [17]. Тому наступним завданням нашої роботи було дослідити стан глутатіонової системи антиоксидантного захисту в СОШ щурів за умов стрес-індукованих уражень та профілактичного введення низькомолекулярної органічної сполуки НМОС.

Ключова роль у захисті клітин від оксидативного стресу належить глутатіону, трипептиду, редокс-регулятору клітинних функцій. Його біологічна роль надзвичайно велика і реалізується як активацією залежних від відновленого глутатіону ферментних систем, так і безпосередньо системою відновленого та окисненого глутатіону: захист від активних форм кисню, відновлення та ізомеризація

дисульфідних зв'язків, вплив на активність різноманітних ферментів, підтримка оптимального стану біомембран, реалізація коферментних функцій, участь в обміні ейкозаноїдів, у біосинтезі нуклеїнових кислот і, можливо, білків, участь в метаболізмі ксенобіотиків, функціонування як резерв цистеїну, підвищення резистентності клітин до інтоксикації та інших шкідливих впливів, стимуляція проліферації. Завдяки високому вмісту глутатіону в клітинах саме у відновленій формі, він здатен ефективно нейтралізувати АФК *in vivo*. У реакції з ONOO^- глутатіон утворює нітрозотіол, який потім розпадається з утворенням NO , тобто може відігравати не тільки детоксикаційну роль за умов оксидативного стресу, а мати важливе значення у транспорті оксиду азоту [7].

Дослідження вмісту відновленого глутатіону (табл. 3) в СОШ щурів виявило достовірне його зниження на 16 % ($P < 0,05$) у групі тварин, підданих дії стресу. Встановлений ефект може бути зумовлений як підвищенням використання глутатіону глутатіонзалежними ферментами, так і його застосуванням для інактивації АФК [17]. Однією з ймовірних причин такого виснаження може бути зниження активності глутатіонредуктази, яка відновлює окиснений глутатіон. Цей фермент використовує НАДФН як відновний еквівалент, а вміст цієї сполуки значно знижується за умов оксидативного стресу [18]. Під дією стресу зростає вміст окисненого глутатіону, що свідчить про використання його відновленої форми в знешкодженні АФК. При

Таблиця 2. Активність ферментів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці шлунка щурів за умов розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень, викликаних стресом, та профілактичного введення низькомолекулярної органічної сполуки – НМОС ($M \pm m$)

Активність	Інтактний контроль	Фізіологічний розчин	НМОС
Супероксиддисмутази, ум.од. $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$	0,16 \pm 0,01	0,125 \pm 0,011*	0,232 \pm 0,022*,****
Каталази, нмоль $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$	314,7 \pm 29,8	418,4 \pm 39,3*	561,7 \pm 54,6*,****

введенні НМОС вміст окисненого глутатіону залишався вищим щодо інтактного контролю і не змінився порівняно зі стрес-контролем, що, зважаючи на високий вміст відновленої форми, може свідчити про запобігання катаболізму глутатіону у СОШ щурів під впливом досліджуваної сполуки.

Глутатіон є кофактором для глутатіонпероксидази, яка здатна відновлювати як пероксид водню, так і органічні гідропероксиди, окиснюючи глутатіон. Спорідненість глутатіонпероксидази та перекису водню вища, ніж у каталази, тому здатна працювати за низьких концентрацій субстрату [19]. Вона елімінує перекиси стеринів, нуклеїнових кислот, білків, захищає лізосомальні мембрани від окиснення. Крім того, відомо, що вона може функціонувати як пероксинітритредуктаза, попереджуючи оксидативну та нітрозативну модифікацію біомолекул.

Активність глутатіонпероксидази регулюється продуктами ПОЛ, АФК, стресовими чинниками через α -адренергічні рецептори, тирозиновим фосфорилуванням, а також концентрацією відновленого глутатіону в клітині. Остання визначається активністю глутатіонредуктази та вмістом НАДФН. H^+ , який синтезується в пентозофосфатному циклі [1].

У результаті дії стресу знижувалася

активність глутатіонпероксидази на 31 % ($P < 0,05$) порівняно з інтактним контролем. Це свідчить про виснаження цієї ланки глутатінової системи внаслідок надлишкової активації вільнорадикальних процесів і ПОЛ і неспроможність клітин протистояти розвитку оксидативного стресу. З іншого боку, введення НМОС протидіяло зниженню активності цього ферменту, що пояснюється мобілізацією антиоксидантної системи захисту у відповідь на збільшення вмісту АФК, зокрема й пероксиду водню.

Глутатіонтрансферази – універсальні ферменти, які запобігають пошкодженню ДНК, мітохондрій та інших життєво важливих центрів клітини від реактивних метаболітів і в результаті значно збільшують стійкість клітини й організму загалом [20]. На відміну від глутатіонпероксидази, глутатіонтрансфераза здатна метаболізувати кон'югацією з відновленим глутатіоном вторинні метаболіти, а саме ТБК-активні продукти. Цей фермент бере активну участь у детоксикації канцерогенних і мутагенних речовин, продуктів окиснювального стресу, відновлює окиснені ацили фосфоліпідів до оксикислот [18]. Детоксикацію речовин вона здійснює за допомогою переносу на них іонів сірки з подальшим утворенням меркаптидів.

Таблиця 3. Вміст глутатіону та активність ферментів глутатінової системи антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень, викликаних стресом, та профілактичного введення низькомолекулярної органічної сполуки – НМОС ($M \pm m$)

Показник	Контроль	Фізіологічний розчин	НМОС
Глутатіон відновлений, нмоль/мг білка	33,26 \pm 0,82	27,33 \pm 0,57*	35,31 \pm 1,02
Глутатіон окиснений, нмоль/мг білка	39,49 \pm 1,71	47,53 \pm 1,99*	51,27 \pm 2,22****
Активність глутатіонтрансферази, нмоль кон'югату глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом/хв · мг білка	135,88 \pm 13,06	131,66 \pm 11,16	126,64 \pm 9,02
Активність глутатіонредуктази, нмоль НАДФН/хв · мг білка	1156,7 \pm 49,3	852,3 \pm 53,8*	1543,41 \pm 96,9**, ****
Активність глутатіонпероксидази, нмоль/хв · мг білка	0,78 \pm 0,05	0,61 \pm 0,05*	0,88 \pm 0,05****

Відновлений глутатіон взаємодіє з кон'югованою сполукою з утворенням тіоефіру. Потім під впливом γ -мембранозв'язаного ферменту γ -глутамілтрансферази від тіоефіру відщеплюється залишок γ -глутамінової кислоти. Подальші перетворення глутатіонового кон'югата відбуваються за дії цистеїніл- γ -дипептидази. При цьому відділяється гліцин, а тіоефірцистеїн, що залишився, ацетилюється до меркаптуронової кислоти та виводиться з організму [21]. Активність цього ферменту за умов дії стресу не змінилася як у групі стрес-контролю, так і у щурів, яким вводили НМОС щодо групи інтактних тварин.

Отже, отримані результати свідчать про те, що НМОС зменшує інтенсивність ПОЛ у СОШ щурів, після дії стресу та проявляє антиоксидантну дію внаслідок посилення активності СОД, каталази та глутатіонової системи.

**Е.П. Гадилия, М.А. Тимошенко,
К.А. Дворщенко, Л.И. Остапченко,
В.В. Верещака**

ВЛИЯНИЕ 2-(2-ГИДРОКСИФЕНОКСЫ) АЦЕТИЛ-L-ПРОЛИНАТ НАТРИЯ НА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Исследовали профилактическое воздействие низкомолекулярного органического соединения (2-(2-гидроксифенокси) ацетил-L-пролинат натрия) эрозивно-язвенные поражения в слизистой оболочке желудка крыс, вызванные стрессом. Установлено, что введение данной субстанции в дозе 1 мг/кг уменьшало площадь поражений на 56,7%. 2-(2-гидроксифенокси) ацетил-L-пролинат натрия эффективно восстанавливал нарушенное про- и антиоксидантное равновесие в слизистой оболочке желудка крыс в условиях стресса: содержание диеновых конъюгатов уменьшалось в 1,24 раза, ТБК-активных продуктов – 1,31 раза, шиффовых основ – в 1,28 раза. Установленное влияние соединения осуществлялось путем усиления активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионової системи.

Ключевые слова: стресс, поражение слизистой оболочки желудка, про/антиоксидантное равновесие, 2-(2-гидроксифенокси) ацетил-L-пролинат натрия.

**O.P. Gadiliya, M.O. Timoshenko,
K.O. Dvorschenko, L.I. Ostapchenko,
V.V. Vereshaka**

EFFECTS OF 2-(2-HYDROXYPHENOXY) ACETYL-L-PROLINAT SODIUM ON ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM OF THE GASTRIC MUCOSA OF RATS UNDER CONDITIONS OF STRESS ACTION

We investigated the preventive effect of low molecular weight organic compound 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl-L-prolinat sodium on erosive and ulcerative lesions in the gastric mucosa caused by stress. It was established that prophylactic administration of this substance to rats at a dose of 1 mg/kg reduced the lesion area by 56.7 %. 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl-L-prolinat sodium efficiently restored the impaired pro-/antioxidative balance in the gastric mucosa of rats under stress: the content of diene conjugates was reduced by 1.24 times, TBA-active products reduced by 1.31 times, Schiff's bases reduced by 1.28 times. This effect was accompanied by increased activities of the superoxide dismutase, catalase and of glutathione system.

Key words: stress, gastric mucosa lesions, pro/antioxidant balance, 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl-L-prolinat sodium.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

1. Ivanitskii V, Lapina T. [Chronic gastritis: modern concepts, principles of diagnosis and treatment]. *RMZh Zabolevaniya pischevaritelnoy sistemy*. 2001;5(2):54-60.
2. Perederiy V, Tkach S, Shvets N, Tsvetkov A, Yatsenko O. [Ulcer disease or peptic ulcer]. Kiev; 1997.
3. Yaitsky N, Sedov V, Morozov V. [Ulcers of the stomach and duodenum]. M.: MEDpress-Inforn; 2002.
4. Moriya M, Uehara A, Okumura T, Miyamoto M, Kohgo Y. Stress-induced hemorrhagic gastric ulcer after successful *Helicobacter pylori* eradication: two case reports. *J Med Case Rep*.5:252.
5. Maltsev V, Belousov D. [Ethical assessment of research methods]. *Ezhenedelnik Apteka*. 2001(34):35.
6. Takagi K, Kasuya Y, Watanabe K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1964 Apr;12:465-72.
7. Baraboi V. [Bioantioxidants]. K.: Book Plus; 2006.
8. Gavrilo VB, GavriloVA AR, Khmara NF. [Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts]. *Lab Work*. 1988(2):60-4.
9. Kolesova OE, Markin AA, Fedorova TN. [Lipid peroxidation and methods of determining its products in biological media]. *Lab Work*. 1984(9):540-6.
10. Cheviri S, Chaba I, Sekei I. [Role of superoxide dismutase in cellular oxidative processes and method of its determination in biological materials]. *Lab Work*. 1985(11):678-81.

11. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. FEBS Lett. 1990 Jul 30;268(1):69-71.
12. Koroliuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. [A method of determining catalase activity]. Lab Delo. 1988(1):16-9.
13. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Anal Biochem. 1994 Aug 1;220(2):403-9.
14. Orekhovich V. [Modern methods in biochemistry]. M: Medicina. 1977:66-8.
15. Vlasova SN, Shabunina EI, Pereslegina IA. [The activity of the glutathione-dependent enzymes of erythrocytes in chronic liver diseases in children]. Lab Delo. 1990(8):19-22.
16. Liochev SI, Fridovich I. Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. J Biol Chem. 2002 Sep 20;277(38):34674-8.
17. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med. 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12.
18. De Minicis S, Brenner DA. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Mar;23 Suppl 1:S98-103.
19. Kulinskiy V, Kolsnichenko L. [Structure, properties, biological role and regulation of glutathione peroxidase]. Usp Sovrem Biologii. 1993;113(1):107-22.
20. Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. Annu Rev Biochem. 1989;58:743-64.
21. Uchida K, Kawakishi S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. J Biol Chem. 1994 Jan 28;269(4):2405-10.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: ovirhenko@gmail.com

Матеріал надійшов
до редакції 22.10.2013

О.Ю. Єфіменко, Ю.О. Савченко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, О.Б. Щербаков, В.К. Іванов, Н.М. Жолобак, Ю.В. Малюкин, М.Я. Співак

Зміни моторної функції шлунка та товстої кишки у щурів під впливом нанокристалічного діоксиду церію

Вивчали вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на показники спонтанної та стимульованої моторики шлунка та товстої кишки у щурів, яким вводили протягом 10 діб. Встановлено, що НДЦ у шлунку збільшував амплітуду скорочень стимульованої моторики на $33,0 \pm 2,4\%$, у товстій кишці на $80,3 \pm 7,5\%$. Введення карбахоліну цій групі щурів також збільшувало частоту скорочень на $274,0 \pm 22,9\%$, порівняно з контролем. Крім того збільшувався індекс скорочувальної активності спонтанної та стимульованої моторики в шлунку на $19,8 \pm 1,4$ та $14,5 \pm 9,0\%$ відповідно, і товстій кишці на $14,3 \pm 1,1$ та $11,1 \pm 0,8\%$ відповідно. Відновлювався морфологічний стан слизової оболонки товстої кишки. Отже, отримані результати можуть бути підґрунтям для створення протиза-кренних засобів на основі НДЦ.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, моторна функція шлунку та товстої кишки.

ВСТУП

Нині в зв'язку з погіршенням екологічної ситуації, економічної нестабільності, неправильного способу життя і харчування значно збільшилася кількість захворювань органів травлення. Фактично немає жодного захворювання шлунково-кишкового тракту (ШКТ), при якому не було б тих чи інших порушень моторно-евакуаторної функції стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишки [1]. Розлади моторики ШКТ можуть виступати первинним, провідним патогенетичним фактором таких станів, як функціональна диспепсія, гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба, дискінезія жовчовивідних шляхів, закрепи тощо, і бути наслідком цілої низки захворювань [2, 3]. Так, хронічний закреп може сприяти виникненню небезпечних ускладнень. При ліжковому режимі (інфаркт міокарда, інсульт тощо) атонічний закреп із метеоризмом кишечника сприяють підпіранню діафрагми, стисненню нижніх відділів легень та виникненню застійних пневмоній [4]. Тому саме

нормалізація випорожнень сприяє одужанню. Хронічні закрепи можуть спровокувати рефлекторне посилення гіпертонічних кризів і нападів стенокардії, пароксизмів аритмій серця. Тиск фекальних мас на сечовий міхур може спричинити нетримання сечі [5]. Крім того, хронічні закрепи призводять до депресій, зниження фізичної та емоційної активності, працездатності. Інтоксикація внаслідок всмоктування токсичних речовин з кишечника викликає передчасне старіння.

Незважаючи на те, що з поглибленням розуміння патофізіології моторних порушень ШКТ різноманітність лікарських засобів зростає, можливості їх терапевтичного застосування нині досить обмежені [1]. До деяких послаблювальних препаратів з часом розвивається звикання. Крім того, вони мають побічні ефекти, в тому числі подовження інтервалу TQ кардіограми. Ефективними і популярними є пребіотики, до яких не розвивається звикання [6]. Проте і вони не позбавлені побічної дії. Пребіотики, стимулюючи нормофлору, посилюють ріст дріжджів [7].

© О.Ю. Єфіменко, Ю.О. Савченко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, О.Б. Щербаков, В.К. Іванов, Н.М. Жолобак, Ю.В. Малюкин, М.Я. Співак

У частини пацієнтів пребіотики на основі лактулози викликають здуття та метеоризм. Тому пошук нових протизакрепних засобів (прокінетиків) є актуальною проблемою сучасної біомедицини.

Відомо, що нанокристалічний діоксид церію (НДЦ) має антиоксидантні властивості [8]. НДЦ можна розглядати як потенційний геропротектор. Крім того, *in vitro* виявлена антибактеріальна дія НДЦ відносно умовно-патогенних мікроорганізмів різних груп, контамінація якими товстої кишки з віком зростає [9]. Показано також, що активні наноконпозиції на основі НДЦ і *Lactobacillus bulgaricus* є перспективними з точки зору їх здатності активувати *in vivo* системи клітинної та гуморальної імунної відповіді [10]. Логічно припустити, що НДЦ впливатиме і на моторику ШКТ. Нині інформації щодо його прокінетичної дії немає.

Метою нашої роботи було порівняти вплив НДЦ на голодну та стимульовану карбахоліном моторику шлунка та товстої кишки молодих і старих щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 40 щурах віком 3 (20 щурів) та 24 міс (20 щурів) з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [11]. Кожна вікова група була розділена ще на 2 підгрупи (по 10 щурів). Контрольним групам щурів упродовж 10 діб внутрішньошлунково вводили 3 мл водопровідної дехлорованої води. Дослідним двом групам щурів протягом 10 діб вводили внутрішньошлунково НДЦ в дозі 1 ммоль/мл. Через добу після останнього введення речовин у щурів реєстрували моторну активність шлунка та товстої кишки за допомогою балонграфічного методу [12]. А через 120 хв всім групам щурів вводили стандартний стимулятор моторики карбахолін та продовжували запис.

Упродовж доби перед експериментом щурів не годували, але у них був вільний доступ до води. Наркотизували їх уретаном ("Sigma", США; 1,1 г/кг, внутрішньоочеревинно). Виконували трахеотомію, після чого в фундальний відділ шлунка та товсту кишку вводили катетери з латексним балончиком, який заповнювали водою (37°C). Молодим тваринам вводили в шлунок 1 мл води, в товсту кишку – 0,5 мл, старим щурам вводили 1,5 мл та 0,7 мл, відповідно. Тиск, створений після введення рідини, був однаковий – 17 см вод. ст. У тварин усіх груп після 20-хвилинного еквілібраційного періоду упродовж 120 хв реєстрували спонтанну моторну активність. Після цього їм вводили стандартний стимулятор моторики карбахолін і проводили подальший запис. Для характеристики моторної функції травного тракту ми використовували амплітуду, частоту скорочень та індекс скорочувальної активності (ІСА) за 1 хв, який автоматично обраховується програмою [12].

Тварин умертвляли летальною дозою уретану (3 г/кг, внутрішньоочеревинно), після чого видаляли товсту кишку та фіксували у 10%-мк нейтральному формаліні протягом 1–2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчинах етилового спирту зростаючих концентрацій (70, 80, 90, 96 % – по одній добі у кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год) та хлороформі (1 год), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год 37°C) та чистим парафіном (2 год 56°C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи товстої кишки завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином.

Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа у 200 разів. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамер Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 ("OlympusEuropeGmbH", Японія).

НДЦ синтезовано у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів ІМВ ім. Д.К.

Заболотного НАН України [13]. Синтезований золь містив 0,1 М НДЦ (у перерахунку на церій) розміром 2–7 нм, стабілізованих цитратом натрію, з ζ -потенціалом –20 мВ. Для роботи використовували розведення вихідного золю, які проводили у стерильній деіонізованій воді. Карбахолін (“Sigma”, США) – це неселективний агоніст ацетилхолінових рецепторів, який вводили в дозі 0,01 мг/кг, внутрішньоочеревинно. Його використовували як стандартний стимулятор моторної активності травного тракту.

