

Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 2 2015

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Легедза О.В., Горковенко А.В., Верещака І.В., Дорновський М., Костюков О.І.</i> Порівняльний аналіз електроміографічної активності м'язів руки людини в умовах циклічних поворотів вектора ізометричного зусилля кисті у протилежних напрямках	3
<i>Мельничук С.Д., Хижняк С.В., Морозова В.С., Степанова Л.І., Уманська А.О., Войціцький В.М.</i> Енергетична функція мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу	15
<i>Хорєвін В.І.</i> Внесок ГАМК-ергічного гальмування в формування вибіркової налаштованості нейронів superior colliculus до реакції на пересування світлової плями з різною швидкістю	23
<i>Григорова Н.В.</i> Розподіл цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів при введенні речовин, які змінюють функціональний стан кори надниркових залоз і автономної нервової системи	34
<i>Лісуха Л.М., Березовський В.Я.</i> Вплив нормобаричної гіпоксії на зорово-моторну реакцію дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях	40
<i>Nozdrenko D.M., Bogutska K.I., Prylutsky Yu.I., Korolovych V.F., Evstigneev M.P., Ritter U., Scharff P.</i> Impact of C ₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in soleus muscle of rat at ischemia-reperfusion injury	48
<i>Низар Салим Осман, Мосхен Исмаил.</i> Состояние физиологических адренергических реакций у белых крыс в процессе развития экспериментального гипертиреоза	60
<i>Голишкін Д.В., Фалалєєва Т.М., Непорада К.С., Берегова Т.В.</i> Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно- наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу	65
<i>Хассунех Л.Х.М.</i> Накопление диацилглицерина нарушает краткосрочную активацию тироксином фосфолипазы Д в клетках печени	73

<i>Мамонтова Т.В., Весніна Л.Е., Микитюк М.В., Боброва Н.О., Куценко Л.О., Гординська І.Л., Кайдашев І.П.</i> Фулерен C ₆₀ послаблює вільнорадикальні і деструктивні процеси в сполучній тканині при ад'ювантному артриті у щурів	80
<i>Погоріла М.С.</i> Вплив екстракту з ембріональних тканин курей на вміст цитокінів і С-реактивного білка в сироватці крові мишей після дії γ-випромінювання	87
<i>Грабовська С. В., Салига Ю.Т.</i> Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів	94
<i>Янчук П.І., Атамнах С.М., Решетнік Є.М., Левадянська Ю.А., Нікітіна Н.О., Весельський С.П.</i> Роль серотоніну в регуляції тканинного дихання і жовчосекреторної функції печінки	102
ОГЛЯДИ	
<i>Кривопустов О.С., Досенко В.Є.</i> Алельний поліморфізм гена рецептора прогестерону та його значення при невиношуванні вагітності	111

О.В. Легедза¹, А.В. Горковенко¹, І.В. Верещака¹, М. Дорновський², О.І. Костюков¹

Порівняльний аналіз електроміографічної активності м'язів руки людини в умовах циклічних поворотів вектора ізометричного зусилля кисті у протилежних напрямках

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; ²Академія фізичного виховання і спорту, Польща, Гданськ; E-mail: aleksejlegedza@gmail.com

Порівнювали особливості формування цілеспрямованих тонічних ізометричних зусиль, що створювалися м'язами плечового пояса та плеча, для двох протилежних змін напрямків вектора довільного зусилля – за та проти годинникової стрілки. Модуль вектора зусилля при цьому залишався сталим. Інтенсивність центральних моторних команд оцінювали згідно з обрахованою площею випрямлених, усереднених та апроксимованих електроміограм (ЕМГ), відведених від досліджуваних м'язів. Розвиток зусилля заданого напрямку здійснювався в операційному просторі горизонтальної площини при кутах 75° у плечовому суглобі та 90° – у ліктьовому. Виявлено синергічну взаємодію окремих функціональних груп м'язів в умовах певної силової реакції. У просторовому відношенні встановлені ділянки переважної активності досліджуваних м'язів у межах операційного простору. Показано відмінності амплітуд ЕМГ при протилежних напрямках вектора зусилля та коактивація м'язів-згиначів, у той час як розгиначі проявляли свою активність лише в межах своїх функціональних секторів. Для 4 з 8 досліджуваних м'язів характерне статистично значуще збільшення амплітуди електроміограм при напрямку вектора зусилля проти годинникової стрілки відносно амплітуди ЕМГ за годинниковою стрілкою. Цей феномен може бути пояснено більш складною організацією патернів моторних команд, послідовно адресованих м'язам плеча та передпліччя, викликану нетиповою послідовністю активації м'язів антагоністів при виконанні циклічних рухів рукою в режимі ізометричного скорочення.

Ключові слова: двосуглобові ізометричні зусилля; центральні моторні команди; вектор зусилля; електроміограма.

ВСТУП

Аналіз електроміографічної (ЕМГ) активності м'язів плечового пояса та плеча людини дає змогу досліджувати ступінь взаємодії м'язів-синергістів, антагоністів і агоністів як при ізотонічному скороченні, так і в режимі розвитку ізометричних зусиль. Довільні рухи є результатом одночасної роботи різних функціональних груп м'язів. В умовах розвитку зусилля, близькому до ізометричного, активність м'язів – досить зручний об'єкт для вивчення механізмів управління довільними цілеспрямованими моторними реакціями [1–4]. Структура ЕМГ

м'язів при реальних рухових реакціях та без них, при створенні ланкою кінцівки довільних односуглобних ізометричних зусиль відрізнялася за амплітудно-частотними характеристиками. Такі ЕМГ розглядалися як відображення суперпозиції центральних моторних команд (ЦМК) у ряді робіт [5–7]. Показано, що формування повільних ізометричних зусиль, які розвивають м'язи плеча та плечового пояса людини, зумовлено насамперед м'язами, які є агоністами відносно певного рухового патерна [8–13]. Вивчали також моторні команди при двосуглобних ізометричних рухових актах, що надходили до м'язів плеча та передпліччя. Так, була

проведена серія експериментів у режимі повільних (небалістичних) ізометричних зусиль з різними напрямками вектора сили [1].

Мета роботи – аналіз ЕМГ в умовах створення ізометричного зусилля, годограф вектора якого мав рухатися по колу зі сталою кутовою швидкістю та змінювати напрямок за та проти годинникової стрілки.

МЕТОДИКА

Обстежено 11 практично здорових чоловіків віком від 21 до 45 років. Всі вони були правшами без будь-яких порушень функцій опорно-рухового апарату або неврологічних захворювань.