Статистичну обробку результатів здійснювали у пакеті програм Statistica 8.0. У зв’язку з невеликим обсягом вибірки, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W-тесту Шапіро–Вілка. Ймовірність похибки першого роду $\alpha > 0,05$. Оскільки група наших результатів виявилися нормально розподілена, то порівняння вибірок проводили за допомогою критерію t Стьюдента для зв’язаних вибірок [14]. Розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD), рівень значущості становив $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених контрольних досліджень було показано, що частота скорочень за хвилину порожнього фундального відділу шлунка у щурів віком 3 і 24 міс становила $3,5 \pm 0,5$ та $3,5 \pm 0,25$ хв⁻¹ ($P=0,056$) відповідно (рис. 1). Водночас середня амплітуда скорочення шлунка щурів 3-місячного віку була $1,5 \pm 0,5$ см вод. ст., тоді як у старих щурів вона була меншою ($1,1 \pm 0,2$ см вод. ст.; $P=0,035$). Введення щурам обох вікових груп карбахоліну не змінювало частоту скорочень порожнього фундального відділу шлунка. Середнє значення максимальної амплітуди скорочень, стимульованих карбахоліном, у шлунку молодих щурів становило $14,0 \pm 2,0$, а в старих – $10,0 \pm 2,0$ см вод. ст. ($P=0,0093$; рис. 2).

Слід відмітити, що у старих щурів ІСА за умов спонтанної моторики був на $21,1 \pm 1,1$ % ($P=0,0003$) меншим, ніж у молодих тварин. Після введення карбахоліну він також був меншим на $14,5 \pm 1,1$ % ($P=0,025$).

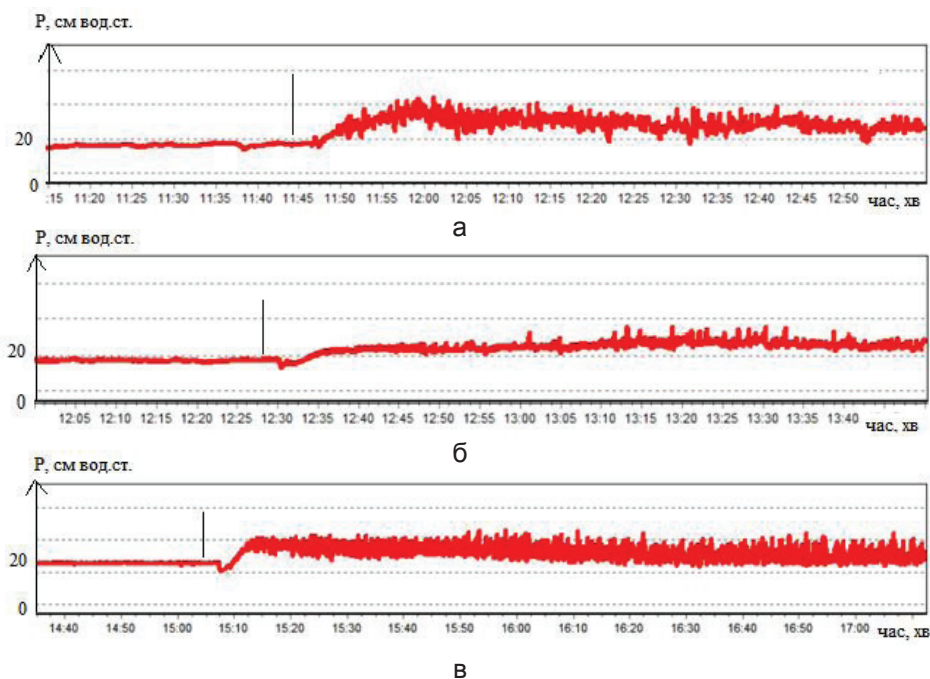


Рис. 1. Типовий запис моторної активності шлунка у щурів: а – 3-місячні щури; б – 24-місячні щури; в – 24-місячні щури після введення нанокристалічного діоксиду церію; | – введення карбахоліну в дозі 0,01 мг/кг, внутрішньоочеревинно

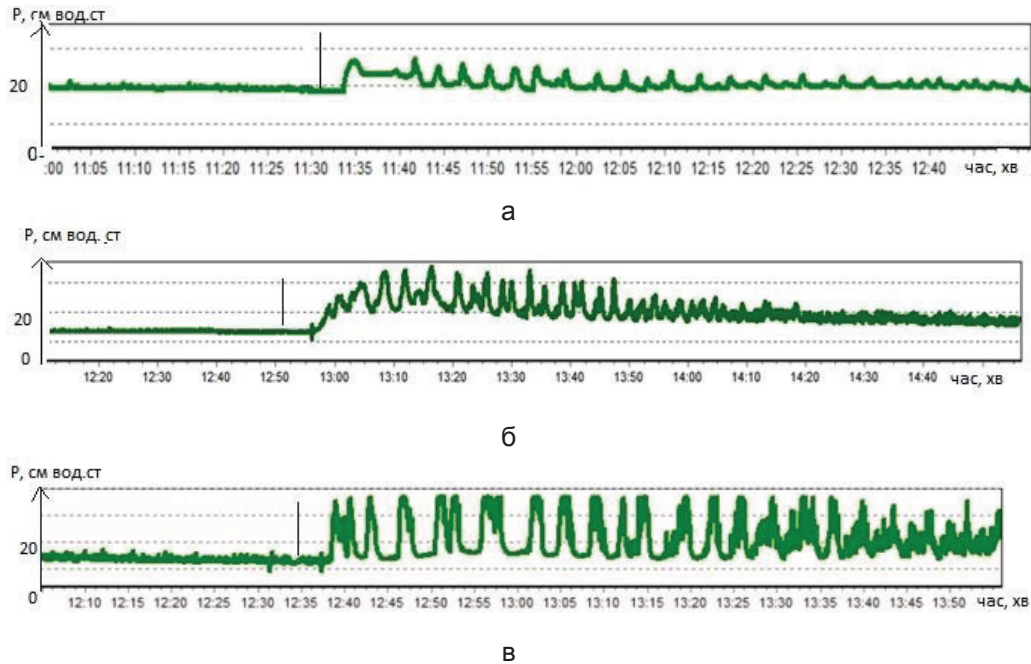


Рис. 2. Типовий запис моторної активності товстої кишки у щурів: а – 3-місячні щури; б – 24-місячні щури; в – 24-місячні щури після введення нанокристалічного діоксиду церію; | – введення карбахоліну в дозі 0,01 мк/кг, внутрішньоочеревинно

Через добу після останнього введення НДЦ у щурів молодого віку частота й амплітуда спонтанних і стимульованих скорочень у шлунку була такою самою як і у відповідному контролі (рис.3). У старих щурів ці показники збільшилися на $37,2 \pm 2,4$ ($P=0,045$) та $57,9 \pm 2,9$ % ($P=0,005$) відповідно порівняно з контрольною групою старих щурів без вве-

дення НДЦ. Відмінності у частоті скорочень при цьому були статистично незначущі.

Введення НДЦ також збільшило ІСА у щурів обох вікових груп. У молодих щурів ІСА спонтанних і стимульованих скорочень збільшився на $9,3 \pm 0,9$ ($P=0,033$) та $8,2 \pm 1,0$ % ($P=0,025$) відповідно. У старих щурів ІСА спонтанних скорочень збільшився на $19,8 \pm 1,4$ %

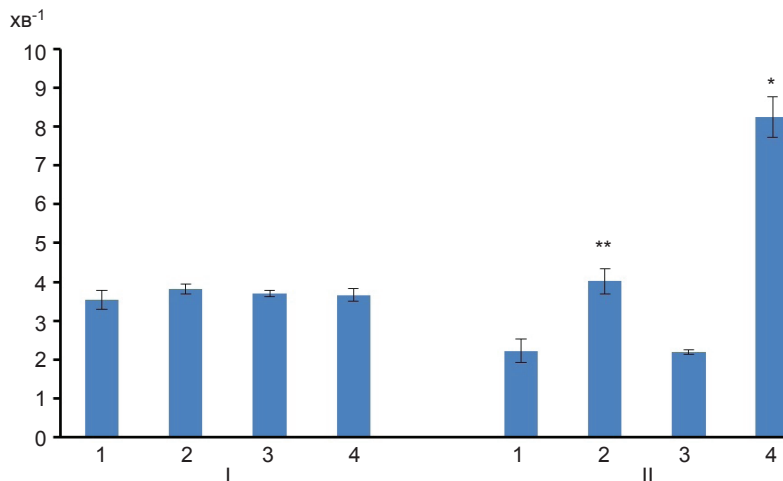


Рис. 3. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на частоту скорочень шлунка (I) та товстої кишки (II) у 24-місячних щурів: 1 – контроль; 2 – НДЦ; 3 – карбахолін; 4 – НДЦ і карбахолін. ** $P<0,01$ порівняно з контролем, * $P<0,01$ порівняно зі значеннями при введенні карбахоліну

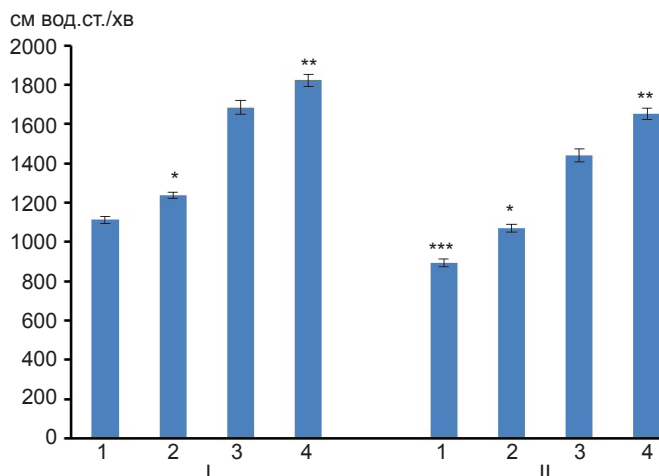


Рис. 4. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на індекс скорочувальної активності шлунка у 3-місячних (I) та 24-місячних щурів (II): 1 – контроль; 2 – НДЦ, 3 – карбахолін, 4 – НДЦ і карбахолін. *** $P < 0,01$ порівняно з 3-місячним контролем, * $P < 0,01$ порівняно з відповідним контролем, ** $P < 0,01$ відносно значень ведення карбахоліну

($P = 0,0001$), тоді як стимульованої моторики – на $14,5 \pm 9,0$ % ($P = 0,035$; рис. 4).

Отримані результати показали, що частота спонтанних скорочень товстої кишки у щурів віком 3 та 24 міс становила $3,0 \pm 0,5$ та $2,23 \pm 0,29$ хв⁻¹ відповідно. Тобто у старих щурів цей показник був на $25,6 \pm 1,1$ % ($P = 0,044$) меншим, ніж у молодих. У товстій кишці амплітуда спонтанних скорочень у старих щурів була на $34,3 \pm 1,7$ % ($P = 0,035$) меншою, ніж у молодих (рис. 5).

Введення карбахоліну не змінювало частоту скорочень товстої кишки у щурів обох

вікових груп, проте через 3–5 хв (латентний період реакції) поступово збільшувалась амплітуда скорочень, яка була максимальною через 40–50 хв після введення карбахоліну, що збігається з дослідженнями, проведеними на ізольованих препаратах порожньої та товстої кишки щурів [15]. У наших експериментах амплітуда стимульованих скорочень у старих щурів була меншою в порівнянні з молодими на $25,3 \pm 1,1$ % ($P = 0,046$).

У товстій кишці молодих щурів НДЦ не впливав на частоту та амплітуду скорочень.

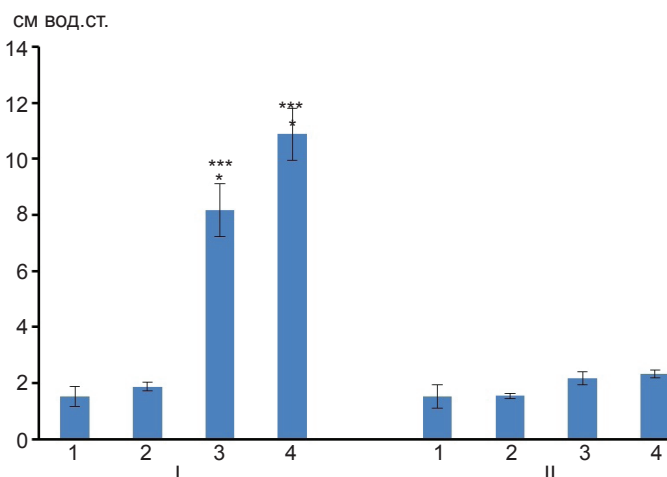


Рис. 5. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на амплітуду скорочень шлунка (I) та товстої кишки (II) у 24-місячних щурів: 1 – контроль; 2 – НДЦ, 3 – карбахолін, 4 – НДЦ і карбахолін. *** $P < 0,01$ порівняно з контролем, * $P < 0,01$ порівняно з групою щурів, яким вводили НДЦ

Проте у старих щурів його дія викликала збільшення частоти спонтанних і стимульованих скорочень на $80,3 \pm 7,5$ ($P=0,0091$) та $274,0 \pm 22,9$ % ($P=0,0087$) відповідно (рис. 3). Аналогічно, зростала і амплітуда як спонтанних, так і стимульованих скорочень на $33,3 \pm 2,1$ ($P=0,031$) та $230,4 \pm 5,6$ % ($P=0,0071$) відповідно (див. рис. 3).

У старих щурів ІСА товстої кишки був нижчим на 14,1 % ($P=0,0082$), ніж у молодих. Після введення НДЦ ми спостерігали покращення спонтанної моторної активності як у молодих, так і у старих щурів (рис.6). У молодих щурів ІСА зростав на 13,4 % ($P=0,005$), а у старих – на 14,3 % ($P=0,0011$).

Відомо, що вікові зміни в моторній функції травного тракту зумовлені морфологічними змінами в травній трубці [16], тому наступним етапом нашої роботи було дослідити морфологічні зміни слизової оболонки товстої кишки за умов дії НДЦ. Було встановлено, що у контрольній групі 24-місячних щурів у слизовій оболонці товстої кишки виникала дифузна інфільтрація з лімфоцитів, гістіоцитів, плазматичних клітин і збільшувалася кількість і розмір келихоподібних клітин, переповнених слизом (рис. 7). Після тривалого введення НДЦ морфофункціональний стан слизової товстої кишки

виявився – на протипагу контрольним старим тваринам – без патологічних змін, з поодинокими інфільтратами з лімфоцитів, гістіоцитів у стромі слизової, що є в межах гістологічної норми. Таким чином, НДЦ покращував морфологічний стан слизової оболонки товстої кишки. Отримані результати, очевидно, можна пояснити його антиоксидантними властивостями, підтвердженням яких є відомі літературні дані [8], а також прокінетичною і, можливо, пребіотичною дією, оскільки за таких умов зменшується час контакту токсичних речовин (індолу і скатолу) зі слизовою оболонкою товстої кишки.

Аналіз отриманих результатів свідчить про наявність вікових особливостей моторної функції травного тракту у щурів. Отримані нами результати дають змогу стверджувати, що НДЦ має прокінетичну дію, тобто здатний стимулювати моторику шлунково-кишкового тракту. Це відкриває перспективу для його застосування у лікуванні закрепів. Перевагами досліджуваного препарату перед існуючими вітчизняними та зарубіжними аналогами є те, що при лікуванні закрепів, насамперед у людей похилого віку, відкривається перспектива заміни одночасного призначення декількох препаратів (прокінетиків, пребіотиків, антиоксидантів) одним, а саме: НДЦ.

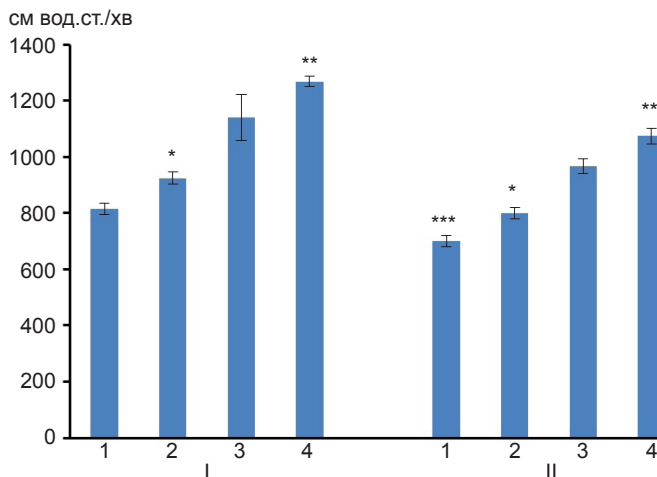


Рис. 6. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на індекс моторної активності товстої кишки у 3-місячних (I) та 24-місячних щурів (II): 1 – контроль; 2 – НДЦ, 3 – карбахолін, 4 – НДЦ і карбахолін. *** $P<0,01$ порівняно з 3-місячним контролем, * $P<0,01$ порівняно з відповідним контролем, ** $P<0,01$ порівняно зі значеннями при введенні карбахоліну

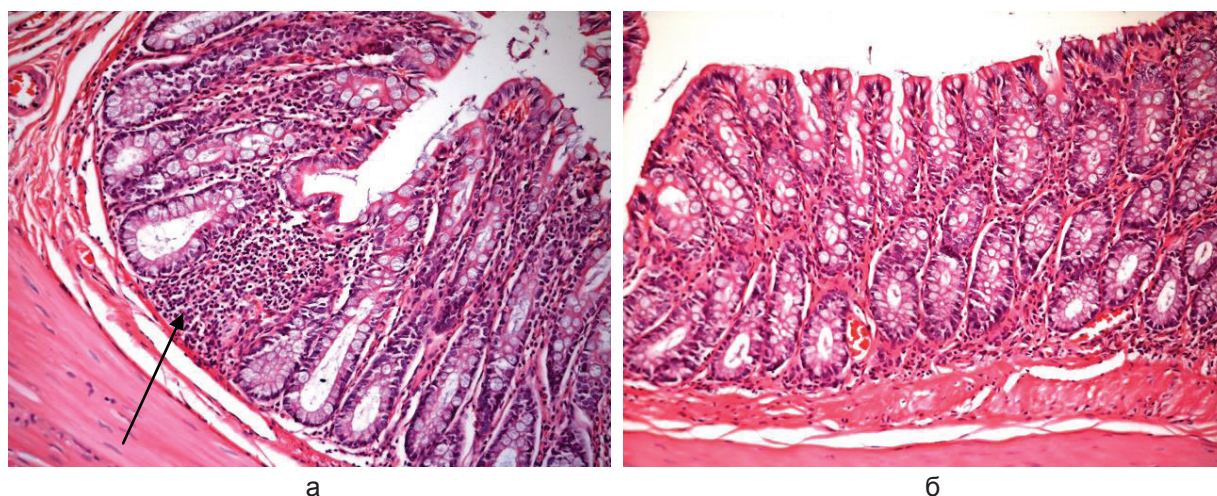


Рис. 7. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на морфофункціональний стан слизової стінки товстої кишки у щурів. Збарвлення гематоксиліном-еозином, збільшення $\times 200$: а – стан слизової у I групи щурів, 24-місяці: \uparrow дифузна інфільтрація з лімфоцитів; б – стан слизової у щурів, яким внутрішньошлунково вводили НДЦ

ВИСНОВКИ

1. НДЦ посилював стимульовану моторику в шлунку та товстій кишці, внаслідок збільшення частоти та амплітуди скорочень.