Під час експерименту обстежуваний, сидячи на стільці з регульованою висотою сидіння, кистю правої руки мав розвивати зусилля у горизонтальній площині, амплітуда і напрямок якого реєструвалися за допомогою спеціально сконструйованого силоміра. Механічна частина силоміра складалася з вертикальної консолі на нерухомій платформі, що мала можливість фіксації в різних місцях відносно тулуба обстежуваного. Консоль закінчувалася руків'ям, сила до якого повинна була прикладатися у горизонтальній площині. Консоль була виготовлена зі сталевого циліндричного стрижня діаметром 20 і довжиною 300 мм. Поблизу місця фіксації консолі на платформі, з обох боків стрижня за допомогою фрезування робили симетричні вибірки довжиною 20 мм кожний та проміжком між ними 5 мм у взаємно-перпендикулярних напрямках. Товщина пластин, що залишилися, становила 5 мм. На пластини з обох боків наклеювали напівпровідникові тензорезистори, що давали змогу вимірювати два взаємно-перпендикулярних компоненти сили, що прикладалася в горизонтальній площині на кінці консолі. Під час дослідження консоль розташовувалася таким чином, що осі деформації розташовувалися пе-

ред випробуванням у парасагітальній та парафронтальній площинах. Кисть руки людини, ліктьовий і плечовий суглоби знаходилися в горизонтальній площині; при цьому руку вище ліктьового суглоба підвішували за допомогою тросу та лямки до стелі. Це також мало нівелювати дію сили тяжіння на кінцівку. Руків'я силоміра мало спеціальну лонгету, яка фіксувала та знерухомлювала зап'ястковий суглоб. Кут у плечовому суглобі був 75° (зовнішній кут відносно фронтальної площини), а у ліктьовому – 90° (між осями плеча та передпліччя). Перед кожним експериментом проводили додаткову процедуру калібрування тензодатчиків на стандартні значення зусиль в 20 Н. В експерименті використовували два комп'ютери. На екрані першого одночасно відображалася еталонна траєкторія кола годографа вектора зусилля у операційному просторі і траєкторія реального зусилля, яке розвивала людина.

Другий комп'ютер застосовували для реєстрації двох сигналів силоміра та ЕМГ 8 м'язів плеча та плечового пояса: *m. brachioradialis* (*Br*, згинач ліктьового суглоба), *m. biceps brachii, caput breve* (*BB cb*, біартикулярний згинач плечового та ліктьового суглобів), *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*, біартикулярний розгинач плечового та ліктьового суглобів), *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). ЕМГ реєструвалися за допомогою поверхневих електродів серій («Biopac System EL 503», США). Електроміографічні підсилювачі мали полосу пропускання 0,1-1000 Гц; сигнали реєструвалися з використанням аналогово-цифрових перетворювачів PCI 6071E і 6023E («National Instruments», США) з частотою

дискретизації $2 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$. В експериментах використовували пакет програм “LAB VIEW 6” та “7”. У режимі off-line сигнали ЕМГ піддавалися двонапівперіодному випрямленню та низькочастотній фільтрації (цифровий фільтр Баттерворта четвертого порядку з частотою зрізу 5 Гц). Після цього сигнали ЕМГ нормувалися у відсотках до рівня ЕМГ, що реєструвався при максимальному довільному напруженні відповідних м’язів. Цей тест проводили перед виконанням основних завдань. Сигнал зусилля також піддавався фільтрації зі згаданими вище показниками. Після попередньої обробки сигнали усереднювали за 10 реалізаціям однакових завдань. Часові зміни оброблених ЕМГ розглядалися як оцінки інтенсивності ЦМК, що надходили до м’язів плечового пояса та плеча в даному силовому тесті.

Кожний експеримент складався з двох завдань: протилежних напрямків обходу вздовж кола годографа вектора зусилля – за годинниковою стрілкою та проти годинникової стрілки відповідно. Окреме завдання складалося з 10 реалізацій. Результат кожної спроби оцінювали на місці, при неправильному виконанні завдання обстежуваним або незадовільному запису ЕМГ, спробу повторювали додатково. В усіх завданнях амплітуда зусилля, що розвивав обстежуваний кистю залишалася незмінною протягом руху маркера-курсора вздовж кола. Тривалість кожної спроби складала 38 с. В обох завданнях обстежуваний повинен був створювати еталонне зусилля, відстежуючи маркер-курсор. Для генерації тест-зусиль, які складали перше завдання, обстежуваний за 2 с повинен був вийти на заданий рівень зусилля і відстежувати рівномірний криволінійний рух маркера-курсора за годинниковою стрілкою. Відстань пройденого шляху була півтора кола, після чого обстежуваний повинен був розслабити м’язи кінцівки і повернутися у вихідне положення (центр кола). Друга частина експерименту складалася з аналогічного

завдання, тільки напрямком генерованого зусилля і руху маркера- курсора змінювався на протилежний - проти годинникової стрілки. Період відпочинку між спробами складав 1-2 хв.

Для більш коректного представлення результатів і подальших кількісних оцінок, усереднені та згладжені сигнали ЕМГ піддавалися апроксимації за допомогою процедури нелінійної регресії. Для цього використовували функцію, що являла собою суму усередненого значення амплітуди ЕМГ і двох косинусів. Це дозволило досить точно вирівняти ЕМГ у полярній системі координат, позбувшись непотрібних флуктуацій та зберігши при цьому всі нюанси акцентованого зміщення ЕМГ відносно центра координат. Більш детально методика описана в нашій попередній праці [14]. Для визначення сектора операційного кола, в якому спостерігалася максимальна активність відповідного м’яза, ЕМГ останнього умовно поділялась на 4 квадранти, відповідно окреслених межами 4 секторів кола. Далі обчислювали площу кожного квадранта та нормували відносно до площі загальної ЕМГ.

Для порівняння площ ЕМГ двох протилежних напрямків вектора зусилля був використаний непараметричний критерій Вілкоксона для залежних вибірок. Спочатку вираховували різницю площ між ЕМГ протилежних напрямків вектора зусилля. Отримані значення представляли у вигляді відсоткового приросту (позитивні значення) або зменшення (від’ємні значення) площі проти годинникової стрілки відносно площі за годинниковою стрілкою. Всі абсолютні величини зрушень ранжувались, а потім підсумовувались ранги.

Для порівняння середніх значень кутів у полярній системі координат, при яких амплітуда ЕМГ відповідного м’яза досягає свого максимального значення, було застосовано двовибірковий критерій t Стюдента для залежних вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ

Секторні діаграми на рис. 1 ілюструють нормовану ЕМГ одного з обстежуваних для двох протилежних напрямків генерації зусилля – за годинниковою та проти годинникової стрілки. Порівняння носить описово-демонстративний характер та відображає типове для більшості обстежуваних співвідношення площ ЕМГ різного обходу вектора зусилля. Для 7 м'язів: Br, BB cb, BB cl, TB clat, TB cl, D pc, D ps ЕМГ проти

годинникової стрілки більша за амплітудою (а, отже, і за площею) ЕМГ за годинниковою стрілкою. Кардинально інший результат спостерігався у згинача Рm, площа ЕМГ якого проти годинникової стрілки була менше такої протилежного напрямку вектора зусилля. Для згиначів BB cb, BB cl, Рm чітко виражена максимальна амплітуда ЕМГ обох напрямків в III секторі кола, а для розгиначів TB clat, TB cl, D pc, D ps – переважно в I секторі, окрім D pc за годинниковою стріл-