2. НДЦ збільшував індекс скоротливої активності спонтанної та стимульованої моторики в шлунку та в товстій кишці.

3. НДЦ відновлював морфологічний стан слизової оболонки товстої кишки.

Робота виконана за фінансування Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках виконання науково-дослідної роботи «Експериментальне обґрунтування застосування нанокристалічного діоксиду церію в гастроентерології, проктології і геріатрії», № державної реєстрації 0113U006058.

**Е.Ю. Ефіменко, Ю.А. Савченко,
Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова,
О.Б. Щербак, В.К. Іванов, Н.М. Жолобак,
Ю.В. Малюкін, Н.Я. Співак**

ИЗМЕНЕНИЯ МОТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Изучали влияние нанокристаллического диоксида церия

на показатели спонтанной и стимулированной моторной функции желудка и толстой кишки у крыс, который вводили на протяжении 10 сут. Установлено, что введение нанокристаллического диоксида церия в желудке приводит к увеличению амплитуды сокращений стимулированной моторики на $33,0 \pm 2,4\%$, в толстой кишке – на $80,3 \pm 7,5\%$. Введение карбахолина этой группе крыс также увеличивало частоту сокращений $274,0 \pm 22,9\%$ по сравнению с контролем. Кроме того индекс сократительной активности спонтанной и стимулированной моторики в желудке на $19,8 \pm 1,4$ и $14,5 \pm 9,0\%$ соответственно, а также в толстой кишке на $14,3 \pm 1,1$ и $11,1 \pm 0,8\%$ соответственно. Нами также было установлено, что нанокристаллический диоксид церия восстанавливал морфологическое состояние слизистой оболочки толстой кишки.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, моторная функция желудка и толстой кишки.

**O.Yu. Iefimenko, I.O. Savchenko,
T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova,
O.B. Shcherbakov, V.K. Ivanov, N.M. Zholobak,
Yu.V. Malyukin, M.Ya. Spivak**

THE CHANGES OF THE MOTOR FUNCTION OF THE STOMACH AND THE COLON UNDER THE ACTION OF THE NANOCRYSTALLINE CERIU DIOXIDE

We investigated the effect of nanocrystalline cerium dioxide on parameters of spontaneous and stimulated motility of the stomach and colon in rats. It was found that administration of nanocrystalline cerium dioxide for 10 days increased the amplitude of contractions of stimulated motility in the stomach by $33,0 \pm 2,4\%$ and the frequency of contractions of the colon

by $80,3 \pm 7,5$ %. In this group, the introduction of carbachol also increased the frequency of the contractions by $274,0 \pm 22,9$ %, compared to the control group. The administration of nanocrystalline cerium dioxide increased the index of motor activity of spontaneous and stimulated motility of the stomach by $19,8 \pm 1,4$ and $14,5 \pm 9,0$ %, respectively. In the colon, the motor activity increased by $14,3 \pm 1,1$ and $11,1 \pm 0,8$ %, respectively. We also found that the nanocrystalline cerium dioxide rebuilt morphological condition of the mucous of the colon.

Key words: nanocrystalline cerium dioxide, motor function of the stomach and colon.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv;
Danylo Zaboloty Institute of Microbiology and Virology
National Academy of Science of Ukraine;
Company Diaprof;
Institute of General Inorganic Chemistry MS Kurnakova
RAS;
Institute for Scintillation Materials National Academy of
Science of Ukraine*

REFERENCES

1. Chernyavskiy V.V. Possibilities of modern prokinetic correction gastrointestinal motility. *Vnytrennya Med.* 2008;1(7): 7-9 [Russian].
2. Shvec N.I., Benca TM. Dysmotility syndrome of the upper gastrointestinal tract in the practice of the therapist: diagnosis and treatment. *Newspaper «News of medicine and pharmacy» Gastroenerology.* 2010; 323: 2-3 [Russian].
3. O'Mahony D, O'Leary P, Quigley EM. Aging and intestinal motility: a review of factors that affect intestinal motility in the aged. *Drugs Aging.* 2002; 19(7):515-27.
4. Cardin F, Minicuci N, Droghi AT, Inelmen EM, Sergi G, Terranova O. Constipation in the acutely hospitalized older patients. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010; May-Jun; 50(3):277-81.
5. Dehghani SM, Basiratnia M, Matin M, Hamidpour L, Haghghat M, Imanieh MH. Urinary tract infection and enuresis in children with chronic functional constipation. *Iran J Kidney Dis.* 2013; 7(5):363-6.
6. Ramkumar D, Rao SS. Efficacy and safety of traditional medical therapies for chronic constipation: systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2005; Apr; 100(4):936-71.
7. Malcoch AV, Belmer SV. Intestinal microflora and the value of prebiotics for its function. *Lechaschiy vrach.* 2006;4:60-5 [Russian].
8. Prasad RGSV, Davan R, Jothi S, Phana AR, Raju D.B. Cerium oxide nanoparticles protects gastrointestinal mucosa from ethanol induced gastric ulcer in vivo animal model. *Nano Biomed Eng.* 2013;5 (1):46-49.
9. Babenko LP, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Voychuk SI, Lazarenko LM, Spivak MY. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms in vitro. *Mikrobiol Z.* 2012; May-Jun; 74(3):54-62.
10. Zholobak NM, Zhyravskya T.K, Kachmarskya II. Efficacy of colloidal nanoparticles of cerium and L.bulgaricus in the mouse. The material of confer. «Dovkillia ta zdorovya», Ternopil; 14-16 April 2009: 32 [Russian].
11. Myrzin O.B. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. *Dnipropetrovsk;* 2004 [Russian].
12. Zádori ZS, Fehér Á, Al-Khrasani M, Lackó E, Tóth VE, Brancati SB, et al. Imidazoline versus alpha-adrenoceptors in the control of gastric motility in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013; 705(1-3): 61-67.
13. Ivanova OS, Shekynova TO, Ivanov VK, Scherbakov AB, Popov AL. One-step synthesis of colloidal solutions of cerium dioxide for biomedical applications. *Dokl. Akad. nauk.* 2011; (437) 5:638-41 [Russian].
14. Tyurin Yu.N. Distribution associated with normal. *M.: Infra*M.* 1998 [Russian].
15. Abalo R, Vera G, Rivera AJ, Martín MI. Age-related changes in the gastrointestinal tract: a functional and immunohistochemical study in guinea-pig ileum. *Life Sci.* 2007;80(26):2436-45.
16. Christian Breuer, Jun Oh, Gerhard J Molderings, Michael Schemann. Therapy-refractory gastrointestinal motility disorder in a child with c-kit mutations. *World J Gastroenterol.* 2010;16(34):4363-66.

*Київ нац. ун-т імені Тараса Шевченка;
Ин-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; Київ;
Товариство «Діапроф»;
Ин-т загальної неорганіч. хімії ім. М.С. Курнакова РАН;
Ин-т сцинтиляц. матеріалів НАН України, Харків
E-mail: ysavchenko@mail.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 04.05.2013*

О.О. Лунько, Д.С. Ісаєв, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь, О.В. Ісаєва

Характеристики постійного натрієвого струму в пірамідальних нейронах CA1 зони гіпокампа щурів після обробки протеолітичними ферментами

*Відомо, що постійний натрієвий струм (I_{NaP}), який відіграє важливу роль у підпорогових коливаннях мембранного потенціалу та підтриманні періодичної нервової активності у відповідь на деполяризацію мембрани, є досить чутливим до впливу деяких протеаз. Метою нашої роботи було дослідження впливу ензимів, які найчастіше використовуються в різних методиках виділення нейронів центральної нервової системи, на електорофізіологічні характеристики I_{NaP} . Вимірювання трансмембранних струмів здійснювали на пірамідальних нейронах CA1 зони гіпокампа з використанням методу patch-clamp у конфігурації "ціла клітина", ізольованих без використання ферментів (контрольна група), з використанням пронази E (*Streptomyces griseus*) або протеази типу XXIII (*Aspergillus oryzae*). Показано, що використання цих ферментів для ізоляції окремих нейронів зі зрізів гіпокампа не призводило до зміни потенціалу напівмаксимальної амплітуди та константи нахилу кривої стаціонарної активації I_{NaP} відносно контрольної групи нейронів, ізольованих без використання ферментів. Статистично достовірне зменшення густини I_{NaP} порівняно з контрольною групою спостерігалось у реєстраціях від нейронів, ізольованих з використанням протеази типу XXIII, але не в експериментальній групі, де нейрони були ізольованими з використанням пронази E. Ензиматична обробка нейронів може впливати на результати електрофізіологічних досліджень, що варто враховувати при виборі методу отримання ізольованих нейронів. Також наші результати свідчать на користь використання пронази E в ензиматичній обробці нейронів для дослідження I_{NaP} .
Ключові слова: гіпокамп, постійний натрієвий струм, ензиматична обробка, протеази.*

ВСТУП

Методика отримання поодиноких ізольованих нейронів, придатних для здійснення експериментальних досліджень за допомогою методу patch-clamp, найчастіше включає механічну та ферментативну обробку [1, 2]. Проте ферменти, які використовуються в різних методиках виділення нейронів, є активними сполуками, котрі можуть впливати на різні характеристики іонних каналів як безпосередньо, так і опосередковано через активацію різних зовнішньо- або внутрішньоклітинних молекулярних механізмів. Широко відомо, що протеази здатні з внутрішнього боку мембрани відщеплювати амінокислотні ланцюги, які відповідають за інактивацію каналів [3]. Нещодавні дослідження показали,

що плазмін і хімотрипсин можуть безпосередньо активувати натрієві канали в епітеліальних клітинах [4]. Колагеназа IV призводить до зменшення об'єму нейронів на 8–12 % у клітинах гліоми C6, що в свою чергу може впливати на роботу трансмембранних каналів. У нейронах *Aplysia Californica*, ізольованих за допомогою трипсину, спостерігається збільшення натрієвого струму у відповідь на дію ацетилхоліну [5]. Було показано, що колагеназа не змінює амплітуду натрієвого струму, але впливає на його кінетику [5]. Нещодавні дослідження продемонстрували зміни кінетики активації постійного натрієвого струму (I_{NaP}) під впливом деяких протеаз [6, 7].

Враховуючи той факт, що для отримання ізольованих нейронів використовуються різні

© О.О. Лунько, Д.С. Ісаєв, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь, О.В. Ісаєва

ферменти, актуальним є питання їх впливу на характеристики різних каналів. Метою нашої роботи було дослідження та порівняння характеристик I_{NaP} на поодиноких нейронах гіпокампа, ізольованих за допомогою механічної та комбінованої механічно-ензиматичної дисоціації з використанням різних ферментів, зокрема протеази типу XXIII (*Aspergillus oryzae*), яка широко використовується для дисоціації нейронів молодих щурів, та пронази E (*Streptomyces griseus*), яку використовують для дисоціації нейронів дорослих щурів [8].

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар віком 12–16 діб. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами виконували з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Після виділення мозок швидко занурювали в холодний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 130,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 0,1, MgCl₂ – 5,0, NaH₂PO₄ – 1,0, Na₂HPO₄ – 1,0, NaHCO₃ – 26,0, глюкоза – 10,0 (pH 7,35). Зрізи товщиною 400 мкм отримували за допомогою вібратора Campden Instruments та залишали на одну годину (20–22 °C) у базовому розчині, до якого входили (ммоль/л): NaCl – 130,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 2,0, NaH₂PO₄ – 1,0, Na₂HPO₄ – 1,0, NaHCO₃ – 26,0, глюкоза – 10,0 (pH 7,35). Розчини постійно насичували газовою сумішшю (95% O₂ і 5% CO₂).

У контрольній групі нейрони були ізольовані за допомогою механічної вібродисоціації без використання ферментів [9, 10]. Ензиматичну обробку зрізів проводили протягом 15 хв (32 °C) у цукрозному розчині з додаванням протеази типу XXIII (0,4 мг/мл) або пронази E (2 мг/мл), який містив (ммоль/л): цукрозу – 290,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 0,5, MgCl₂ – 2,0, HEPES – 10,0, глюкозу – 15,0 (pH 7,35). Після цього зрізи декілька разів промивали в базовому розчині для припинення дії ферменту. Механічну дисоціацію нейронів здійснювали в штучній цереброспінальній рідині такого

складу (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 2,0, HEPES – 20,0 (pH 7,35) з використанням методу вібродисоціації [9].

I_{NaP} реєстрували з застосуванням методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” на пірамідальних нейронах гіпокампа щурів Зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 130,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 1,3, HEPES – 10,0, tetraethylammonium-Cl – 20,0, CdCl₂ – 0,4 (pH 7,35). Внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках містив (ммоль/л): CsF – 120,0, NaCl – 5,0, tetraethylammonium-Cl – 30,0, ethylene glycol tetraacetic acid – 10,0, tris(hydroxymethyl)aminomethane – 10,0 (pH 7,2–7,3). Заповнені таким розчином піпетки мали опір 3–4 МОм. Активацію I_{NaP} проводили з використанням повільного деплязуючого ramp-протоколу, який полягає у поступовому збільшенні потенціалу на мембрані досліджуваного нейрона від -80 до 0 мВ зі швидкістю наростання 30 мВ/с. Реєстрацію I_{NaP} -струмів виконували за допомогою диференціального підсилювача (“A-M Systems”, США) поєднаного з системою збору даних (NI PCI-6221, “National Instruments”, США) під керуванням програмного забезпечення “X-Screen”. Обробку результатів здійснювали програмним пакетом ORIGIN 7.5 (“Origin-Labs”, США). Значення потенціалів наведені з урахуванням компенсації потенціалу, що виникає через різницю іонного складу зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів. Провідність для Na⁺ розраховували за формулою: $G = I / (E - E_{Na})$, де I – значення струму при потенціалі E , а E_{Na} – потенціал Нернста, що дорівнював +82 мВ. В експериментах використовували речовини виробництва фірми “Sigma-Aldrich” (США). Всі значення відображені у вигляді середнього значення ± стандартна похибка середнього значення. Достовірність між групових відмінностей встановлювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) та нелінійного регресійного аналізу, а відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для реєстрації I_{NaP} ми використовували гаґр-протокол, зображений на рис. 1,а. У відповідь на прикладання пилкоподібної напруги (див. рис. 1,а) до досліджуваного нейрону виникав макроскопічний дзвоноподібний струм, представлений на рис. 1,б, що опосередкований, як активацією I_{NaP} , так і неспецифічними

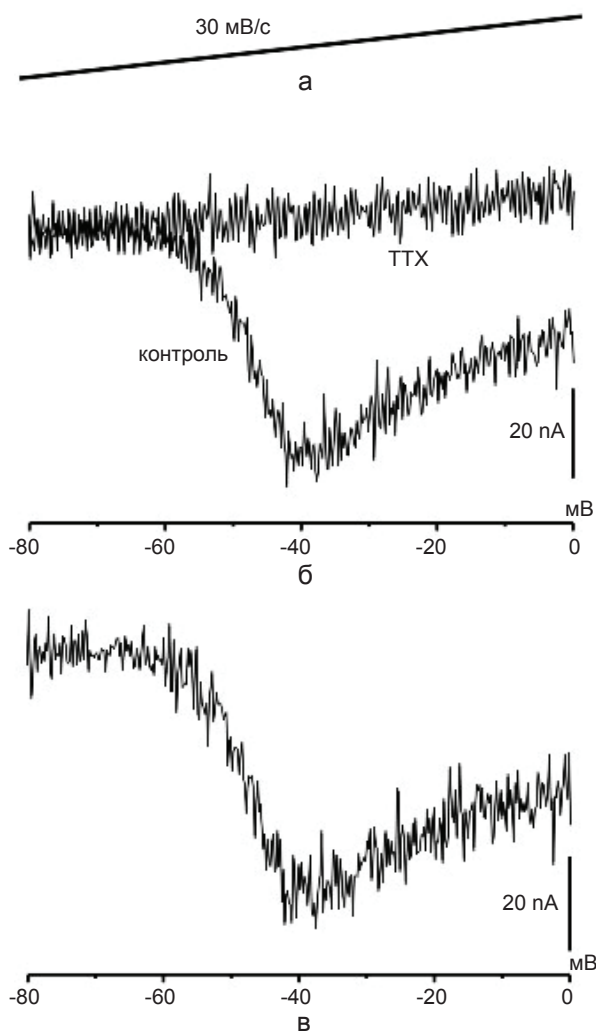


Рис. 1. Постійний натрієвий струм в ізолюваних пірамідальних нейронах СА1 зони гіпокампа щура: а – гаґр-протокол зміни потенціалу зі швидкістю 30 мВ/с; б – реєстрації струмів у контролі та під впливом тетродотоксину, зареєстровані від нейрону щура, що ізолюваний без використання ензимів. Криві отримані у результаті усереднення п'яти реєстрацій; в – постійний натрієвий струм, отриманий у результаті віднімання значень кривих, що наведені на рис. 1,б

провідностями. Додавання тетродотоксину у концентрації 1 мкмоль/л призводило до зміни форми струму внаслідок блокування потенціалчутливих натрієвих каналів, в результаті чого залишався лише неспецифічний компонент. Різниця цих струмів відображає натрієву провідність, зумовлену активацією I_{NaP} (див. рис. 1,в). Активація I_{NaP} починалася при значеннях підтримуваного потенціалу близько -70 мВ, сягаючи свого максимуму між -40 та -30 мВ.

На рис. 2,а показано порівняння провідності, отриманої за допомогою гаґр-протоколу

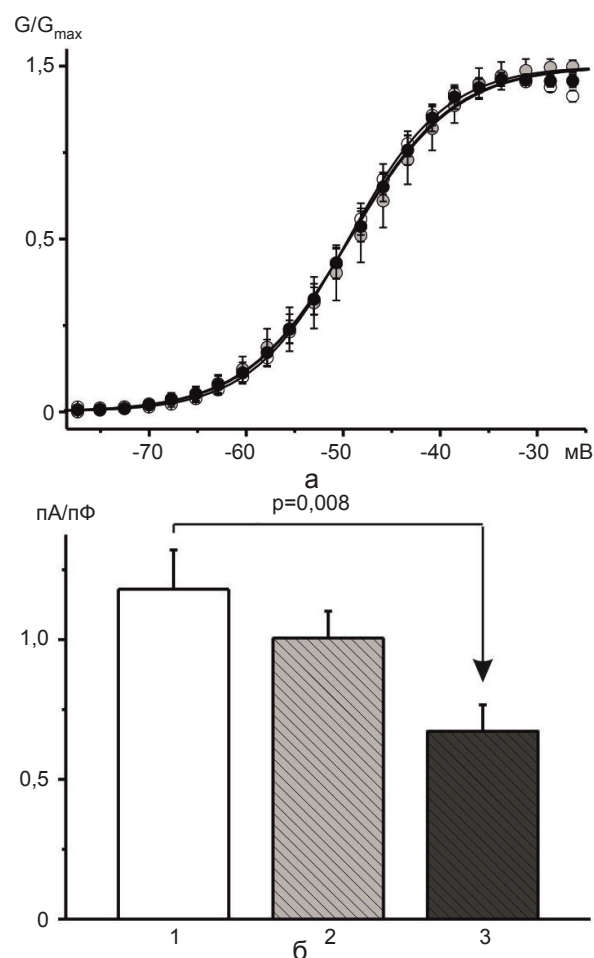


Рис. 2. Вплив ензиматичної обробки на властивості постійного натрієвого струму. Усереднені криві стаціонарної активації G/G_{max} (а) та густина (б) постійного натрієвого струму в нейронах, ізолюваних без використання ензимів (1), з використанням пронази Е (2) або протеази типу XXIII (3)

за різних способів ензиматичної обробки. Потенціал напівмаксимальної амплітуди I_{NaP} ($V_{1/2max}$) у нейронах, що ізольовані з використанням пронази E, становив $-49,3 \pm 0,2$ мВ ($n = 16$), протеази типу XXIII $-49,4 \pm 0,2$ мВ ($n = 13$), та без використання ензимів $-49,5 \pm 0,3$ мВ ($n = 25$), а параметр кривої k : $5,4 \pm 0,1$; $5,3 \pm 0,1$, та $5,0 \pm 0,1$ відповідно. Ємність мембрани нейронів сягала значень: $18,7 \pm 0,7$ пФ ($n = 10$), $19,2 \pm 1,1$ пФ ($n = 9$) та $28,0 \pm 1,4$ пФ ($n = 10$) відповідно. Густина I_{NaP} у реєстраціях від нейронів ізольованих без використання ферментів, при використанні пронази E або протеази типу XXIII становила $2,4 \pm 0,3$ пА/пФ ($n = 10$), $1,9 \pm 0,2$ пА/пФ ($n = 9$), та $1,3 \pm 0,2$ пА/пФ відповідно ($n = 10$, див. рис. 2,б). Критерій значущості (P) для густини струму при використанні протеази типу XXIII становить 0,008 у порівнянні з контрольною групою, тоді як при застосуванні пронази E значення густини струму статистично не відрізнялося від контролю ($P = 0,2$).

У попередніх дослідженнях нами було показано, що деякі протеази, до яких відносяться тромбін, можуть впливати на характеристики I_{NaP} через активацію відповідних рецепторів і внутрішньоклітинних молекулярних процесів, що активують протеїнкіназу C [7]. Також показано, що дія нейрамінідази, ферменту, що відщеплює сіалові кислоти на поверхні мембрани, призводить до зсуву активації натрієвих струмів у бік гіперполяризації [6]. Наші дослідження вказують на те, що ензиматична обробка нейронів протеазою типу XXIII або проназою E, які широко використовуються при дисоціації нейронів для подальших електрофізіологічних досліджень, не призводить до змін характеристик активації I_{NaP} . Це може свідчити про те, що такі типи протеаз не впливають на механізми, задіяні в регуляції кінетики активації I_{NaP} . Проте використання протеази типу XXIII для ензиматичної ізоляції нейронів призводило до зменшення густини I_{NaP} у порівнянні з контролем, тоді як у разі використання пронази E таких ефектів нами не зареєстровано.

Отже, наші дослідження вказують на те, що проназа E не впливає на характеристики I_{NaP} , таким чином, є найбільш релевантним ферментом для здійснення ферментативної обробки нейронів у дослідженнях I_{NaP} .

Методи ензиматичної обробки для отримання ізольованих нейронів широко використовуються в сучасній електрофізіології. Представлені в нашій роботі результати свідчать про важливість врахування того факту, що залежно від вибору методу виділення нейронів або зрізів нервової тканини результати досліджень можуть суттєво відрізнитися.

**А.А. Лунько, Д.С. Исаев, А.П. Максимюк,
О.А. Крышталь Е.В. Исаева**

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСТОЯННОГО НАТРИЕВОГО ТОКА В ПИРАМИДАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ CA1 ЗОНЫ ГИППОКАМПА КРЫС ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Известно, что постоянный натриевый ток (I_{NaP}), который играет важную роль в подпороговых колебаниях мембранного потенциала и поддержании периодической нервной активности в ответ на деполяризацию мембраны, является весьма чувствительным к воздействию некоторых протеаз. Целью данной работы было исследование влияния ферментов, которые чаще всего используются в различных методах выделения нейронов центральной нервной системы, на амплитудные и кинетические характеристики I_{NaP} . Измерение трансмембранных токов осуществляли с использованием метода patch-clamp в конфигурации "целая клетка" на пирамидальных нейронах CA1 зоны гиппокампа, изолированных без использования ферментов (контрольная группа), с использованием проназы E (*Streptomyces griseus*) или протеазы типа XXIII (*Aspergillus oryzae*). Показано, что использование проназы E и протеазы типа XXIII не приводит к изменению потенциала полумаксимальной амплитуды и константы наклона кривой стационарной активации относительно контрольной группы. Однако в случае использования протеазы плотность I_{NaP} была статистически меньше, чем при контрольных условиях или в случае использования проназы для выделения нейронов. Энзиматическая обработка нейронов может существенно влиять на результаты электрофизиологических исследований, что необходимо учитывать при выборе метода выделения нейронов. Также наши результаты свидетельствуют в пользу использования проназы E при энзиматической обработке нейронов для исследования I_{NaP} .
Ключевые слова: гиппокамп, постоянный натриевый ток, энзиматическая обработка, протеазы.

**O.O. Lunko, D.S. Isaev, O.P. Maximyuk,
O.A. Krishtal, E.V. Isaeva**

**THE EFFECT OF ENZYMATIC TREATMENT
USING PROTEASES ON PROPERTIES
OF PERSISTENT SODIUM CURRENT
IN CA1 PYRAMIDAL NEURONS OF RAT
HIPPOCAMPUS**

We investigated the effect of proteases, widely used for neuron isolation in electrophysiological studies, on the amplitude and kinetic characteristics of persistent sodium current (I_{NaP}) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Properties of I_{NaP} were studied on neurons isolated by mechanical treatment (control group) and by mechanical and enzymatic treatment using pronase E (from *Streptomyces griseus*) or protease type XXIII (from *Aspergillus oryzae*). We show that in neurons isolated with pronase E kinetic of activation and density of I_{NaP} was unaltered. Enzymatic treatment with protease type XXIII did not alter I_{NaP} activation but result in significant decrease in I_{NaP} density. Our data indicates that enzymatic treatment using pronase E for neuron isolation is preferable for investigation of I_{NaP} .

Key words: persistent sodium current, enzymatic treatment, protease, hippocampus.

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

REFERENCES

1. Kaneda M, Nakamura H, Akaike N. Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci*

Res. 1988 Apr;5(4):299–315.

2. Kay A R, Wong RK. Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods.* 1986 May;16(3):227–38.

3. Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol.* 1973 Oct;62(4):375–91.

4. Kleyman TR, Myerburg MM, Hughey RP. Regulation of ENaCs by proteases: An increasingly complex story. *Kidney Int.* 2006 Oct ;70(8):1391–2.

5. Oyama Y, Hori N, Allen CN, Carpenter DO. Influences of trypsin and collagenase on acetylcholine responses of physically isolated single neurons of *Aplysia californica*. *Cell Mol Neurobiol.* 1990 Jun;10(2):193–205.

6. Isaev D, Isaeva E, Shatskih T, Zhao Q, Smits NC, Shworak NW, et al. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2007 Oct 24;27(43):11587–94.

7. Isaeva E, Hernan A, Isaev D, Holmes GL. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Ann Neurol.* 2012 Aug;72(2):192–8.

8. Lunko O, Isaev D, Maximyuk O, Ivanchick G, Sydorenko V, Krishtal O, Isaeva E. Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neurosci Lett.* 2014 Jan; 559:30-3.

9. Vorobjev VS. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991 Jul;38(2-3):145–50.

10. Isaev D, Ivanchick G, Khmyz V, Isaeva E, Savrasova A, Krishtal O, Holmes GL, Maximyuk O. Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 2012 107(1):417-423.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: lunko@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.12.2013*

В.А. Макаrchук, О.В. Зеленюк, Г.О. Ушакова

Гіалуронатзв'язувальна активність білків мозку та підшлункової залози щурів за умов експериментального хронічного панкреатиту

Клітинний контакт з гіалуроновою кислотою як компонентом екстрацелюлярного матриксу відіграє важливу роль у розвитку багатьох фізіологічних і патологічних процесів. В експерименті на лабораторних щурах відтворено модель хронічного панкреатиту. Тривала оклюзія панкреатичної протоки підшлункової залози призвела до атрофії ацинарних клітин і поступового фіброзування органа. Встановлено, що розвиток хронічного панкреатиту супроводжується збільшенням у плазмі крові концентрації гіалуронової кислоти як маркера фіброзу підшлункової залози. Відбувся перерозподіл гіалуронатзв'язувальної активності рецепторів у підшлунковій залозі та відділах мозку: мозочку, гіпокампі і таламусі. Найбільш виражений перерозподіл ступеня афінності до гіалуронату спостерігався у мембранній фракції білків: у мозочку та таламусі – зниження, а у гіпокампі – підвищення чутливості до глікозаміноглікана, що може бути сигналом для певних адаптивних процесів у цих відділах головного мозку під впливом факторів, що супроводжують розвиток хронічного панкреатиту.

Ключові слова: хронічний панкреатит, підшлункова залоза, мозочок, гіпокамп, таламус, гіалуронова кислота, гіалуронатзв'язувальна активність білків.

ВСТУП

За останні роки у всьому світі та Україні спостерігається збільшення захворюваності на хронічний панкреатит [1]. Важливо зрозуміти основні механізми болю, причинами якого є запалення підшлункової залози, протокова аномалія та збільшення тиску в середині паренхіми органа і протоків. Гістологічні та нейрофізіологічні дослідження механізму болю показали його зв'язок з нервовим ушкодженням, що призводить до виникнення вісцеральної гіперчутливості з сенсibiliзацією центральної нервової системи і реорганізацією відділів мозку, які беруть участь в обробці вісцерального болю. Однак механізми, які лежать в основі функціональних та структурних змін, вивчені недостатньо [2, 3].

Нині замало інформації про молекулярні механізми взаємодії глікозаміногліканів міжклітинного матриксу зі специфічними

© В.А. Макаrchук, О.В. Зеленюк, Г.О. Ушакова

рецепторами на клітинній поверхні при розвитку багатьох патологій, в тому числі хронічного панкреатиту. Останнім часом активно вивчаються сигнальні механізми за участю глікозаміногліканів та гіалуронової кислоти.

Гіалуронова кислота – це лінійний нессульфатований глікозаміноглікан, який складається із одиниць, що повторюються: $(\beta,1\rightarrow4)$ -D-глюкуронова кислота- $(\beta,1\rightarrow3)$ -N-ацетил-D-глюкозамін, та синтезується на внутрішній поверхні клітинної мембрани однією з трьох трансмембранних синтаз гіалуронової кислоти, а потім транспортується до міжклітинного матриксу при подовженні ланцюга, сягаючи розмірів 10^6 Да [4, 5]. Раніше вважалося, що цей нессульфатований глікозаміноглікан є одним із важливих компонентів сполучної тканини [6]. Але за останні десятиріччя було показано, що в білій речовині центральної нервової системи гіалуронова кислота локалі-

зується навколо мієлінових волокон, а в сірій є однією з основних складових нейрональної сітки, що оточує тіла нейронів. Бере участь у проліферації гліальних клітин та дозріванні й у підтримці астроцитів мозку у стані спокою. Гіалуронова кислота накопичується в центральній нервовій системі при ураженні, де обмежує астрогліоз, але разом з тим пригнічує дозрівання клітин-попередників олігодендроцитів. Взаємодія гіалурунової кислоти з матриксними гіалуронатзв'язувальними протеїнами і рецепторами регулює багато таких аспектів поведінки клітин, як міграція, міжклітинна адгезія та диференціація [4, 5]. Нещодавно було висловлене припущення, що гіалурунова кислота є не лише фундаментальним структурним елементом перинейронального простору, а й безпосередньо впливає на синаптичну пластичність [7].

Існує велика кількість білків екстрацелюлярного матриксу, поверхні клітини, цитоплазми та ядра, що зв'язують гіалурунову кислоту. Білки, які зв'язують цей глікозаміноглікан на поверхні клітини, являють собою рецептори гіалурунової кислоти. Найбільш відомі серед них: трансмембранний глікопротеїн «кластер диференціації» (CD44) та рецептор для гіалурунатопоередкованої рухливості [8].

При хронічному панкреатиті ацинарна тканина заміщується сполучною, яка формується внаслідок збільшення відкладання та дезорганізації білків екстрацелюлярного матриксу, включаючи фібронектин, ламінін, колаген I, III, IV типів, а також гіалурунової кислоти [9].

Оскільки суттєві порушення структури та функцій підшлункової залози призводять до розвитку енцефалопатії [10, 11], метою нашої роботи було визначення зміни вмісту гіалурунової кислоти у плазмі крові щурів і загальної гіалурунотзв'язувальної активності білків (ГЗАБ) у підшлунковій залозі та структурно і функціонально різних відділах головного мозку тварин з експериментальним хронічним панкреатитом.

МЕТОДИКА

Експеримент проводили на білих лабораторних 6-місячних щурах-самцях (190–220 г) згідно з законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Щури знаходилися в стандартних умовах із природною зміною освітлення і дотриманням загального раціону віварію. За добу до експерименту тварин не годували, доступ до води був вільним. Для моделювання панкреатиту тваринам під наркозом (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг) здійснювали тривалу оклюзію панкреатичної протоки нерозсмоктуючою лігатурою «Prolene» 5/0 в хвостовій частині органа [12]. Потім операційну рану зашивали пошарово. Тварин було розділено на дві групи по 6 щурів у кожній. До I контрольної групи ввійшли псевдооперовані щури, яким здійснювали лише розтин шкірного покриву на череві й відразу його зашивали; до II – щури з хронічним панкреатитом. Після закінчення експерименту тварин на 30-ту добу декапітували після попереднього введення наркозу (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг). Гепаринизовану кров розділяли на плазму та еритроцити.

Для підтвердження розвитку хронічного панкреатиту проводили морфологічне дослідження тканини підшлункової залози, яке включало стандартну її фіксацію в рідині Буена, зневоднення у спиртах зростаючої концентрації та заливку шматочків тканини в парафінові блоки, приготування зрізів та фарбування їх гематоксиліном-еозином (за загальноприйнятим у гістологічній практиці методом), пікрофуксином (за Ван-Гізеном: дає змогу вибірково фарбувати сполучну тканину в червоний колір) та трикольорове якісне фарбування за Маллорі–Слінченко [13] із подальшим вивченням препаратів методом світлової мікроскопії.

Отримання білкових фракцій із підшлункової залози та мозку. Мозок щурів очищали від поверхневої плівки та капілярів, вилучали окремо мозочок, таламус і гіпокамп.

Гомогенізацію тканини підшлункової залози та мозку проводили в буфері А, що містив тріс-НСІ – 25 ммоль/л; рН 7,4; етилендіамінтетраоцет – 1 ммоль/л; в-меркаптоетанол – 2 ммоль/л; фосфометилсульфонілфторид – 0,2 ммоль/л; мертіолят – 0,01 %, у співвідношенні 1:10 при 4°C. Під час послідовних стадій центрифугування були виділені фракції, що містили цитозольні (розчинні) й мембранні білки (інкубація гомогенату в буфері А, що додатково містив тритон Х-100 – 2 %). Після цього осад ресуспендували в розчині буфера А, до складу якого додавали сечовину – 4 моль/л, екстракція проходила протягом 18 год. Подальше центрифугування проводили при 100 000 g протягом 60 хв, супернатант містив сечовиннорозчинні цитоскелетні/екстрацелюлярні білки. Отримані фракції білків використовували для визначення ГЗАБ.

Вміст загального білка у фракціях визначали за методом Бредфорд [14]. Для побудови калібрувальних кривих за стандарт використовували розчини бичого сироваткового альбуміну.

Для дослідження ГЗАБ в отриманих фракціях мозку та підшлункової залози був використаний твердофазний вуглеводферментний аналіз [15], який є модифікацією твердофазного імуноферментного аналізу. Його особливість полягає у використанні кон'югату, що складається з гіалуронової кислоти з нашітою ферментною міткою. Для проведення мікрометоду з різними фракціями мозку та екстрактом із підшлункової залози були підібрані оптимальні умови сорбції та зв'язування сорбованих білків з гіалуронатом. Для побудови калібрувальних кривих використовували розчини гіалуронату з визначеною концентрацією. Для оцінки результатів проводили вимірювання оптичної густини на спектрофотометрі "Anthos 2010" (Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм.

Значення ГЗАБ у пробі визначалося як відношення кількості гіалуронової кислоти (ГК), що зв'язалася із сорбованими білками проби, до кількості загального білка (ЗБ) у

даній пробі (нг зв'яз. ГК/мг). Концентрацію гіалуронової кислоти в плазмі крові досліджували за допомогою методу Голда [16].

Для статистичного аналізу даних використовували дескриптивну статистику: порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (критерію t Стьюдента) за нормального розподілу цих ознак, що виражені в інтервальній шкалі. Відповідність виду розподілу ознак закону нормального розподілення перевіряли за допомогою методу Шапіто-Уїлка. В інших випадках використовували непараметричний метод (U-критерій Мана-Уїтні). Кореляційний аналіз виконували за Пірсоном (для значень, що виражені в інтервальній шкалі). Відмінності, отримані за методом парних порівнянь, вважали вірогідними при $P < 0,05$. Всі вихідні результати, отримані при виконанні роботи, для оптимізації математичної обробки вводили у базу даних, побудовану за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel 2010 на персональному комп'ютері системи Pentium-400 на базі Windows XP. Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики, реалізованими стандартним пакетом прикладних програм SPSS for Windows 9.0 [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз панкреатобіоптатів із хвостового відділу підшлункової залози тварин з 30-добовою тривалою оклюзією панкреатичної протоки виявив зміни, що характеризують фіброзну стадію хронічного панкреатиту: склероз судин, значну атрофію ацинарної тканини, фіброзне перетворення, гранульоми. Забарвлення за Ван-Гізоном виявило міжчастковий та внутрішньочастковий фіброз. На рис. 1. представлений зразок тканини підшлункової залози, де слід відмітити атрофію ацинарної тканини та значний навколо- і внутрішньочасточковий фіброз органа. Морфологічний аналіз зразків із підшлункової залози щурів контрольної групи змін не виявив:

серед екзокринної тканини розташовувалися острівці Лангерганса різної форми та розміру, ацинарна тканина була без особливостей (рис. 1).

До малоінвазивних методів діагностики фіброзу підшлункової залози можна віднести визначення вмісту молекулярних сполук, що беруть участь у патофізіології процесу утворення позаклітинного матриксу, до яких можна віднести і гіалуронову кислоту. Вміст її в плазмі крові при хронічному панкреатиті відображає ступінь прогресування фіброзу при цій патології. Так, у плазмі крові тварин з оклюзією протоки підшлункової залози спостерігалось достовірне підвищення цього показника на 31,9 % ($P < 0,05$) з $1,28 \pm 0,06$ (контроль) до $1,88 \pm 0,11$ мкг/мл.