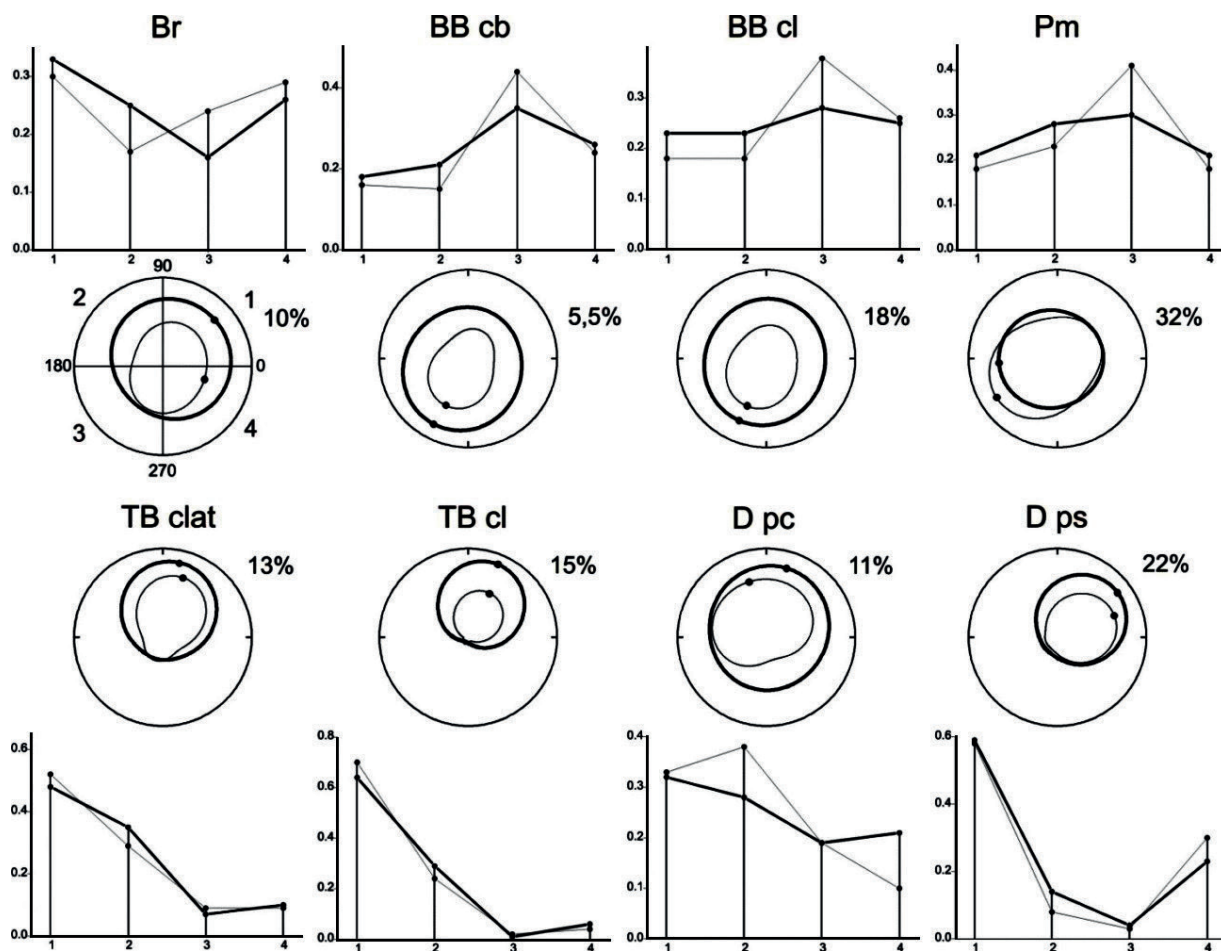


Рис. 1. Секторні діаграми та гістограми зміни електроміографічної (ЕМГ) активності м'язів плечового пояса та плеча при двох протилежних напрямках обходу вектора зусилля одного із обстежуваних. Гістограми ілюструють співвідношення нормованих площ окремих квадрантів ЕМГ певного м'яза (вісь ординат) при двох протилежних напрямках руху вектора зусилля: за годинниковою стрілкою (тонка лінія) та проти годинникової стрілки (товста лінія). На секторних діаграмах зображено загальну нормовану ЕМГ. Напрямок вектора зусилля: тонка лінія – за годинниковою стрілкою; товста лінія – проти годинникової стрілки. Масштаб розгортки кожної окремої ЕМГ позначений у відсотках біля кола. 1, 2, 3, 4 – порядковий номер квадранта

кою, напрямком максимального значення амплітуди якого знаходиться в II секторі. Згинач ліктьового суглоба Вг проти годинникової стрілки коактивується разом з чотирма розгиначами: двох ТВ clat, двох ТВ cl, 1-го D ps (проти годинникової стрілки), та двох D ps, напрямком максимуму амплітуди яких знаходиться в I секторі діаграми.

Кожна окрема частина ЕМГ (далі – квадрант), яка окреслена одним з 4 секторів операційного кола, була пронормована до загальної площі цієї ЕМГ. Нормування проводили для всіх м'язів двох протилежних обходів вектора зусилля. Як видно з гістограм, (див. рис. 1) найбільша площа серед квадрантів кожного напрямку обходу вектора зусилля відповідає тій частині операційного кола, в якій амплітуда ЕМГ має найбільше значення та відповідає максимальній активності даного м'яза в цьому функціональному секторі. Всі значення площ квадрантів були усереднені серед 11 обстежуваних для кожного м'яза та порівняні за напрямком вектора зусилля. Максимальна площа квадранта Вг відповідала 4-му сектору операційного кола. Причому квадрант проти годинникової стрілки був більший на соті частини від одиниці. ВВ cb і ВВ cl мали

максимальну площу квадрантів у 3-му секторі. Рm виявляв свою максимальну активність також у 3-му секторі операційного поля. Максимальна площа квадрантів двох напрямків вектора зусилля для ТВ clat і ТВ cl відповідала 1-му сектору. Ситуація для D ps виявилась неоднозначною: максимальна площа квадранта за годинниковою стрілкою відповідала 1-му сектору, а проти годинникової стрілки – 2-му.

Для D ps квадранти обох напрямків вектора зусилля відповідали 1-му сектору. Особливість даного порівняння полягала в тому, що окрім Вг, для всіх інших 7 м'язів, як згиначів так і розгиначів, площа квадрантів за годинниковою стрілкою була більшою за площу ідентичних квадрантів проти годинникової стрілки. Хоча ця різниця і не була статистично значущою.

Для порівняння цілих площ різного обходу вектора зусилля було обраховано спочатку їх арифметичну різницю, а потім представлено у вигляді різницевого значень, виражених у вигляді відсотків, які відповідають ступеню зміни площі ЕМГ проти годинникової стрілки відносно площі ЕМГ за годинниковою стрілкою (табл. 1). Від'ємні значення свідчать про зменшення

Таблиця 1. Порівняння амплітуди (%) електроміограми за і проти годинникової стрілки.