Як відомо, в патогенезі неврологічних ускладнень при панкреатиті провідну роль відіграє ферментативна дисфункція підшлункової залози, яка супроводжується виділенням великої кількості протеолітичних ферментів і надходження їх в кров'яне русло. Це призводить до розладу водно-електролітного балансу, іноді вуглеводного обміну, загальної інтоксикації. В головному мозку та інших відділах нервової системи

розвивається набряк, дисциркуляторні порушення, а також дистрофічні зміни нервових клітин, глії та мієлінових оболонок. Питання стосовно метаболізму глікозаміногліканів та їх специфічних рецепторів у підшлунковій залозі та головному мозку свавців унаслідок впливу патогенних чинників, викликаних розвитком хронічного панкреатиту, нині майже не вивчено. Важливим було проведення порівняльного аналізу змін загальної ГЗАБ у структурно і функціонально різних відділах мозку та підшлунковій залозі щурів за умов розвитку експериментального хронічного панкреатиту.

Через таку властивість глікозаміногліканів, як великий заряд і вплив на осмолярність міжклітинної рідини з'явилися первинні дані про регуляцію ними міжклітинних контактів. Експериментальні дослідження останніх років значно розширюють діапазон механізму дії глікозаміногліканів міжклітинного матриксу в системі передачі сигналу від однієї клітини до іншої. Важливе місце в цій системі відіграють спряжені групи: глікозаміноглікани та їх відповідні рецептори. Особливо гіалуронова кислота через її безпосередню участь у міжклітинному сигналюванні.

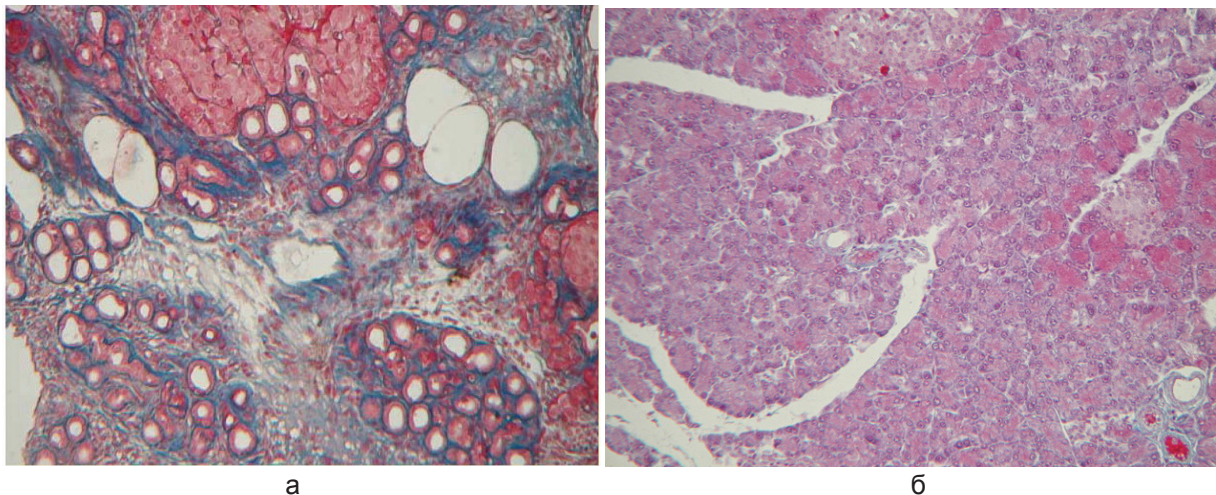


Рис. 1. Зразок тканини підшлункової залози щурів при експериментальному панкреатиті, індукованому тривалою оклюзією панкреатичної протоки (30-та доба). Атрофія ацинарної тканини, гіперплазія острівців, рихлий навколо- та внутрішньочасточковий фіброз (а). Нормальна структура підшлункової залози. У правому куті та у верхній частині зразку знаходяться ендокринні островки середнього розміру, без особливостей. Забарвлення за Маллорі-Слінченко, $\times 40$ (б)

Наші результати дають змогу порівняти розподіл ГЗАБ у цитозольній (розчинній), мембранній та екстрацелюлярній/цитоскелетній фракціях, що екстраговані із підшлункової залози та різних відділів головного мозку щурів.

Слід відмітити, що при хронічному панкреатиті достовірних змін в активності гіалуронатзв'язувальних білків розчинної фракції, екстрагованої із підшлункової залози, не відбувалося, а у мембранній фракції – спостерігалось зростання на 34,6 % ($P < 0,05$) відносно контролю. В цитоскелетній/екстрацелюлярній фракції достовірних змін активності білків, що зв'язують гіалуронат не було зареєстровано (рис. 2).

Встановлено, що вплив хронічного панкреатиту не призвів до достовірних змін ГЗАБ розчинної фракції, отриманої із мозочка та гіпокампа експериментальних тварин. У таламусі, що відповідає за перерозподіл інформації, яка надходить до його ядер у вигляді імпульсів, активність білків, які зв'язують гіалуронову кислоту, достовірно збільшилася щодо контрольного значення на 11,3 % ($P < 0,05$; рис. 3).

Нині вже ідентифіковано декілька гіалуронатзв'язуючих розчинних білків, характерних лише для нервової тканини. Наприклад, гіалуронектин і гіалуронатзв'язувальний білок

астроглії. В мозкових структурах важливу роль відіграють аутокоїди, що зв'язують гіалуронат (водорозчинні медіатори, що здійснюють переважно коротко дистанційну локальну дію). Проведений кореляційний аналіз у групі щурів з експериментальним хронічним панкреатитом виявив високий прямий зв'язок між ГЗАБ мембранної фракції, екстрагованої із підшлункової залози, та водорозчинної фракції, отриманої із таламуса ($r = 0,87$, $P < 0,05$).

При аналізі активності мембранних рецепторів, що зв'язують гіалуронат, було виявлено значення у мозочку на 41,3 % ($P < 0,05$), у таламусі – на 22,9 % ($P < 0,05$) відносно контролю. У гіпокампі спостерігалось навпаки зростання ГЗАБ на 37,7 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 3).

Таким чином, мембранні гіалуронатзв'язувальні рецептори (рецептор для гіалуронатопосередкованої рухливості, CD44 тощо) активно зв'язували гіалуронат у гіпокампі, тоді як в мозочку та таламусі цей процес знижувався. Отже, ці зміни свідчили про перерозподіл афінності до гіалуронату між різними відділами мозку: у мозочку та таламусі спостерігалось зниження, а у гіпокампі – підвищення чутливості, що може бути сигналом для певних адаптивних процесів у відділах мозку під час хронізації панкре-

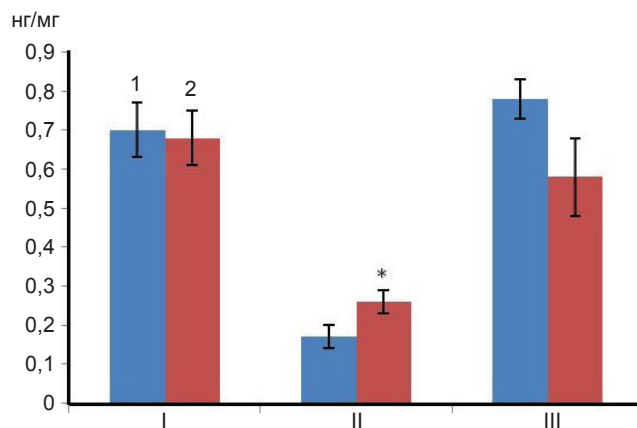


Рис. 2. Зміна гіалуронатзв'язувальної активності білків: I – розчинної, II – мембранної та III – цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції із підшлункової залози; 1 – контроль, 2 – щури з експериментально розвиненим хронічним панкреатитом, $P < 0,05$ порівняно з контролем

атиту. Таким чином, мембранні рецептори виявилися найбільш чутливими до впливу несприятливих факторів, викликаних ушкодженням підшлункової залози під час розвитку хронічного панкреатиту, у порівнянні з розчинними та цитоскелетними/екстрацелюлярними рецепторами.

У результаті впливу хронічного панкреатиту знизилася ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, екстрагованої з гіпокампа і таламуса, тобто зменшилась афінність рецепторів до гіалуронату (або зниження їх кількості). У гіпокампі зменшилась активність зв'язування гіалуронату порівняно з контролем на 30,6 % ($P < 0,05$), у таламусі – на 37,2 % ($P < 0,05$; див. рис. 3). При проведенні кореляційного аналізу було виявлено, що при зростанні в плазмі крові концентрації гіалуронової кислоти, знижується ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, екстрагованої з гіпокампа і таламуса ($r = -0,87$, $P < 0,05$ та $r = -0,87$, $P < 0,05$ відповідно). Високий зворотний кореляційний зв'язок спостерігався між ГЗАБ розчинної фракції, екстрагованої із підшлункової залози, та білків цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції

з таламуса і гіпокампа ($r = -0,90$, $P < 0,05$ та $r = -0,81$, $P < 0,05$ відповідно).

Результати нашого експерименту підтверджують важливу роль гіалуронової кислоти і білків, що її зв'язують, у патогенезі хронічного панкреатиту. Накопичення цього глікозаміноглікану часто пов'язане з порушенням експресії гіалуронатзв'язувальних білків під час ураження тканин при патологічному стані. Порушення регуляції експресії гіалуронової кислоти та білків, що її зв'язують, призводить до істотних змін у скоординованому регуляторному процесі, направленому на подолання захворювання, за допомогою клітинних і молекулярних регуляторних механізмів. У багатьох випадках ці компоненти беруть участь у регуляції таких функцій клітин, як вивільнення цитокінів, міграція клітин, апоптоз, регуляція клітинної рухливості, адгезії та активації тощо. Гіалуронова кислота та гіалуронатзв'язувальні білки здатні посилювати сигнал для прискорення імунного захисту. Водночас вони можуть виконувати захисну функцію, перешкоджаючи подальшому ураженню тканини, а також позитивно або негативно впливати на організм залежно

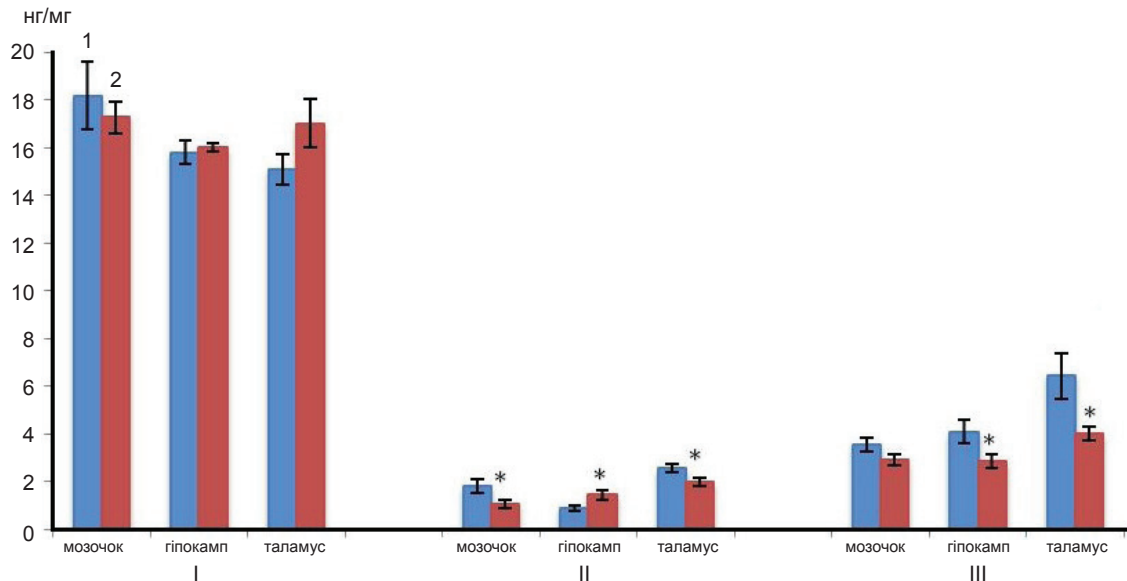


Рис. 3. Зміна гіалуронатзв'язувальної активності білків: I – розчинної, II – мембранної та III – цитоскелетної/екстрацелюлярної фракцій із різних відділів мозку шурів; 1 – контроль, 2 – шури з експериментально розвиненим хронічним панкреатитом, $P < 0,05$ порівняно з контролем

від їх розташування, розміру гіалуронової кислоти (при високій молекулярній масі має протизапальні властивості, при низькій – прозапальні, проангіогенні) і тривалості накопичення [18–23].

Гіалуронова кислота, як відомо, взаємодіє з різноманітними рецепторами клітинної поверхні, кожен з яких має свої функції. Таким чином, її функції визначаються білками, з якими вона асоціюється. Незважаючи на те, що CD44 зв'язується з різними лігандами екстрацелюлярного матриксу, цей глікозаміноглікан, напевне, його основний ліганд. CD44 впливає на клітину за допомогою регулювання актинового цитоскелета. Гіалуронова кислота існує з високою або низькою молекулярною масою і сигналювання за участю CD44 залежить від того, які ізоформи цього глікозаміноглікана зв'язуються з даним рецептором. Рецептор для гіалуронатопосередкованої рухливості взаємодіє з гіалуроновою кислотою як поза-, так внутрішньоклітинно. Наприклад, позаклітинний рецептор для гіалуронатопосередкованої рухливості відіграє ключову роль у забезпеченні рухливості клітин, зв'язуючись із гіалуроновою кислотою,

а внутрішньоклітинний – тісно пов'язаний з мікротрубочками, що відіграє важливу роль у контролі клітинного циклу і в мітотичному формуванні веретена та стабільності. Чутливий до гіалуронату рецептор лімфатичних судин – мембранний рецептор з високою специфічністю до гіалуронової кислоти. З її допомогою він опосередковує клітинну адгезію і міграцію в лімфатичній системі. Чутливий до гіалуронату рецептор для ендцитозу був вперше ідентифікований Zhou і співавт. в 2000 р., знаходиться в серці, мозку, нирках, епендимальних клітинах, що вистилають шлуночки головного мозку [19, 24, 25].

Порушення в системі «гіалуронатзв'язувальні рецептори–гіалуронова кислота», пов'язані зі зниженням або підвищенням гіалуронатзв'язувальної здатності білків, є результатом токсикації організму внаслідок розвитку хронічного панкреатиту. Нами було встановлено, що при хронізації панкреатиту активність гіалуронатзв'язувальних рецепторів як розчинної, так і цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, які екстраговані із підшлункової залози була приблизно рівна між собою і в середньому в 3,1 раза переви-

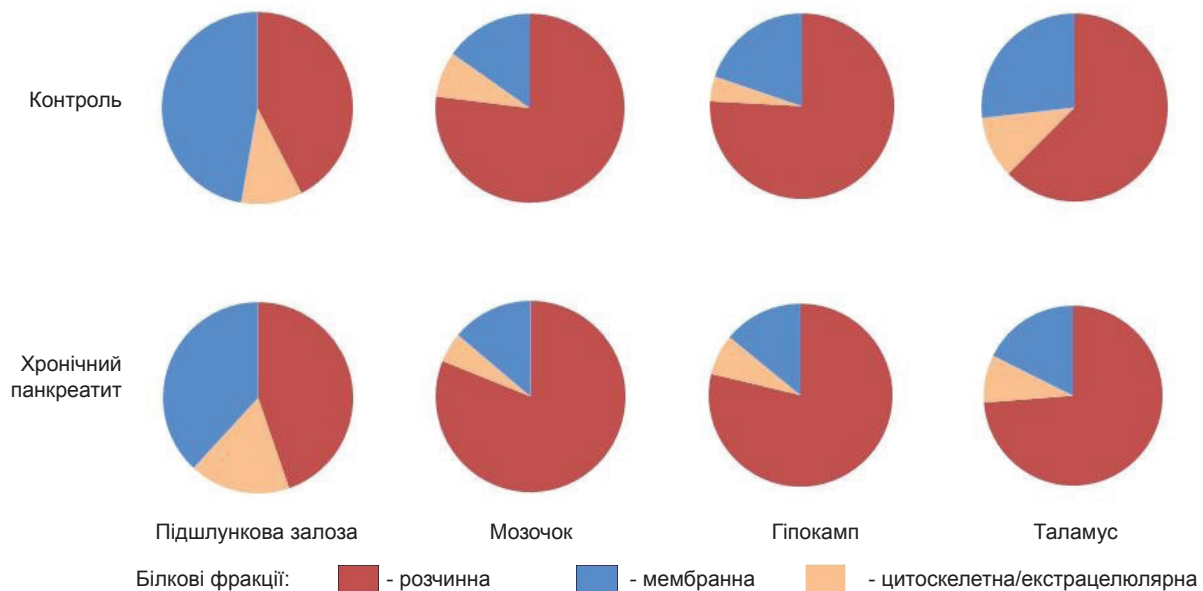


Рис. 4. Співвідношення гіалуронатзв'язувальних білків у різних фракціях, що отримані із підшлункової залози та відділів мозку

щувала активність зв'язування гіалуронату мембранними рецепторами. Слід відзначити чутливу реакцію на несприятливий вплив, викликаний захворюванням підшлункової залози, саме мембранних білків, що проявилось достовірним зростанням ГЗАБ. Характерною особливістю водорозчинних білків-рецепторів, отриманих із досліджуваних відділів мозку, є їх відносно висока активність, яка в середньому (для мозочка, гіпокампа і таламуса) в 10 разів перевищувала активність мембранних та в 4,1 раз – цитоскелетних/екстрацелюлярних білків, які зв'язують гіалуронат. У таламусі відбувалося достовірне підвищення ГЗАБ водорозчинної фракції. Так, активність зв'язування гіалуронату мембранними рецепторами, виділеними із гіпокампа, достовірно зростала, тоді як у мозочку та таламусі ГЗАБ знижувалася, що свідчить про зміни афінності мембранних рецепторів до гіалуронату та про зміни в процесах передачі сигналів від однієї клітини до іншої. Найвища активність зв'язування гіалуронату цими рецепторами відзначалася в таламусі, найнижча – в гіпокампі. Розвиток хронічного панкреатиту викликав зниження ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, виділеної із мозочка, гіпокампа та таламуса. Найвища гіалуронатзв'язувальна здатність цих білків спостерігалася в таламусі, а найнижча – в мозочку (рис. 4).

Таким чином, підвищений вміст гіалуронової кислоти у плазмі крові на 31,9 % ($P < 0,05$) може бути використаний як непрямий малоінвазивний діагностичний показник рівня запалення та фіброзу підшлункової залози при хронічному панкреатиті. Розвиток експериментального хронічного панкреатиту супроводжувався значним перерозподілом ступеня афінності рецепторів до гіалуронату як в підшлунковій залозі, так і у досліджуваних відділах мозку. Найбільш виражений перерозподіл спостерігався у мембранній фракції білків: у мозочку та таламусі спостерігалось зниження, а у гіпокампі – підвищення чутливості, що може бути сигналом для певних

адаптивних процесів у цих відділах мозку під час розвитку хронічного панкреатиту.

В.А. Макаруч, А.В. Зеленюк, Г.А. Ушакова

ГИАЛУРОНАТСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ МОЗГА И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

Клеточный контакт с гиалуроновой кислотой как компонентом экстрацеллюлярного матрикса играет важную роль в развитии многих физиологических и патологических процессов. В эксперименте на лабораторных крысах воспроизведена модель хронического панкреатита. Длительная окклюзия протока поджелудочной железы вызвала атрофию ацинарных клеток и фиброзирование органа. Установлено, что развитие хронического панкреатита сопровождается ростом в плазме крови концентрации гиалуроновой кислоты как маркера фиброза поджелудочной железы. Происходило перераспределение гиалуронатсвязывающей активности рецепторов в поджелудочной железе и отделах мозга: мозжечке, гиппокампе и таламусе. Наиболее выраженное перераспределение степени аффинности к гиалуронату наблюдалось в мембранной фракции белков: в мозжечке и таламусе происходило снижение, а в гиппокампе – повышение чувствительности к данному гликозаминогликану, что может служить сигналом для определенных адаптивных процессов в этих отделах головного мозга под влиянием факторов, сопровождающих развитие хронического панкреатита.

Ключевые слова: хронический панкреатит, поджелудочная железа, мозжечок, гиппокамп, таламус, гиалуронозная кислота, гиалуронатсвязывающая активность белков.

V.A. Makarchuk, O.V. Zeleniuk, G.O. Ushakova

THE ACTIVITY OF HYALURONATE-BINDING PROTEINS IN THE BRAIN AND PANCREAS DURING EXPERIMENTAL CHRONIC PANCREATITIS IN RATS

Cell contact with hyaluronic acid as a component of the extracellular matrix plays an important role in the development of many physiological and pathological processes. In experiments on laboratory rats, the model of chronic pancreatitis was reproduced. Prolonged occlusion of the pancreatic duct caused the pancreatic acinar cells atrophy and pancreatic fibrosis. It was found that the development of chronic pancreatitis accompanied by an increase of concentrations of hyaluronic acid in plasma as a marker of fibrosis of the pancreas. The redistribution of hyaluronate-binding activity of the receptor in the pancreas and the brain: cerebellum, hippocampus and thalamus were observed. The most pronounced redistribution of degree of affinity to hyaluronate was observed in the mem-

brane fraction of proteins: in the cerebellum and thalamus the sensitivity to this glycosaminoglycan was decreased, while in the hippocampus the sensitivity was increased, which may serve as a signal for some adaptive processes in these parts of the brain under the influence of factors that accompany the development of chronic pancreatitis.

Key words: chronic pancreatitis, pancreas, cerebellum, hippocampus, thalamus, hyaluronic acid, hyaluronate-binding activity of the protein.

SI "Institute of Gastroenterology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipropetrovsk;
Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University

REFERENCES

- Stepanov YuM, Zaichenko NG. Chronic pancreatitis: biliary mechanism, factors and course. *Zaporozhye Med J.* 2012; 70(1): 46-50.
- Frøkjær JB, Olesen SS, Gram M, Yavarian Y, Bouwense SA, Wilder-Smith OH, Drewes AM. Altered brain microstructure assessed by diffusion tensor imaging in patients with chronic pancreatitis. *Gut.* 2011; 60(11): 1554-1562.
- Frøkjær JB, Bouwense SA, Olesen SS, Lundager FH, Eskildsen SF, van Goor H, Wilder-Smith OH, Drewes AM. Reduced Cortical Thickness of Brain Areas Involved in Pain Processing in Patients With Chronic Pancreatitis. *Clin Gastroenterol and Hepatol.* 2012; 10(4): 434-438.
- Cargill R, Kohama SG, Struve J, Su W, Banine F, Witkowski E, Back SA, Sherman LS. Astrocytes in aged nonhuman primate brain gray matter synthesize excess hyaluronan. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(4): 830.e13-830.e24.
- Choi K.Y., Saravanakumar G., Park J.H., Park K. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2012; 99: 82-94.
- Weinstein-Oppenheimer CR, Aceituno AR, Brown DI, Acevedo C, Ceriani R, Fuentes MA, Albornoz F, Henríquez-Roldán CF, Morales P, Maclean C, Tapia SM, Young ME. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *J Translational Med.* 2010; 8:59.
- Frischknecht R, Gundelfinger ED. The Brain's Extracellular Matrix and Its Role in Synaptic Plasticity. *Advances in Exp Med and Biol.* 2012; 970: 153-171.
- Liang J, Jiang D, Jung Y, Xie T, Ingram J, Church T, Degan S, Leonard M, Kraft M, Noble PW. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in human asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128(2): 403-411.
- Sirenko OYu. Pancreatic stellate cells as a morphological basis for the development of pancreatic fibrosis. *Morphology.* 2010; 4(1): 5-12.
- Ding Z, Liu J, Lin R, Hou XH. Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1. *J Digestive Diseases.* 2012; 13(3): 179-185.
- Hornik A, Porcel F, Agha C, Flaster M, Vidal SM, Schneck MJ, Lee J, Biller J. Central and Extrapontine Myelinolysis Affecting the Brain and Spinal Cord. An Unusual Presentation of Pancreatic Encephalopathy. *Frontiers in Neurology.* 2012; 3: 135.
- Page BJ, Toit DF, Muller C, Mattysen J, Lyners R. An Immunocytochemical Profile of the Endocrine Pancreas Using an Occlusive Duct Ligation Model. *J Pancreas.* 2000; 4(1): 191-203.
- Sapozhnikov A.G., Dorosevich A.E. Histological and microscopical technique: Handbook. – Smolensk: "SAU", 2000: 477 p.
- Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1985; 72(1-2): 248-254.
- Dolzhenko MI, Lepekhin EA, Berezin VA. A novel methods for evaluation of carbohydrate-binding activity: enzyme-linked carbohydrate-binding assay (ELCBA). *Biochem Mol Biol Intern.* 1994; 34(2): 261-271.
- Gold EW. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels. *Biochem. et Biophys Acta.* 1981; 673(4): 408-415.
- The visible statistics in medicine. Edited by A. Petri, KM Syebin: Heotar-Med, 2003: 144 p.
- Adrych K., Smoczyński M., Sledzinski T., Korczynska J., Goyke E., Swierczynski J. Coordinated increase in serum platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-β1 in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatol.* 2011; 11(4): 434-440.
- Jackson DG. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol Rev.* 2009; 230(1): 216-231.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011; 91(1): 221-264.
- Johnsson C, Hällgren R, Tufveson G. Role of hyaluronan in acute pancreatitis. *Surgery.* 2000; 127(6): 650-658.
- Lu XL, Song YH, Fu YB, Si JM, Qian KD. Ascorbic acid alleviates pancreatic damage induced by dibutyltin dichloride in rats. *Yonsei Med. J.* 2007; 48 (6): 1028-1034.
- Wang CH, Gao ZQ, Ye B, Cai JT, Xie CG, Qian KD, Du Q. Effect of emodin on pancreatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(3): 378-382.
- Sadowitz B, Seymour K, Gahtan V, Maier KG. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *J Surg Res.* 2012; 173(2): 63-72.
- Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol.* 1996; 135(4): 1139-1150.

ДУ «Ін-т гастроентерології НАМН України», Дніпропетровськ;
Дніпропетров. нац. ун-т ім. Олесь Гончара
E-mail:

Матеріал надійшов
до редакції

І. В. Верещака, О. В. Легедза, М. Дорновський, А. В. Горковенко, В.І. Хорєвін

Активність м'язів плечового пояса та плеча при створенні кистю руки ізометричного зусилля з циклічною зміною його напрямку

У 11 здорових чоловіків віком від 25 до 40 років проаналізовано електроміограми восьми м'язів руки, які генерувалися при створенні однакових за рівнем амплітуд ізометричних зусиль кистю. Обстежувані повинні були відстежувати маркер-курсор, що рухався по колу на екрані монітора з постійною швидкістю (16 %/с). Таким чином, обстежуваний рівномірно змінював напрямок реалізації зусилля відносно центру кисті, а його амплітуда залишалася постійною. Встановлено, що при формуванні статичного зусилля, однакового в усіх напрямках відносно точки його прикладання, активність розгиначів виникала переважно при розгинанні у плечовому та ліктьовому суглобах, тоді як у згиначах вона спостерігалася в усіх напрямках зусилля, а її максимальна амплітуда була спрямована у бік згинання. Передбачається, що активність м'язів руки при виконанні завдання в умовах відстеження цільового сигналу у вигляді кола організована за принципом синергій, які можуть бути пов'язані з особливостями завдання.

Ключові слова: двосуглобові ізометричні зусилля, центральні моторні команди, вектор зусилля.

ВСТУП

Одним із фундаментальних питань сучасної нейрофізіології є організація моторного контролю [1]. Особливо це важливо відносно нервового забезпечення рухової активності руки людини [2]. Здатність анатомічних особливостей руки людини полягає в тому, що плечовий суглоб найбільш рухливий і забезпечує значний обсяг рухів верхньої кінцівки [3–5] при певних обмеженнях у напрямках руху в ліктьовому суглобі [6]. Нині прийнято, що при виконанні моторних завдань активація м'язів плеча та плечового пояса відбувається у вигляді відносно невеликої кількості моторних модулів або синергій [7, 8]. За Шеррингтоном [4], синергічними м'язами є такі, що діють механічно в тому самому напрямку на той самий суглоб або подібно на два сусідніх суглоба. Більшість виконаних дотепер робіт, спрямовані на дослідження м'язової активності в синергічних м'язах в одно- [9, 10] чи двосуглобових рухах верхньої кінцівки у

людини тільки в певних напрямках [11–16].

Мета нашої роботи – дослідити організацію центральних моторних команд, що надходять до м'язів руки людини при генерації однакової амплітуди статичного зусилля в усіх його напрямках.

МЕТОДИКА

Обстежено 11 здорових чоловіків віком від 20 до 40 років. Всі вони були правшами без яких-небудь порушень опорно-рухового апарату або неврологічних захворювань. Завдання дослідження полягало у з'ясуванні електроміограми (ЕМГ) активності основних м'язів плеча та плечового пояса при створенні однакових за амплітудою цілеспрямованих ізометричних зусиль кистю в горизонтальній площині в умовах відстеження цільового сигналу у вигляді кола.

Під час експерименту обстежуваний кистю правої руки утримував руків'я при-

© І. В. Верещака, О. В. Легедза, М. Дорновський, А. В. Горковенко, В.І. Хорєвін

строю, що давало змогу вимірювати зусилля, котре розвивається м'язами плечового пояса та плеча і прикладається у горизонтальній площині до руків'я. Останнє знаходилося на рівні плечового суглоба. Передпліччя обстежуваного утримувалося у горизонтальному положенні за допомогою лямки, підвішеної за трос біля ліктьового суглоба. Це дало можливість нівелювати надлишкове зусилля, що створювалося б вагою руки у розслабленому стані. Вимірювач сили являв собою розташовану вертикально сталеву консоль с круглим перерізом, її нижній кінець кріпився до підставки, вільно з'єднаної з платформою. Вона була виготовлена зі сталевого циліндричного стрижня. Руків'я кріпилося до верхнього кінця консолі. Деформацію останньої, яка пропорційна силі, що прикладається до руків'я (два взаємоперпендикулярних компонента сили), з високою точністю вимірювали за допомогою тензодатчиків, прикріплених

з обох боків консолі. Під час дослідження консоль розташовували таким чином, що вищезазначені площини деформації були перед обстежуваним у парасагітальній і парафронтальній площинах. Положення кінцівки не змінювалося: кут у плечовому суглобі становив 75° (зовнішній кут відносно фронтальної площини), а у ліктьовому – 90° (між осями плеча та передпліччя) (рис. 1, а).

Сигнали датчиків вводили в персональний комп'ютер, який реєстрував рівень зусилля та сигнали ЕМГ досліджуваних м'язів. На моніторі другого комп'ютера візуально відображалися характеристики еталонного зусилля. При цьому обстежуваний повинен був відслідковувати траєкторію тестового сигналу переміщенням маркера, який рівномірно рухався на екрані монітора по колу за стрілкою годинника з кутовою швидкістю $16^\circ/\text{с}$.

Кінцеве положення маркера на лінії траєкторії кола визначалося рівнем реального

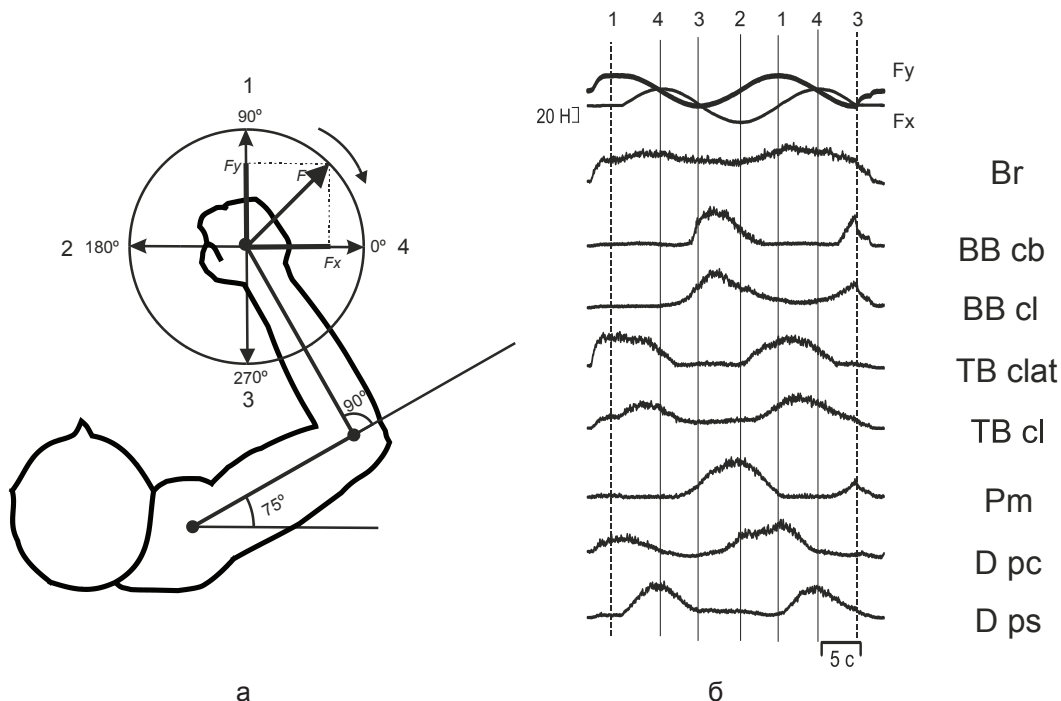


Рис. 1. Схема проведення експерименту: а – положення руки обстежуваного під час експерименту з указаними суглобовими кутами (75° у плечовому та 90° у ліктьовому суглобах) та схематичне зображення цільової траєкторії з вектором зусилля на координатні осі (x, y), б – усереднені записи часового перебігу зусилля та відповідні записи ЕМГ-активності, що відводилася від м'язів: Br, BB cb, BB cl, TB clat, TB cl, Pm, D pc, D ps. Вертикальними пунктирними лініями (1, 2, 3, 4) позначені проекції вектора зусилля при відтворенні цільової траєкторії. 20Н – стаціонарний цільовий рівень зусилля

зусилля (20 Н). Тривалість кожної окремої реалізації була 38 с. На рис. 1, а показано проекцію цільової траєкторії у вигляді кола на точку прикладання зусилля кистю. Коло поділене умовно на 4 сектори, кожному з яких відповідає певна частина усередненого графіка ЕМГ, межі відмічено характеристичними точками 1, 2, 3, 4 (див. рис. 1, б). У верхній частині рисунка показано 2 криві, яким відповідає зусилля, генероване за віссю абсцис (P_x) і ординат (P_y). Результуючим був вектор зусилля P .

За допомогою поверхневих електродів («Віорас System EL 503», США) в умовах проведення всіх експериментальних серій відводили ЕМГ-сигнали від восьми м'язів руки: *m. brachioradialis* (Br, згинач ліктьового суглоба), *m. biceps brachii, caput breve* (BB cb, двосуглобовий згинач), *m. biceps brachii, caput longum* (BB cl, згинач ліктьового суглоба), *m. triceps brachii, caput laterale* (TB clat, розгинач ліктьового суглоба), *m. triceps brachii, caput longum* (TB cl, двосуглобовий розгинач), *m. pectoralis major* (Pm, згинач плечового суглоба), *m. deltoideus, pars clavicularis* (D pc, розгинач плечового суглоба), *m. deltoideus, pars scapularis* (D ps, розгинач плечового суглоба). Для реєстрації ЕМГ застосовували підсилювачі з полосою пропускання 0,1–1000 Гц та плати аналогово-цифрового перетворення PCI 6071E і 6023E («National Instruments», США). Частота дискретизації становила $2 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$. В експериментах використовували пакет програм «LAB VIEW 6» та «7». У режимі off-line сигнали ЕМГ піддавали двонапівперіодному випрямленню та низькочастотній фільтрації (цифровий фільтр Баттерворта четвертого порядку з частотою зрізу 15 Гц). Сигнал зусилля також фільтрували за такими самими показниками, як і сигнал ЕМГ. Після попередньої обробки сигнали усереднювали за десятьма реалізаціями однакових тестів. Амплітуди усереднених ЕМГ розглядали як оцінку поточної інтенсивності центральних моторних команд, які надходили до м'язів плечового пояса та плеча в цьому силовому тесті.

Для кількісних оцінок ЕМГ-сигнал за допомогою процедури нелінійної регресії був апроксимований функцією, що являла собою суму сталої величини та двох косинусів:

$$y = R + A \cos((x - x_0)\pi/180) + B \cos(2(x - x_0)\pi/180),$$

де R – середнє значення ЕМГ у відсотках; x_0 – початковий кут повороту кривої у градусах; A і B – параметри рівняння регресії у відсотках; x – кут розвитку зусилля у градусах; y – апроксимована амплітуда ЕМГ у відсотках.

Косинус вибраний як парна симетрична функція, яка не змінює свій знак залежно від знаку аргументу x заданої функції. Це дало змогу досить точно вирівняти ЕМГ у полярній системі координат, зберігши при цьому всі нюанси акцентованого зміщення ЕМГ-сигналу відносно центра координат в певному секторі кола, якщо таке спостерігалось. На рис. 2. зображені секторні діаграми зміни активності двох м'язів-згиначів (BB cb і Pm) та розгиначів (TB cb і D ps) плечового пояса, а також плеча до та після застосування методу кількісного вирівнювання їх ЕМГ.

ЕМГ нормували відповідно до ЕМГ-сигналів м'язів, які були зареєстровані під час створення обстежуваним максимального добровільного зусилля у відповідному напрямку.

РЕЗУЛЬТАТИ

Виконання тестових завдань призводило до ізометричного скорочення всіх м'язів верхньої кінцівки кожного обстежуваного. При цьому ЕМГ досліджених восьми м'язів відрізнялася, про що свідчить розташування останніх у різних секторах полярних координат. Залежно від переважного розташування апроксимованих ЕМГ в одному із секторів кругової діаграми оцінювали домінування активності м'язів у одному з напрямків (рис. 3, 4). Спрямування секторів функціональної активності для згиначів ліктьового суглоба, біартикулярних м'язів-згиначів і згиначів плеча збігалось з орієнтацією генерованого зусилля у бік згинання перед-

пліччя. Така сама тенденція спостерігалась і у групі м'язів-розгиначів. Створення зусиль, які забезпечувалися спробами згинання в обох суглобах, в основному було пов'язано з активацією м'язів-згиначів (Br, BB cb, BB cl, Pm), тоді як активність антагоністичних м'язів-розгиначів (TB cl, TB clat, D ps) за таких умов малопомітна.