Номер експерименту	М'язи							
	Вг	ВВ cb	ВВ cl	Рm	ТВ clat	ТВ cl	D ps	D ps
1	1,8	34,8	34,5	-23,1	37,1	22,4	110,1	25,4
2	-56,3	-29,0	175,0	-71,8	198,2	-51,2	613,2	4,2
3	156,9	87,6	57,0	117,1	36,2	29,6	163,0	28,4
4	133,0	13,0	100,1	9,6	1,8	-37,8	45,1	39,1
5	486,4	69,1	6,6	11,0	25,2	48,6	26,3	-3,5
6	7,1	48,9	65,0	-51,8	28,9	-5,4	-0,5	53,8
7	33,1	138,7	211,1	-7,5	36,3	39,9	169,5	15,4
8	40,2	113,0	138,3	-42,9	-5,9	-19,4	55,9	-5,9
9	106,1	185,3	162,0	-7,5	65,6	192,1	72,0	67,0
10	-7,9	6,7	-4,6	31,0	16,1	6,6	20,1	52,8
11	17,9	133,2	64,3	10,9	-17,6	-64,4	3,9	-76,4

площі ЕМГ проти годинникової стрілки відносно ЕМГ за годинниковою стрілкою. Позитивні значення вказують на зростання площі ЕМГ проти годинникової стрілки. Як видно з табл. 1, значення збільшення або зменшення достатньо сильно варіюють в межах одного м'яза. Представлені дані стали умовою використання непараметричного тесту Вілкоксона для порівняння двох залежних вибірок. Спочатку зіставлялись абсолютні величини вираженості зрушень в тому чи іншому напрямку. Для цього всі абсолютні величини зрушень ранжувались, а потім підсумовувались ранги. Якщо зрушення в той чи інший бік відбувалися випадково, то і суми їх рангів виявлялися приблизно рівні. Якщо ж інтенсивність зрушень в один бік більше, то сума рангів абсолютних значень зрушень в протилежний бік буде значно нижче, ніж це могло б бути при випадкових змінах.

Результати застосування статистичного критерію Вілкоксона представлені у табл. 2. Аналіз показав наявність достовірної різниці між площами ЕМГ різного обходу вектора зусилля, а саме для 3 м'язів-згиначів (Br, BB cb, BB cl) та одного м'яза-розгинача (D pc). У цьому разі ЕМГ проти годинникової стрілки значно переважала за амплітудою ЕМГ протилежного напрямку вектора зусилля. Для інших 4 м'язів, а саме: одного згинача (Pm) та 3 розгиначів (TB clat, TB cl, D ps), різниця між площами ЕМГ протилежних напрямків вектора зусилля була статистично не значущою, хоча для всіх досліджуваних м'язів площа ЕМГ проти годинникової стрілки переважала у більшості

обстежуваних, окрім односуглобного м'яза-згинача – Pm. Його середнє значення різниці становило: -2,2 %, що вказує на тенденції зменшення площі ЕМГ проти годинникової стрілки відносно такої за годинниковою стрілкою.

ЕМГ досліджених 8 м'язів відрізнялася за напрямком максимальної амплітуди, про що свідчить їх розташовування у різних секторах полярних координат. В залежності від переважного розміщення апроксимованих ЕМГ в одному із секторів операційного кола оцінювали домінування активності м'язів у певному напрямку. Як зазначено вище, для більш точного визначення ділянки найбільшої активності певного м'яза було розраховано відношення активності (площі) у кожному з 4 секторів операційного кола до його загальної ЕМГ-активності. Напрямок секторів функціональної активності для м'язів-згиначів ліктьового суглоба, двосуглобових м'язів-згиначів та м'язів-згиначів плеча збігався з орієнтацією генерованого зусилля у напрямку згинання передпліччя. Виключення у більшості випадків становив м'яз-згинач передпліччя Br. 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) була малопомітною. ЕМГ при напрямку проти годинникової стрілки у переважній більшості випадків мали незначні відхилення

Таблиця 2. Результати непараметричного критерію знакових рангів Вілкоксона для порівняння електроміограм при двох протилежних напрямках вектора зусилля.

Показник	М'язи							
	Br	BB cb	BB cl	Pm	TB clat	TB cl	D pc	D ps
Критерій Фішера	-2,223 ^a	-2,667 ^a	-2,756 ^a	-0,267 ^a	-1,778 ^a	-0,445 ^a	-2,845 ^a	-0,889 ^a
Статистична значимість (двостороння)	0,026*	0,008*	0,006*	0,790	0,075	0,657	0,004*	0,374

*P < 0,05; а – оснований на від'ємних рангах.

від таких за годинниковою стрілкою. Для кількісного аналізу рівня відхилення значень кутів максимальних амплітуд ЕМГ двох протилежних напрямків було проведено парний t-критерій Стюдента (табл. 3). Статистичний аналіз показав достовірну різницю між середніми значеннями кутів для двох м'язів-згиначів: плечового суглоба *Pm* та двосуглобового плечового та ліктьового суглобів *BB cb*.

Встановлено (рис. 2), що активація досліджуваних м'язів у різних обстежуваних була дещо відмінною, але в цілому її патерн був відносно стереотипним.

Як видно з рис. 2, м'язи-згиначі проявляли активність переважно у III секторі (напрямок вектора зусилля $180^{\circ} - 270^{\circ}$). Виняток становила активність *Br*, переважна активність якого була у I та IV секторах. Суттєвий внесок у генерацію як згинальних, так і розгинальних тонічних зусиль належить згиначеві ліктьового суглоба *Br*, на що вказує досить широкий сектор його активності для всіх 11 обстежуваних. Можна стверджувати, що цей м'яз проявляв високий рівень коактивації в умовах створення зусиль переважно у напрямку розгинання у ліктьовому та плечовому суглобах. Це стосувалося ЕМГ двох протилежних напрямків вектора зусилля для згаданого м'яза. Дещо складніше реалізувалися зусилля у напрямку розгинання ліктьового та плечового суглобів. Слід

відмітити, що сектори активності м'язів-розгиначів мали більш вибіркового характеру, ніж такі для м'язів-згиначів (див. рис. 2, 3). У цьому разі зусилля створювалися внаслідок підвищення активності м'язів-розгиначів ліктьового та плечового суглобів (*TB clat*, *TB cl*, *D ps*) у I секторі ($0^{\circ} - 90^{\circ}$) та плеча (*D pc*) – у I та II секторах ($0^{\circ} - 180^{\circ}$). Але така генерація супроводжувалася досить помітною коактивацією згиначів (*Br*, *BB cl*, *BB cb*) зокрема у I секторі. Усереднення значень кутів ЕМГ протилежних напрямків вектора зусилля дало змогу порівняти дисперсії останніх (див. рис. 3).

Слід відзначити, що найбільший розкид значень кутів протилежного обходу мають двосуглобовий м'яз-згинач ліктьового та плечового суглобів *BB cb* та м'яз-згинач плеча. Найменша різниця у зміщенні значень кутів протилежного обходу була у двосуглобового м'яза-розгинача ліктьового та плечового суглобів *TB cl*.