Для більш точного визначення ділянки найбільшої активності для кожного м'яза розраховували відношення його загальної ЕМГ-активності до такої у кожній з чотирьох секторів кола як операційного простору (див. рис. 1, а). Встановлено, що активація досліджуваних м'язів у різних обстежуваних у цих експериментальних умовах дещо відмінна, але загалом її патерн був відносно стереотипним. Наприклад, для першого і другого обстежуваних (див. рис. 3, 4) м'язи-згиначі проявляли свою активність переважно у III

секторі операційного простору (напрямок вектора зусилля 180–270°). Виняток становила активність BB cl у другого обстежуваного (див. рис. 4). Суттєвий внесок у генерацію як згинальних, так і розгинальних ізометричних зусиль належить згиначеві ліктьового суглоба Br, на що вказує досить широкий сектор його активності для обох обстежуваних. Таким чином, можна стверджувати, що згаданий м'яз проявляв високий рівень коактивації в умовах створення зусиль у напрямку розгинання ліктьового суглоба.

Дещо складніше здійснювалася реалізація розгинальних зусиль. Слід відмітити, що сектори активності м'язів-розгиначів мали більш вибіркового характеру, ніж такі для м'язів-згиначів (див. рис. 3, 4). У цьому разі зусилля створювалося за рахунок підвищення активності м'язів-розгиначів ліктьового суглоба (TB clat, TB cl) у I четверті (0–90°) та

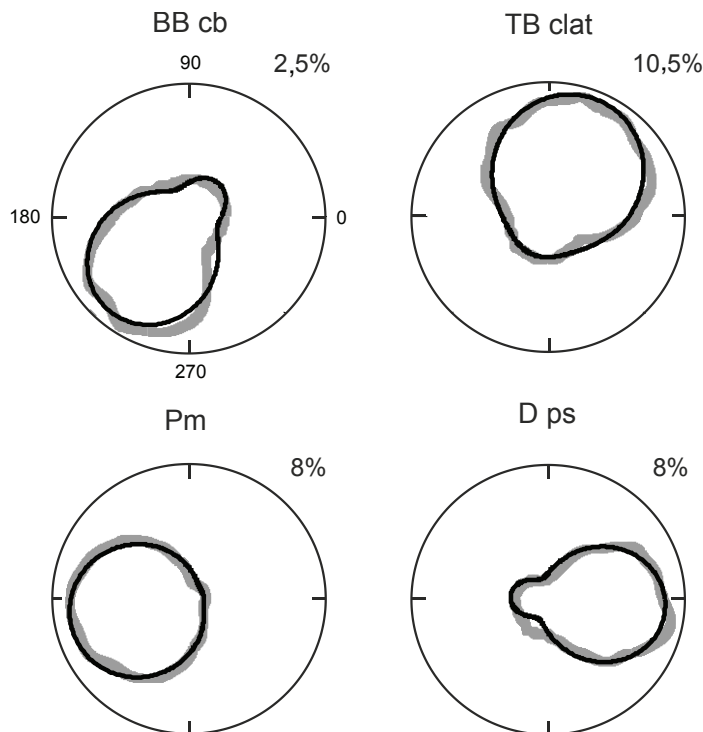


Рис. 2. Кількісна оцінка зміни ЕМГ-активності м'язів. Ілюструються секторні діаграми зміни ЕМГ-активності двосуглобового згинача (BB cb) флексора (Pm) та екстензора (D ps) плечового суглоба і розгинача ліктьового суглоба (TB clat) до застосування методу випрямлення ЕМГ-сигналів (лінія сірого кольору) та після (лінія чорного кольору). Праворуч над діаграмою вказано, яку частину зовнішнього кола займає ЕМГ-активність м'язів порівняно з максимальним зусиллям, що розвиває обстежуваний

плеча (D ps, D ps) – у IV (270–0°). Але така генерація супроводжувалася досить помітною коактивацією м'язів-згиначів (Br, BB cl). Були також наявні індивідуальні відмінності: для першого обстежуваного основна функціональна активність D ps спостерігалась у I секторі, а для другого – у II (90–180°). Також помітною була різниця в активації D ps; якщо для першого обстежуваного максимум її активності приходився на I сектор, то для другого вона збільшувалась у IV.

З використанням методу One-Way ANOVA зіставляли амплітуди ЕМГ-активності м'язів плечового пояса та плеча у різних секторах у всіх обстежуваних (рис. 5). Статистичний аналіз показав наявність достовірної різниці

між амплітудами ЕМГ-активності м'язів-згиначів (BB cb, BB cl, Pm) у II та III секторах. Досягнувши максимуму своєї амплітуди у III секторі ЕМГ-активність цих м'язів суттєво зменшилась у IV секторі. Як відмічалось раніше, досить вираженою була амплітуда згинача ліктьового суглоба Br, на що вказує відсутність достовірних змін у його активності в умовах створення як згинальних, так і розгинальних зусиль ($P > 0,05$). Незначна амплітуда м'язів-згиначів у I та IV секторах (ділянки функціональної активності м'язів-розгиначів) вказує на ознаки коактивації обох груп м'язів.

При створенні розгинальних зусиль м'язи-розгиначі плечового пояса та плеча у

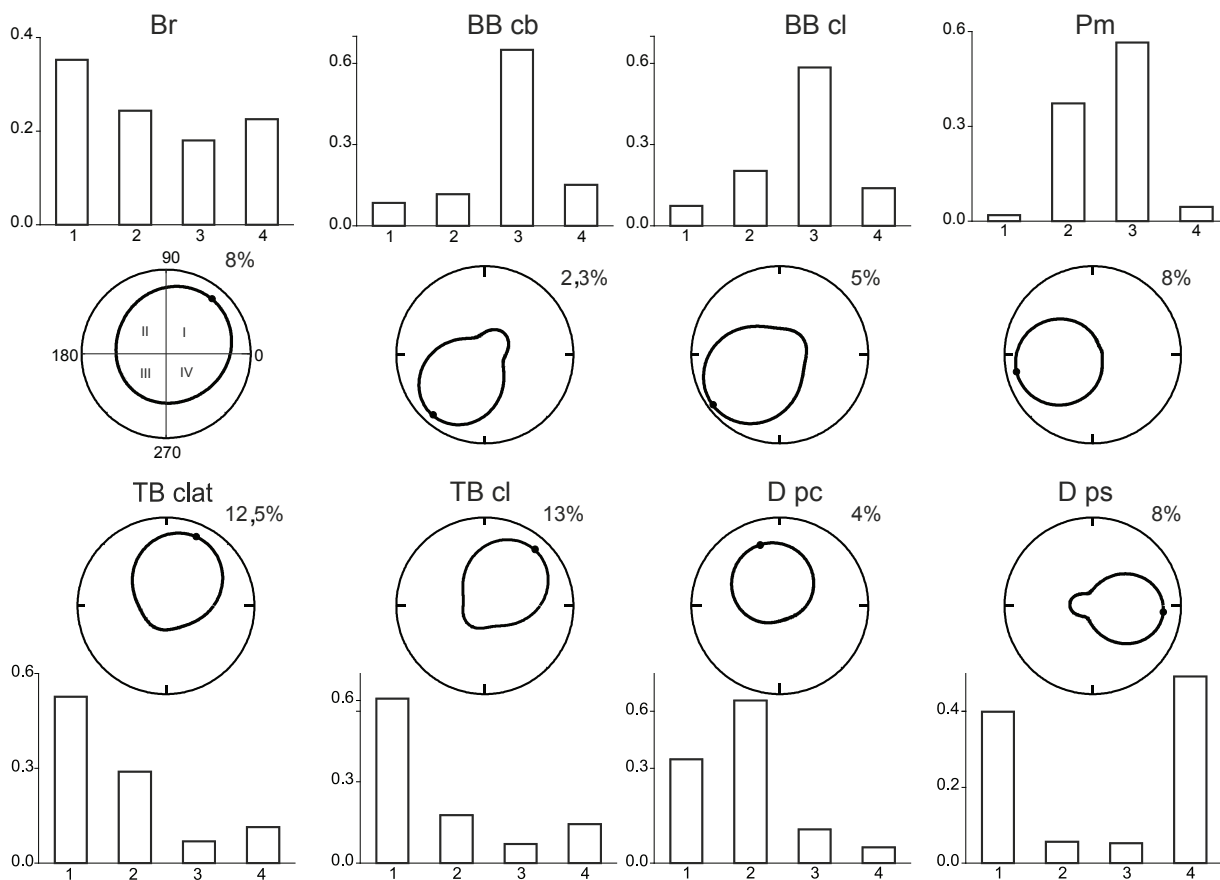


Рис. 3. Секторні діаграми та гістограми зміни ЕМГ-активності м'язів плечового пояса та плеча у першого обстежуваного. На секторних діаграмах зображено зміни активності м'язів в умовах зміни напрямку вектора зусилля. Гістограми ілюструють відношення ЕМГ-активності певного м'яза (вісь абсцис) в одній з чвертей (вісь ординат) до його загальної ЕМГ-активності

всіх обстежуваних проявляли свою ЕМГ-активність переважно у I секторі. Незважаючи на те, що функціональними ділянками м'язів-розгиначів є I та IV сектори, спостерігалася суттєва різниця амплітуди ЕМГ в межах окремих секторів. З переходом у II та III сектори реалізації зусилля амплітуда ЕМГ-сигналів м'язів-розгиначів суттєво зменшувалася, про що свідчить наявність статистично вірогідної різниці при порівнянні ЕМГ останніх в I та IV секторах. Варто зауважити, що при створенні згинальних зусиль рівень коактивації м'язів-розгиначів був значно меншим порівняно зі м'язами-згиначами (див. рис. 3, 4).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Нами було застосовано такий експериментальний підхід, який дав змогу дослідити

ЕМГ-активність м'язів плечового пояса та плеча в ізометричному режимі при створенні двосуглобових зусиль у двох взаємно перпендикулярних напрямках горизонтальної площини. Такий підхід суттєво відрізняє це дослідження від проведених нами раніше, а також доповнює та розширює отримані дані щодо організації двосуглобових ізометричних рухів [11–13].

Наведені вище результати свідчать, що при створенні кистю постійних за амплітудою циклічних зусиль у напрямку згинання відбувається значна активація згиначів та значно менше – розгиначів, а при спрямуванні зусилля у бік розгинання домінує активність розгиначів при одночасній відносно невеликій активації згиначів. Це вказує на те, що основні м'язи верхньої кінцівки коактивуються при формуванні в горизонтальній

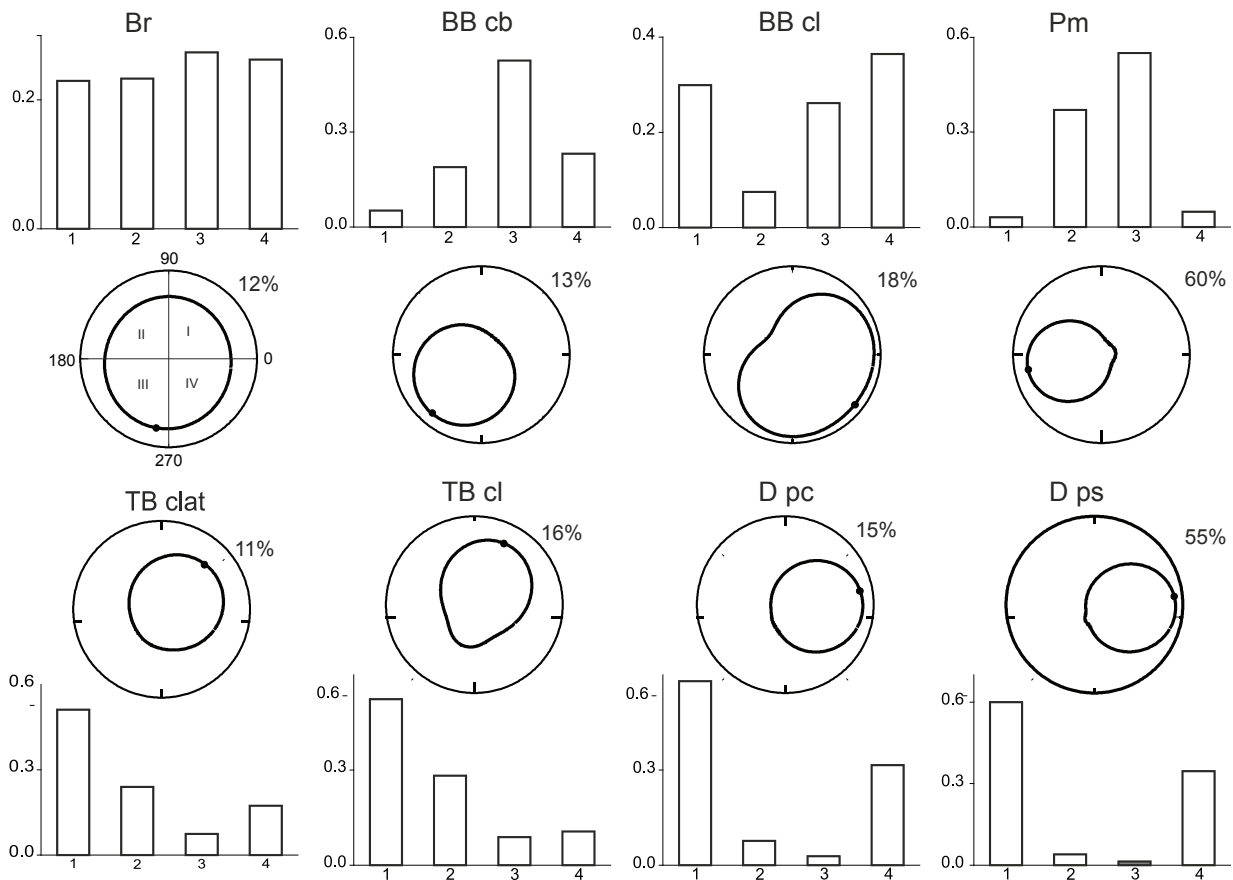


Рис. 4. Секторні діаграми та гістограми зміни ЕМГ-активності м'язів плечового пояса та плеча у другого обстежуваного

площині статичних зусиль, однакових за амплітудою та спрямованих в усіх напрямках операційного простору. Відомо, що обстежувані використовують коактивацію антагоністів для стабілізації суглобів під час зовнішніх навантажень, що забезпечує необхідну жорсткість руки, яка зменшується в умовах повторення рухів, тобто під час навчання [14, 15].

Окремо слід зазначити, що ЕМГ Вг мала стабільну амплітуду в усіх 4 секторах операційного простору відносно ЕМГ інших м'язів, що вказує на приблизно однакову активацію цього м'яза в усіх напрямках реалізації зусилля. Наші результати узгоджуються з літературними даними, що одна з функцій Вг полягає в стабілізації ліктьового суглоба [9]. Фіксація прямого кута між осями плеча та передпліччя (це передбачено протоколом дослідження) потребувала, можливо, постійної ЕМГ-активності Вг, яка була однаковою за амплітудою.

Відомо, що стабільність плечового суглоба в реальних рухах переважно зумовлена

м'язовою активністю [3, 6, 17, 18]. В роботі досліджено три м'язи плечового пояса (Pm, D pc, D ps), які виявляли активність тільки в окремих секторах. Водночас завдяки функціонуванню м'язів так званої обертової манжетки (від англ. rotator cuff) досягається постійна співосність головки плечової кістки та лопатки [3, 18]. Вищезгадані м'язи забезпечують не тільки стабілізацію плечового суглоба, але виявляють значну активність при відведенні плеча [19].

Результати свідчать, що створення дво-суглобових ізометричних зусиль м'язами плечового пояса та плеча були наслідком одночасної активації агоністів та антагоністів. Це призводило до характерних синергічних взаємопов'язаних змін ЕМГ у досліджених м'язах. Так, при спрямуванні зусилля у напрямку згинання плеча і передпліччя (III сектор) значна активність згиначів останнього супроводжувалася в декілька разів меншою активацією розгиначів, а у разі створення розгинальних зусиль подібні синергічні співвідношення, але зворотного

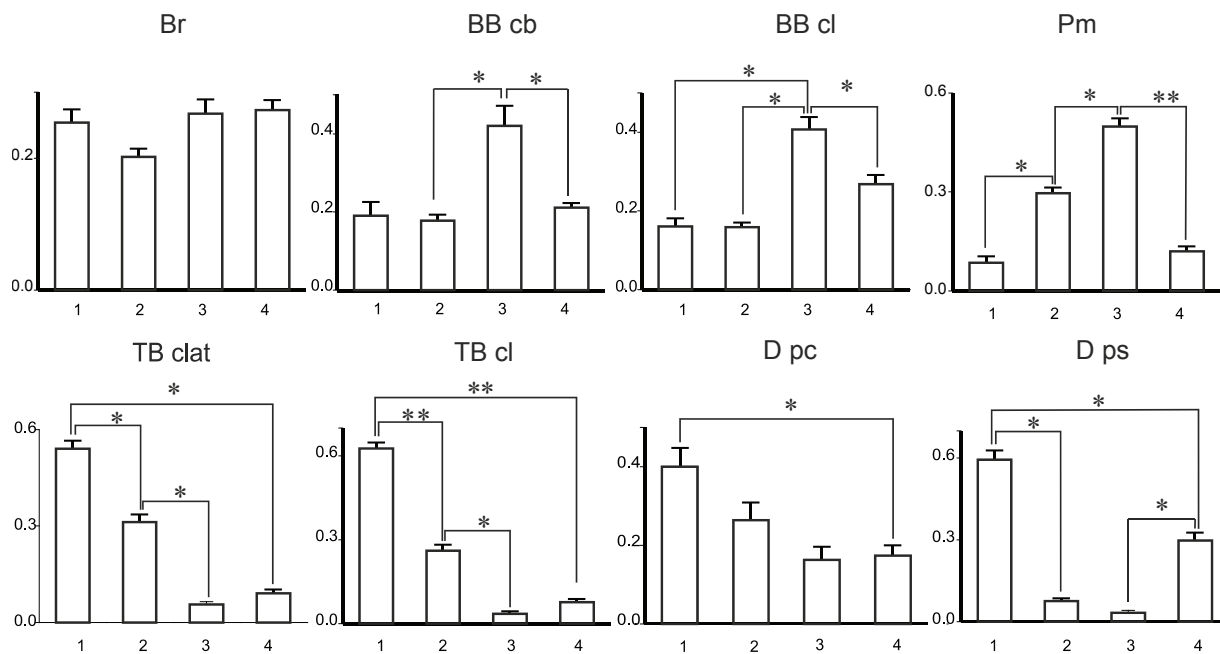


Рис. 5. Зіставлення ЕМГ-активності м'язів плечового пояса та плеча у різних чвертях у всіх обстежуваних. Зірочками вказані випадки статистично достовірної різниці між значеннями рівнів ЕМГ-активності цього м'яза у різних чвертях (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)

характеру, спостерігали в I секторі. В II та IV секторах, де амплітуди ЕМГ були меншими, ніж їх максимальні амплітуди у відповідних секторах, відносно більшим значенням ЕМГ одних м'язів відповідали менші значення ЕМГ їх антагоністів. У м'язів плечевого пояса синергічні відношення продемонстровані для D_{ps} і D_{ps} . Таким чином, отримані в нашій роботі результати відповідають сучасним уявленням, що ЦНС може генерувати ізометричні зусилля за рахунок невеликої кількості м'язових синергій, відповідно пов'язаних з тестовим завданням [2, 7, 8, 10, 20, 21].