Варто зауважити, що при створенні згинальних зусиль рівень коактивації м'язів-розгиначів був значно меншим порівняно із м'язами-згиначами.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати дослідження свідчать про високоскоординовані дії ЦМК стосовно напрямку вектора зусилля, що розвивається

Таблиця 3. Результати парного t-тесту для порівняння середніх значень кутів двох протилежних напрямків вектора зусилля ($m \pm SEM$)

М'язи	Напрямок вектора зусилля		P
	За годинниковою стрілкою	Проти годинникової стрілки	
<i>Br</i>	-31,59±18,53	-26,75±14,17	0,8
<i>BB cb</i>	-89,29±21,01	252,91±8,62	1,60E-09*
<i>BB cl</i>	253,08±8,81	259,17±9,49	0,15
<i>Pm</i>	200,01±3,94	189,4±4,32	0,04*
<i>TB clat</i>	75,64±5,86	68,62±4,97	0,21
<i>TB cl</i>	63,51±2,96	65,33±5,65	0,74
<i>D pc</i>	88,81±19,97	107,19±22,87	0,29
<i>D ps</i>	20,29±4,09	35,76±17,44	0,4

*P < 0,05; SEM – стандартна помилка середнього значення.

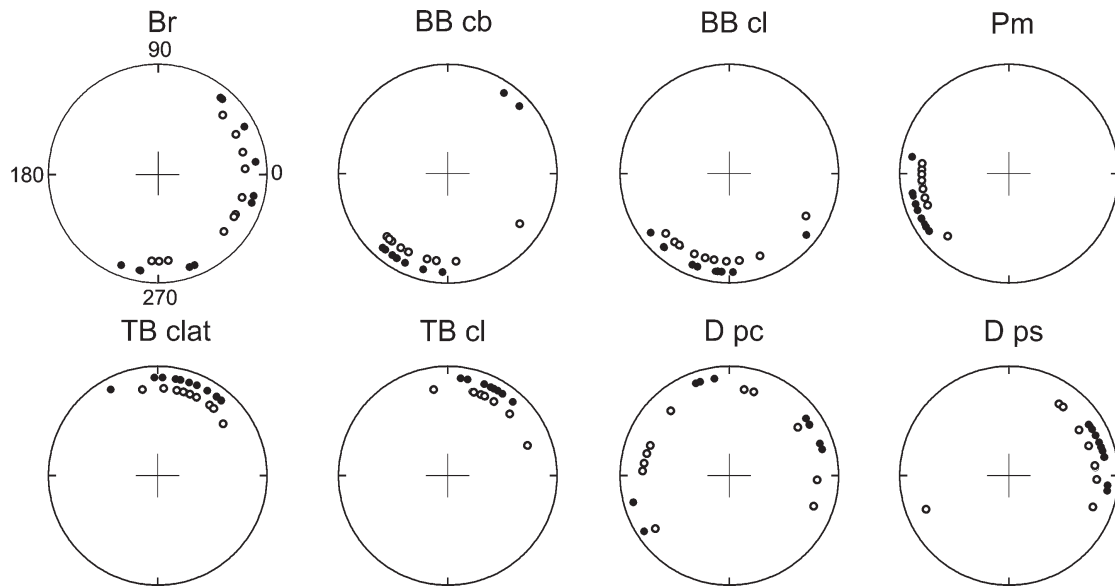


Рис. 2. Секторні діаграми, які ілюструють напрями фокусних значень амплітуди електроміограми для кожного м'яза в усіх обстежуваних. Значення кутів фокусної амплітуди в операційному просторі при протилежних напрямках вектора зусилля позначені: чорними маркерами - за годинниковою стрілкою, світлими - проти годинникової стрілки

рукою в режимі, близькому до ізометричного (за відсутності значних змін положення ланок кінцівки). Головним аргументом на користь цього твердження є факт вибіркового зміщення амплітуди ЕМГ щодо центру

координат операційного кола для м'язів-згиначів і розгиначів суглобів руки. Це може свідчити про те, що в умовах постійного, повільного (небалістичного) ізометричного скорочення м'язів плеча і плечового

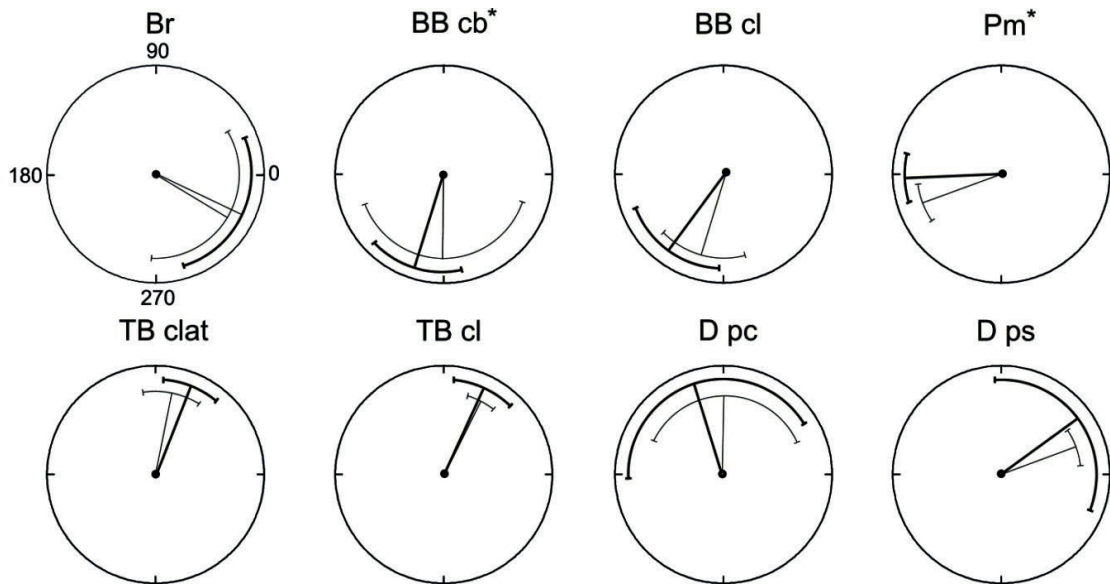


Рис. 3. Секторні діаграми середніх значень кутів, що відповідають максимальній амплітуді електроміограми м'яза в певному секторі операційного простору для двох протилежних напрямків вектора зусилля. * $P < 0,05$ між середніми значеннями кутів електроміограми певного м'яза для двох протилежних напрямків руху вектора зусилля.

пояса, зусилля генерувалися внаслідок активації м'язів-агоністів. Під час руху годографа вектора зусилля вздовж цільової траєкторії, у разі генерації зусилля, орієнтованого у напрямі згинання двох суглобів, більшою мірою коактивувалися м'язи-згиначі передпліччя (Br, BB cl), двосуглобовий м'яз-згинач (BB cb), м'яз-згинач плеча (Pm) і меншою мірою м'язи-розгиначі плеча та передпліччя (або при повній відсутності їх активності). Під час реалізації розгинальних зусиль більшою мірою активувалися м'язи-розгиначі плечового та ліктьового суглобів при незначній коактивації м'язів-антагоністів. Отримані результати в повній відповідності можна порівняти з результатами попередніх праць [15, 16], які свідчать про те, що реалізація повільних (небалістичних) зусиль переважно активує м'язи-агоністи в простих цілеспрямованих рухах. Аналіз ускладнюється тим, що цільова траєкторія руху включає доцентрове прискорення (рух вектора по кривій). Ця умова створює додаткові труднощі у визначенні точної спрямованості амплітуди ЕМГ м'яза, але одночасно демонструє процеси послідовної коактивації м'язів антагоністів на всьому діапазоні операційного простору. При цьому наші експерименти показали, що під час розвитку зусилля, годограф вектора якого рухається по колу, для всіх напрямків створення зусилля, була характерна та чи інша ступінь коактивації м'язів, які є антагоністами для конкретного напрямку вектора зусилля. Скоріш за все цей факт пояснюється недостатнім реципрокним гальмуванням м'язів антагоністів, що викликано поступовою активацією м'язів різних функціональних груп, під час руху годографа вектора по колу. Усі 8 м'язів виявляли певну ступінь активації в залежності від напрямку вектора зусилля. Таким чином, під час реалізації ізометричних моторних реакцій, які забезпечувалися спробами згинання в плечовому і ліктьовому суглобах, була отримана комбінація ЕМГ-активності

м'язів-згиначів і розгиначів цих суглобів, яка вказувала на підвищення активності групи м'язів-згиначів, в той час як м'язи-розгиначі відповідних суглобів виявляли незначну тонічну активність. Навпаки, в умовах генерації зусиль, орієнтованих у напрямі розгинання обох суглобів, суттєвий внесок робили м'язи-розгиначі. Важливо відзначити, що м'язи-згиначі при виконанні розгинальних зусиль демонстрували деяку ступінь коактивації в секторах окружності, характерних для м'язів-розгиначів. Причому ступінь коактивації у м'язів-згиначів у відсотковому співвідношенні була значно вище, ніж у м'язів-розгиначів. Така особливість характерна для ЕМГ м'язів-антагоністів при різній спрямованості вектора зусилля. Можливо, це пов'язано з переважною роллю м'язів-згиначів у стабілізації розгинальних рухів, виробленої в процесі еволюції у чотириногих тварин для підтримки обраної пози. М'яз-згинач передпліччя Br збільшував свою ЕМГ-активність при створенні зусиль у більшості напрямків, у тому числі і тих, при яких зусилля спрямоване у бік розгинання. Ймовірно, цей факт пов'язаний з тим, що згаданий м'яз не тільки виконує функцію згинача передпліччя, а й стабілізує головку плечової кістки, притискаючи її своїм сухожиллям до суглобової поверхні лопатки [17]. Активна участь Br при створенні двосуглобових ізометричних зусиль, у тому числі зусиль, орієнтованих уздовж осі передпліччя (нульовий момент сили для ліктьового суглоба), може бути результатом мультифункціональності цього м'яза і його участі як у згинанні передпліччя, так і в його пронації та стабілізації кута в ліктьовому суглобі [18, 19]. У наших дослідженнях з'ясувався той факт, що під час створення рукою ізометричного зусилля по колу, під час збігу напрямків рухів у ліктьовому і плечовому суглобах, генерація сили реалізовувалася в основному м'язами-агоністами відносно складних моторних реакцій. Ймовірно, така структура напрямків

створюваних зусиль, що збігаються, найбільш ефективна для реалізації. Більш складний характер демонструє організація моторних команд при протилежній спрямованості можливих рухів у ліктьовому і плечовому суглобах, коли для реалізації двосуглобового зусилля суперпозиція сил, які створюються м'язами-агоністами для певних напрямків руху, потребувала залучення додаткових сил. Можливо, в розвитку таких зусиль брали участь м'язи, ЕМГ-активність яких не реєструвалася під час дослідів. Це відноситься до глибоких м'язів плечового пояса – надостьового (*m. supraspinatus*), підлопаткового (*m. subscapularis*) і великого круглого м'яза (*m. teres major*), які не тільки керують положенням голівки плечової кістки, але також беруть участь у формуванні зусиль, спрямованих на згинання плеча, його відведенні, приведенні та обертанні назовні.

Найважливішою особливістю наших досліджень є відмінність амплітуди ЕМГ при протилежних напрямках обходу цільової траєкторії зусилля. Слід зазначити, що в більшості випадків збільшення амплітуди ЕМГ було характерно для напрямку проти годинникової стрілки. Ймовірно, представлену складність можна пояснити нетиповою послідовністю активації м'язів-антагоністів при виконанні циклічних рухів рукою в режимі ізометричного скорочення. За таких умов здійснення руху по колу швидше за все ускладнюється за рахунок більшої коактивації м'язів-антагоністів, що в свою чергу ускладнює рух по колу. Описаний феномен призводить до більшої активації м'язів-агоністів для збереження стабільності в ліктьовому і плечовому суглобах. Можливо, що такі особливості активації м'язів в умовах ізометричного скорочення потрібні не тільки для генерації заданого зусилля, а й для забезпечення параметрів, необхідних для здійснення деякої силової протидії. Іншими словами, для створення потрібної механічної жорсткості системи тіло – плече – передпліччя. Отримані нами закономір-

ності коактивації м'язів можуть вказувати на комплексний характер ЦМК, що координують складну структуру моторних реакцій. Ті дослідження, які свідчать про синергічність роботи м'язів плеча і плечового пояса однієї функціональної групи за умов створення ізометричних двосуглобових зусиль, підтверджуються більш ранніми дослідженнями на приматах [20, 21]. Автори свідчать, що нейрони, які контролюють довільні скорочення окремих м'язів кінцівки, досить широко розподілені на поверхні моторної кори. Таким чином, один і той самий м'яз може активуватися від різних ділянок неокортекса. Також показано, що терміналі кортико-спінальних аксонів дивергують на багатьох спінальних мотонейронах, які в свою чергу іннервують більше ніж один м'яз. Саме наявність відносно широкого кортикального представництва окремих м'язів та перекриття ділянок кори, які іннервують ці м'язи, може пояснити такі спостережувані моторні ефекти, як ізометричні двосуглобові зусилля циклічно мінливого напрямку, викликані скороченням різних або одних і тих самих м'язів, але з різною інтенсивністю. Така просторова складність структури ЦМК і моторного контролю, ймовірно, може забезпечити функціональну пластичність і високоточну координацію здійснюваних рухових актів.

А. В. Легедза, А. В. Горковенко, И. В. Верещака, М. Дорновский, А. И. Костюков

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОМИОГРАФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЦ РУКИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПОВОРОТОВ ВЕКТОРА ИЗОМЕТРИЧЕСКОГО УСИЛИЯ КИСТИ В ПРОТИВОПОЛОЖНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ

Сравнивали особенности формирования целенаправленных тонических изометрических усилий, которые создавались мышцами плечевого пояса и плеча, для двух противоположных изменений направлений вектора произвольного усилия - по часовой и против часовой стрелки. Модуль вектора усилия при этом оставался постоянным. Интенсивность центральных моторных команд оценивали согласно найденной площади

выпрямленных, усредненных и аппроксимированных электромиограмм (ЭМГ), регистрируемых от исследуемых мышц. Развитие усилия заданного направления осуществлялось в операционном пространстве горизонтальной плоскости при углах 75° в плечевом суставе и 90° - локтевом. Обнаружено синергическое взаимодействие отдельных функциональных групп мышц в условиях определенной силовой реакции. В пространственном отношении установлены области подавляющего активности исследуемых мышц в пределах операционного пространства. Показаны различия в уровнях амплитуд ЭМГ при противоположных направлениях обхода вектора усилия и коактивация мышц-сгибателей, в то время как разгибатели проявляли активность только в пределах своих функциональных секторов. Для половины исследуемых мышц характерно статистически значимое увеличение амплитуды ЭМГ при направлении обхода вектора усилия против часовой стрелки по отношению к амплитуде ЭМГ по часовой стрелке. Данный феномен может быть объяснен более сложной организацией паттернов моторных команд, адресованных мышцам плеча и предплечья, вызванной нетипичной последовательностью активации мышц-антагонистов при совершении циклических движений рукой в режиме тонического изометрического сокращения.