Одна з причин відмінностей в управлінні м'язами-згиначами та розгиначами може бути поєднана зі здійсненням антигравітаційної функції останніми [22]. Ймовірно, вказана функція у м'язах верхньої кінцівки людини у зв'язку з переходом від квадропедальної локомоції до біпедальної частково втрачена, проте цілком можливо, що елементи асиметричного принципу управління антагоністичними групами м'язів верхньої кінцівки (коактивація згиначів у відповідь на тонічну активацію розгиначів) могли зберегтися.

**И.В. Верещака, А.В. Легедза, М. Дорновський,
А.В. Горковенко, В.И. Хоревин**

АКТИВНОСТЬ МЫШЦ ПЛЕЧЕВОГО ПОЯСА И ПЛЕЧА ПРИ СОЗДАНИИ КИСТЬЮ РУКИ ИЗОМЕТРИЧЕСКОГО УСИЛИЯ С ЦИКЛИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЯМ ЕГО НАПРАВЛЕНИЯ

В обследовании участвовали 11 здоровых мужчин в возрасте 25–40 лет, у которых проанализированы электромиограммы восьми мышц руки при создании одинаковых по амплитуде изометрических усилий кистью. Обследуемые должны были отслеживать маркер-курсор, который двигался по кругу на экране монитора с постоянной скоростью (16°/с) в горизонтальной плоскости. Таким образом, испытуемый медленно менял направление генерации усилия, тогда как его амплитуда оставалась постоянной. Установлено, что при формировании статического усилия, одинакового во всех направлениях, активность экстензоров была преимущественной в сторону разгибания в плечевом и локтевом суставах, а в сгибателях наблюдали активность по всем направлениям развития усилия с максимумом, в сторону сгибания. Предполагается, что ак-

тивность мышц руки организована по принципу синергий, которые четко связаны с моторным заданием и без него могут не существовать.

Ключевые слова: двухсуставные изометрические усилия, центральные двигательные команды, вектор усилия.

**I.V. Vereshchaka, A.V. Lehedza, M. Dornowski,
A.V. Gorkovenko, V.I. Khoryevin**

THE ACTIVITY OF MUSCLES OF THE SHOULDER GIRDLE AND SHOULDER DURING THE CONSTANT ISOMETRIC EFFORTS OF THE WRIST

Electromyograms (EMG) of eight muscles of the arm were analyzed in 11 healthy men aged 25–40 years during equal magnitude isometric efforts created by wrist. Subjects had to track cursor that moved around on the screen at a constant speed (16°/s) in a horizontal plane. Thus, the subject slowly changed the direction of generation of efforts, while its amplitude remained constant. It was established that during creation of the static efforts equal in all directions, the extensors activity was mainly in the areas of extension of shoulder and elbow joints, whereas the flexor activity was observed in all directions with maximum, which corresponded to the arm bending. It is assumed that muscular activity is organized on the principle of the synergies that are clearly related to the task and beyond it can not exist.

Key words: two joint isometric effort, central motor commands, force vector.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev;
Academy of Physical Education and Sports, Gdansk, Poland*

REFERENCES

1. Bernstein NA. Physiology of movement and activity. 1st ed. Moscow: Nauka; 1990.
2. Cheung VC, Turolla A, Agostini M, Silvoni S, Bennis C, Kasi P, et al. Muscle synergy patterns as physiological markers of motor cortical damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:14652–14656.
3. Culham E, Peat M. Functional anatomy of the shoulder complex. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1993; 18:342–350.
4. Sherrington C. Reflex inhibition as a factor in the coordination of movement and posture. *Q JExp Physiol*. 1913; 6:251–310.
5. Terry GC, Chopp TM. Functional anatomy of the shoulder. *J Athl Train*. 2000; 35:248–55.
6. Sinel'nikov RD. Atlas of Human Anatomy. 2nd ed. Moscow: State Publishing House of the medical literature; 1963.
7. Muceli S, Boye AT, d'Avella A, Farina D. Identifying representative synergy matrices for describing muscular activation patterns during multidirectional reaching in the horizontal plane. *J Neurophysiol*. 2010; 103:1532–1542.

8. Roh J, Rymer WZ, Beer RF. Robustness of muscle synergies underlying three-dimensional force generation at the hand in healthy humans. *J Neurophysiol.* 2012; 107:2123–2142.
9. Boland MR, Spigelman T, Uhl TL. The function of brachioradialis. *J Hand Surg.* 2008; 33:1853–1859.
10. Buchanan TS, Rovai GP, Rymer WZ. Strategies for muscle activation during isometric torque generation at the human elbow. *J Neurophysiol.* 1989; 62:1201-1212.
11. Vereshchaka IV, Gorkovenko AV. Central activation of the human hand muscles during creation of isometric efforts: dependence on the position of the point of force application in the working space. *Neurophysiology.* 2011; 43 (2):281-283.
12. Vereshchaka IV, Gorkovenko AV, Khorevin VI. Peculiarities of activation of the shoulder belt and shoulder muscles in generation of different-direction isometric efforts by the forearm. *Neurophysiology.* 2010; 42 (4): 324–336.
13. Gorkovenko AV, Tal'nov AN, Korneev VV, Kostjukov AI. Peculiarities of activation of the shoulder belt and shoulder muscles of human during the execution of arbitrary biarticular arm movements. *Neurophysiology.* 2009; 41(1):48-56.
14. Debicki DB, Gribble PL. Persistence of inter-joint coupling during single-joint elbow flexions after shoulder fixation. *Exp Brain Res.* 2005; 163:252–257.
15. Gribble PL, Mullin LI, Cothros N, Mattar A. Role of cocontraction in arm movement accuracy. *J Neurophysiol.* 2003; 89:2396-2405.
16. Gribble PL, Ostry DJ. Independent coactivation of shoulder and elbow muscles. *Exp Brain Res.* 1998; 123:355-360.
17. Tonkov VN. Normal human anatomy. 6th ed. Leningrad: Medgiz; 1962.
18. Peat M. Functional anatomy of the shoulder complex. *Phys Ther* 1986; 66:1855-1865.
19. Escamilla RF, Yamashiro K, Paulos L, Andrews JR. Shoulder muscle activity and function in common shoulder rehabilitation exercises. *Sports Med.* 2009; 39:663–685.
20. d'Avella A, Portone A, Fernandez L, Lacquaniti F. Control of fast-reaching movements by muscle synergy combinations. *J Neurosci.* 2006; 26:7791 –7810.
21. Roh J, Rymer WZ, Perreault EJ, Yoo SB, Beer RF. Alterations in upper limb muscle synergy structure in chronic stroke survivors. *Neurophysiol.* 2013; 109:768-781.
22. Kostyukov AI. Dynamic properties of the mammalian motor control system. 1st ed. Kiev: FADA, LTD; 2007.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Академія фіз. виховання і спорту, Польща, Гданськ
E-mail: inna.v@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 27.11.2013*

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ



Ірина Миколаївна Алексєєва

25 червня виповнилося б 80 років визнаному вченому патофізіологу-імунологу, доктору біологічних наук Ірині Миколаївні Алексєєвій.

Народилася Ірина Миколаївна у м. Радомишлі Житомирської області в сім'ї військового лікаря. Після закінчення біологічного факультету Київського державного університету імені Тараса Шевченка в 1957 р. і розпочала свій науковий шлях в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, як лаборант, а завершила завідувачем відділу імунології і цитотоксичних сироваток. Бажання займатися експериментальною науковою роботою привело її до навчання в аспірантурі, яку вона закінчила в 1961 році. Її науковим керівником був відомий учений, талановитий дослідник, активний продовжувач вчення

академіка О.О.Богомольця про цитотоксичні сироватки професор Ю.О. Спасокукоцький. Ірина Миколаївна у 1963 р. успішно захистила кандидатську дисертацію, а у 1981 р. стала доктором біологічних наук. Перші роботи Ірини Миколаївни Алексєєвої були присвячені дослідженню впливу кровозамінника БК-8 на кровотворну систему організму та гемодинамічний ефект при трансфузії. Її дисертаційна робота «Механізми порушення і відновлення функцій печини протипеченочними антителами» була однією з перших у Радянському Союзі зі спеціальності «патологічна фізіологія» серед біологічних наук. Основні напрямки наукової діяльності І.М. Алексєєвої були скеровані на з'ясування ролі печинки у формуванні імунної реактивності організму та вивчення механізмів її ураження різного генезу із залученням ендогенних чинників та апоптотичної загибелі гепатоцитів та клітин імунної системи. У 1988 р. Ірина Миколаївна стала завідувачем відділу імунології і цитотоксичних сироваток, яким керувала до своєї передчасної смерті у 2011 р.

У науковому доробку Ірини Миколаївни понад 200 праць в Україні та за її межами, серед них 2 монографії і монографічні видання. За досягнення в дослідженні ролі печинки в імунологічній реактивності організму І.М.Алексєєва отримала премію ім. О.О.Богомольця.

І.М.Алексєєва була високоєрудованим талановитим ученим, успішним організатором. Вона створила наукову школу імунологів, під її безпосереднім керівництвом захищено 12 кандидатських і 1 докторська дисертація. До сфери її наукових інтересів входив широкий спектр проблем фізіології та патофізіології печинки, імунної, репродуктивної систем, трансфузіології.

І.М.Алексєєва була членом редколегії «Фізіологічного журналу», членом правління

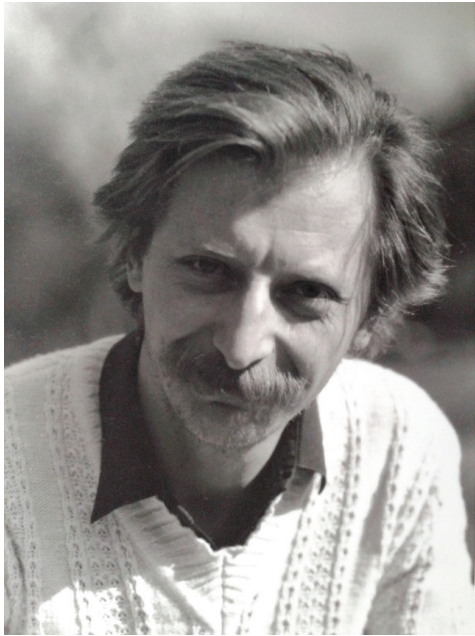
Українського патофізіологічного товариства, членом Спеціалізованої вченої ради (спеціальність імунологія) при Національному медичному університеті ім. О.О.Богомольця. Тривалий час була постійним керівником секції імунології на з'їздах Українського фізіологічного товариства. Поруч із активною науковою діяльністю Ірина Миколаївна приділяла багато уваги, творчих сил і енергії громадській роботі, її тричі обирали депутатом Київської міської ради, де очолювала комісію з охорони здоров'я і соціального захисту.

І.М.Алексеева завжди була життєрадісною,

надзвичайно скромною, добродушною і оптимістично налаштованою, доступною у спілкуванні, світлою особистістю. Кожному вона могла дати пораду і за це отримувала любов і повагу колег і друзів.

Творчий внесок Ірини Миколаївни у вітчизняну науку та сумлінна наукова та громадська діяльність відзначені медаллю «За працю та звитягу», Почесними грамотами Академії наук та Кабінету Міністрів України.

Співробітники та учні намагаються бути гідними її високих наукових і моральних принципів, наслідувати її творчі та життєві заповіді.



Володимир Ярославович Ганіткевич

12 березня 2014 року в Єні, Німеччина, раптово, у віці 54 років, помер Володимир Ярославович Ганіткевич. Володимир закінчив Київський національний університет імені Тараса Шевченка в 1980 році, отримавши ступінь бакалавра біофізики з відзнакою. Він розпочав свою дослідницьку кар'єру під керівництвом академіка М.Ф. Шуби у відділі нервово-м'язової фізіології Інститута фізіології ім. О.О. Богомольця в Києві, де він пройшов шлях від бакалавра, потім аспіранта, і до наукового співробітника. Як молодого дослідника Володимира відрізняв гострий і допитливий розум, незалежне і оригінальне мислення у поєднанні з відмінними практичними навичками та знанням наукової літератури в його галузі досліджень. Він застосував свої знання та енергію для вивчення фундаментальних мембранних механізмів, що лежать в основі спряження збудження і скорочення гладеньких м'язів, основним напрямком дослідження цього відділу. Він був одним з перших, хто успішно застосував метод петч-клемп для

реєстрації струмів через дигідропіридин-чутливі кальцієві канали ізольованих клітин вісцеральних гладеньких м'язів (1985 р.). В подальших своїх дослідженнях, які були опубліковані в Фізіологічному журналі (Лондон) протягом 1986-1988 рр., він охарактеризував електрофізіологічні та біофізичні властивості цих каналів в міоцитах кишечника.

Це новаторська робота і розширення зв'язків між науковцями зі Сходу і Заходу визначили його подальше майбутнє в науці. У 1988 році Володимир познайомився з професором Геррітом Ізенбергом, всесвітньо відомим електрофізіологом і біофізиком, хто досліджував клітини серцевої і гладенької мускулатури. Професор Ізенберг дуже зацікавився цим молодим дослідником і запросив Володимира приєднатися до його групи на кафедрі фізіології в університеті Кельна в Західній Німеччині. У той час це була рідкісна можливість для будь-якого молодого дослідника, і Володимир не вагаючись прийняв це запрошення. Крім того, можливість поєднання реєстрацій мембранних струмів і одночасних змін у внутрішньоклітинній концентрації іонів кальцію в окремій гладеньком'язовій клітині, яка існувала в лабораторії Ізенберга, стала тим викликом, на який він не міг не відповісти. Зрештою, це виявилось правильним вибором як для молодого дослідника, так і для його нового наставника, і привело до їх виключно плідної співпраці протягом багатьох років. З 1989 по 1996 рр. Володимир (або Владо як його звали колеги і друзі) зосередив свою увагу на питаннях, як внутрішньоклітинний рівень кальцію змінюється в судинних і вісцеральних гладеньких м'язах, які механізми це контролюють, яку роль відіграють внутрішньоклітинні кальцієві запасники в цьому процесі, і як саме ці механізми відрізняються між двома типами клітин. Його талант, продуктивність (12 статей були ним опубліковані у високорейтингових журналах) і його унікальний внесок в дос-

лідження гладеньких м'язів були визнані фахівцями та широко цитуються. У 1996 році він успішно завершив і публічно захистив докторську дисертацію на тему «Механізми регуляції кальцію в коронарних міоцитах». В 1997 році він був удостоєний престижної нагороди Ханса Імхоффа, яка присуджується медичним факультетом університету Кельна, Німеччина, на знак визнання його особистого внеску у розвиток фундаментальних наукових досліджень.

Після того, як Герріт Ізенберг переїхав до Галле в 1995 році, Володимир продовжив свої дослідження в Кельні, де він вивчав роль ендогенних внутрішньоклітинних буферних систем кальцію і мітохондрій, яку вони можуть грати в регуляції внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію в гладеньких м'язах. Паралельно він викладав учбові курси для студентів-бакалаврів та готував власного аспіранта. З 1995 по 2003 Володимир опублікував 8 наукових робіт, включаючи 4 соло статті.

У 2003 році Володимир приєднався до групи професора Клауса Бендорфа в

Інституті фізіології II в Єні, Німеччина. Тут він зіткнувся з непростю проблемою вивчення впливу контрольованої ішемії на рівні окремих кардіоміоцитів. Його зусилля увінчалися створенням нової технології "вбудованої в чіп пікокамери", яка також дозволяла вимірювати рівень позаклітинного рН, інтегральні АТФ-чутливі калієві струми і мембранний потенціал мітохондрій. Ця робота була опублікована в журналі *Circulation Research* в 2006 році, а подальші дослідження в цьому напрямку були ним завершені в 2010 році. Володимир працював над іншою науковою роботою, коли він несподівано помер, залишивши дружину і двох синів. Його друзі і колеги вважали Володимира одним з найталановитіших і відданих своїй справі вчених. Для дослідників гладеньких м'язів і серцево-судинної системи він залишив по собі щедрю наукову спадщину, був видатною людиною, і друзі завжди будуть пам'ятати Володимира, як чесного і справедливого чоловіка.

CONTENTS

S.V. Goncharov, G.V. Portnichenko, L.V. Tumanovska, D.O. Pashevin, M.O. Kuzmenko, O.O. Moibenko, V.E. Dosenko. Effect of quercetin on proteasome activity in the aorta and heart tissues of spontaneously hypertensive rats	3
R.R. Sharipov, A.V. Kotsiuruba, B.S. Kopyak, V.F. Sagach. Induction of oxidative stress in heart mitochondria of brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone	11
Y.M. Kolesnyk, M.Y. Kolesnyk, A.V. Abramov. Pathological remodeling of myocardium in spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus: the role of mitochondrial dysfunction	18
D.O. Pashevin, S.V. Goncharov, L.V. Tumanovska, V.E. Dosenko, O.O. Moibenko. The changes in the activity of tripeptidyl peptidase II in experimental atherosclerosis and hypertension	27
O. V. Maksymchuk. The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of enzymes of the pro-oxidant and antioxidant systems in the rat liver	32
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselsky, V.A. Baranovskyy. Changes in gastric functions in rats after intragastric introduction of corvitol at high doses	38
I.P. Vasheka, S.P. Veselsky, Z.A. Gorenko, O.A. Grinchenko, L.S. Karbovska, M.Y. Makarchuk. The influence of amylin on the bile acid spectrum in rats	46
V.A. Berezovskii, L.N. Plotnikova, S.P. Veselskii, I.G. Litovka. The influence of low partial oxygen pressure on the biological process of mesenchymal stromal cells	54
O.P. Gadiliya, M.O. Timoshenko, K.O. Dvorschenko, L.I. Ostapchenko, V.V. Vereshaka. Effects of 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl-L-proline sodium on antioxidant defense system of the gastric mucosa of rats under conditions of stress action	60
O.Yu. Iefimenko, I.O. Savchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, O.B. Shcherbakov, V.K. Ivanov, N.M. Zholobak, Yu.V. Malyukin, M.Ya. Spivak. The influence of nanocrystalline cerium dioxide on motor function of the stomach and colon in rats	67
O.O. Lunko, D.S. Isaev, O.P. Maximyuk, O.A. Krishtal, E.V. Isaeva. The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus	75
V.A. Makarchuk, O.V. Zeleniuk, G.O. Ushakova. The activity of hyaluronate-binding proteins in the brain and pancreas during experimental chronic pancreatitis in rats	80
I.V. Vereshchaka, A.V. Lehedza, M. Dornowski, A.V. Gorkovenko, V.I. Khoryevin. The activity of muscles of the shoulder girdle and shoulder during the constant isometric efforts of the wrist	89
ANNIVERSARIES	98