Ключевые слова: двухсуставные изометрические усилия; центральные двигательные команды; вектор усилия; электромиограмма;

¹A.V. Lehedza, ¹A.V. Gorkovenko, ¹I.V. Vereshchaka, ²M. Dornowski, ¹A. I. Kostyukov

COMPARATIVE ANALYSIS OF ELECTROMYOGRAPHIC MUSCLE ACTIVITY OF THE HUMAN HAND DURING CYCLIC TURNS OF ISOMETRIC EFFORT VECTOR OF WRIST IN OPPOSITE DIRECTIONS.

The features of the formation of targeted tonic isometric effort created by muscles of the shoulder girdle and shoulder were compared for two opposite changes of the directions of arbitrary force vector - clockwise and counterclockwise. The magnitude of the effort vector remained constant. The intensity of the central motor commands (CMC) was evaluated according to the area of founded rectified, averaged and approximated electromyographic (EMG) recorded from the investigated muscles. The effort development was carried out in determined direction in operation space of the horizontal plane under angles of 75° in the shoulder joint and 90° in the elbow one. The synergic interaction of individual functional groups of muscles under certain reaction force was found. In the case of space, it was determined the main activity areas of the investigated muscles within the operating space. The differences were shown in the levels of EMG amplitude in opposite directions bypass of effort vector. Coactivation of flexor muscles was found, while the extensors showed their activity

only within their functional sectors. Half of the investigated muscles showed an increase of the EMG amplitude for the counter-clockwise direction in relation to EMG amplitude for the clockwise direction. This can be attributed to more complex patterns of motor commands organization which consistently addressed to the muscles of the shoulder and forearm caused by atypical sequence of activation of antagonist muscles under making hand movements in cyclic mode during tonic isometric contraction.

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

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

²Academy of Physical Education and Sports, Gdansk, Poland

REFERENCES

- Bernstein NA. Physiology of movement and activity. 1st ed. Moscow: Nauka; 1990. [Russian].
- Cheung VC, Turolla A, Agostini M, Silvoni S, Bennis C, Kasi P, Paganoni S, Bonato P, Bizzi E. Muscle synergy patterns as physiological markers of motor cortical damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 14652:56.
- Culham E, Peat M. Functional anatomy of the shoulder complex. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1993; 18: 342:50.
- Sherrington C. Reflex inhibition as a factor in the co-ordination of movement and posture. *Q J Exp Physiol*. 1913; 6: 251:310.
- Terry GC, Chopp TM. Functional anatomy of the shoulder. *J Athl Train*. 2000; 35: 248:55.
- Sinel'nikov RD. Atlas of Human Anatomy. 2nd ed. Moscow: State Publishing House of the medical literature; 1963.
- 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: 1532:42.
- 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: 2123:42.
- Boland MR, Spigelman T, Uhl TL. The function of brachioradialis. *J Hand Surg*. 2008; 33: 1853:59.
- Buchanan T.S., Rovai G.P., Rymer W.Z. Strategies for muscle activation during isometric torque generation at the human elbow. *J Neurophysiol*. 1989; 62: 1201:12.
- 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): 281:83.
- 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): 324:36.
- 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. Vereshchaka IV, Lehedza OV, Dornowski M, Gorkovenko AV, Khoryevin VI. The activity of muscles of the shoulder girdle and shoulder during the constant isometric efforts of the wrist. J Physiol. 2014; 60(3): 89:97.
15. Debicki DB, Gribble PL. Persistence of inter-joint coupling during single-joint elbow flexions after shoulder fixation. Exp Brain Res. 2005; 163: 252:57.
16. Gribble PL, Mullin LI, Cothros N, Mattar A. Role of cocontraction in arm movement accuracy. J Neurophysiol. 2003; 89: 2396:05.
17. Gribble PL, Ostry DJ. Independent coactivation of shoulder and elbow muscles. Exp Brain Res. 1998; 123: 355:60.
18. Tonkov VN. Normal human anatomy. 6th ed. Leningrad: Medgiz; 1962.
19. Peat M. Functional anatomy of the shoulder complex. Phys Ther. 1986; 66: 1855:65.
20. Escamilla RF, Yamashiro K, Paulos L, Andrews JR. Shoulder muscle activity and function in common shoulder rehabilitation exercises. Sports Med. 2009; 39: 663:85.
21. d'Avella A, Portone A, Fernandez L, Lacquaniti F. Control of fast-reaching movements by muscle synergy combinations. J Neurosci. 2006; 26: 7791:10.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.09.2014*

С. Д. Мельничук¹, С.В. Хижняк¹, В.С. Морозова¹, Л.І. Степанова²,
А.О. Уманська¹, В.М. Войціцький¹

Енергетична функція мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України; ²Київський національний університет імені Тараса Шевченка; E-mail: khs2014@ukr.net

Досліджено вплив штучного вуглекислотного гіпобіозу на функціональну активність мітохондрій кардіоміоцитів щурів (окисного фосфорилування, активності ферментів електронно-транспортного ланцюга) та структурного стану внутрішньої мембрани мітохондрій. Зменшення дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій вказує на пригнічення поглинання ними кисню в умовах гіпобіозу. Разом з цим для тварин характерна гіперглікемія. Встановлено часткове роз'єднанням процесів спряження окиснення і фосфорилування при запуску ланцюга лише з I комплексу. Це узгоджується зі зниженням на 26,1% щодо контролю НАДН-КоQ-оксидоредуктазної активності внутрішньої мембрани мітохондрій (I комплекс), водночас сукцинатдегідрогеназна (II комплекс) та цитохромоксидазна (IV комплекс) активності не змінювалися. Показана конформаційна модифікація білкових молекул внутрішньої мембрани мітохондрій за гіпобіозу. Зроблено висновок про підтримку в умовах гіпобіозу енергетичної функції мітохондрій кардіоміоцитів, про що свідчить їх АТФ-синтезна активність, чому можливо сприяє структурно-функціональна модифікація внутрішньої мембрани мітохондрій, яка має адаптивний характер.

Ключові слова: штучний гіпобіоз; кардіоміоцити; мітохондрії; електронно-транспортний ланцюг; внутрішня мембрана мітохондрій.

ВСТУП

Формування гіпобіотичного стану призводить до розвитку гіпометаболізму, що супроводжується зниженням енергозабезпечення гоміотермного організму [1, 2]. Основним постачальником енергії акумульованої в АТФ в еукаріотних клітинах є мітохондрії, а їх функціональну активність насамперед забезпечує внутрішня мембрана, яка містить компоненти електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) й зворотну H^+ -АТФазу. Один зі шляхів регуляції процесу окисного фосфорилування та пов'язаного з ним синтезу АТФ у мітохондріях може бути зумовлений структурною модифікацією мембран.

Створення стану штучного гіпобіозу пов'язано з використанням гіпоксигіперкапічних газових середовищ при одночасному

зниженні температури тіла, що призводить до активації адаптивних можливостей організму тварин [3, 4]. Мітохондрії чутливі до будь-якого впливу, включаючи нестачу кисню чи гіпотермію. Мітохондріальний ферментний комплекс міокарда в умовах гіпотермії піддається додатковому навантаженню, що пов'язано з основною роллю серця в системній компенсації зниженої доставки кисню до тканин. Вважається, що гіпотермія характеризується кардіопротекторними властивостями [5].

У гібернантів (при переході до зимової сплячки) у мітохондріях печінки окисне фосфорилування знижується, про що свідчить пригнічення активності IV комплексу ЕТЛ, і це у свою чергу пов'язано з модифікацією фосфоліпідів мітохондріальних мембран [6]. Подібне спостерігається і за

© С.Д. Мельничук, С.В. Хижняк, В.С. Морозова, Л.І. Степанова, А.О. Уманська, В.М. Войціцький

штучного гіпобіозу [7]. Враховуючи, що пригнічення функціональної активності серця при хірургічних втручаннях може досягатись за рахунок гіпотермії [8] чи гіпобіозу [2], що на клітинному рівні призводить до зміни біоенергетичних процесів, дослідження шляхів тривалого зниження функцій серця є однією із важливих задач кардіохірургії.

Метою нашої роботи було дослідження за умов штучного гіпобіозу мітохондріального дихання та активності електронно-транспортного ланцюга у кардіоміоцитах, що є відображенням біохімічних процесів в органі, який забезпечує доставку кисню до тканин.

МЕТОДИКА

У дослідях використано 42 білих безпородних щурів-самців масою 180–200 г. Експерименти проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контрольна (інтактні тварини); 2-га – щури, у яких моделювали стан штучного гіпобіозу; 3-тя та 4-та – тварини, яких використовували відповідно через 2 та 24 год після моделювання стану гіпобіозу. Для біохімічних досліджень тварин декапітували.

Стан штучного гіпобіозу створювали за методикою Бахметьєва-Джайя-Анжуса [2, 9]. Для цього тварин поміщали в герметично закриту камеру, об'єм якої становив 3 дм³, при температурі довкілля 3–4 °С. Впродовж 3–3,5 год перебування у камері за таких умов (вплив гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії) у тварин розвивався гіпобіотичний стан. Склад газового середовища в камері контролювали, використовуючи газоаналізатор («АГМ-505»), ректальну температуру тіла – електротермометр, а частоту серцевих скорочень – електрокардіограф типу ЕКІТ-03 М.

Методом диференційного центрифугування отримували мітохондрії кардіоміо-

цитів, з яких – внутрішню мембрану (ВМ) мітохондрій [10]. Вміст білка визначали за Greenberg [11].

Інтенсивність дихання (поглинання кисню) мітохондрій та їх фосфорилування визначали на полярографі (LP-9; Чехословаччина) у термостатованій кюветі з використанням платинового електрода. Полярограми ідентифікували за Чансом [12]. Розраховували швидкість дихання в наступних станах: стан 2 — «вільний» (V_4^S), стан 3 — АДФ-стимульоване дихання, або «активний» (V_3), стан 4 — «контрольований» (V_4^{ATP}), а також V_ϕ — швидкість фосфорилування АДФ, дихальний контроль — ДК (V_3/V_4^{ATP}), ефективність фосфорилування доданого АДФ — АДФ/О та показник, що характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій мітохондрій — V_4^S/V_4^{ATP} . Дослідження проведено за використання субстратів – малату чи сукцинату (у кінцевій концентрації 10 ммоль/л), які запускають ЕТЛ з I та II комплексів відповідно.

Вміст глюкози та сечової кислоти в крові визначали на спектрофотометричному аналізаторі «BS-3000 P» («Sinnova»; Китай). Вимірювали активність ферментів дихального ланцюга мітохондрій [13–15] та H^+ АТФази [16].

Конформаційні зміни білкових молекул ВМ кардіоміоцитів оцінювали за гасінням акриламідом триптофаної флуоресценції, а результати представляли використовуючи модифікований графік Штерна-Фольмера [17]. Флуоресцентні дослідження проводили при $\lambda_{\text{зб.}}=295$ нм та $\lambda_{\text{фл.}}=340$ нм на спектрофлуориметрі (Shimadzu-RF510; Японія).

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці показників оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час перебування тварин у гіпобіотичній камері контролювали температуру та склад

газового середовища (рис.1, а, б). Розвиток гіперкапнії супроводжувався підвищенням вмісту вуглекислого газу до 18 ± 2 %, а гіпоксії – зниженням вмісту кисню до $3,8 \pm 1$ %. Температура тіла тварин знижувалася з $37,0 \pm 0,2$ до $16,5 \pm 0,7$ °С, а частота серцевих скорочень зменшувалася з 400 ± 15 до 75 ± 15 хв⁻¹ через 3–3,5 год (див. рис.1, а, в). Щури повністю втрачали рухливість, реакцію на больовий подразник, що свідчить про розвиток гіпобіотичного стану. Після досягнення цього стану тварин діставали з гіпобіотичної камери і через 2-2,5 год у них нормалізувалась температура тіла та частота серцевих скорочень (див.рис.1, а, в).

У результаті зниження використання кисню в умовах гіпобіозу потреба компенсації недостатньої ефективності дихання забезпечується внаслідок гіперглікемії. Про це свідчить збільшення у середньому вдвічі вмісту глюкози в крові щурів ($16,8 \pm 1,3$ щодо $8,1 \pm 0,5$ ммоль/л у контролі; $P < 0,05$). Подібне зростання відмічається за гіпоксії

[18] чи гіпотермії [19], що пояснюється підвищенням активності фосфорилази-А, яка стимулює розпад глікогену [19]. Крім того надлишок глюкози може підтримувати рівень утворення АТФ у мітохондріях різних тканин і термогенез [18].

З іншого боку в крові щурів виявлено зменшення вмісту сечової кислоти на 38, 4 % ($105,4 \pm 9,3$ щодо $171,1 \pm 10,0$ мкмоль/л у контролі; $P < 0,05$). Сечова кислота – це кінцевий продукт розпаду пуринових основ, і зниження її вмісту свідчить про зменшення рівня катаболізму пуринових основ, у тому числі за пригнічення синтезу АТФ. У свою чергу пуринові основи є біологічно активними речовинами, які контролюють процеси перебудови організму, як це показано для гібернантів при переході до зимової сплячки та виході з цього стану [20]. Через 24 год після моделювання штучного гіпобіозу вміст глюкози нормалізується, хоча сечової кислоти залишається зниженим (результати не представлено). Отримані результати, а також

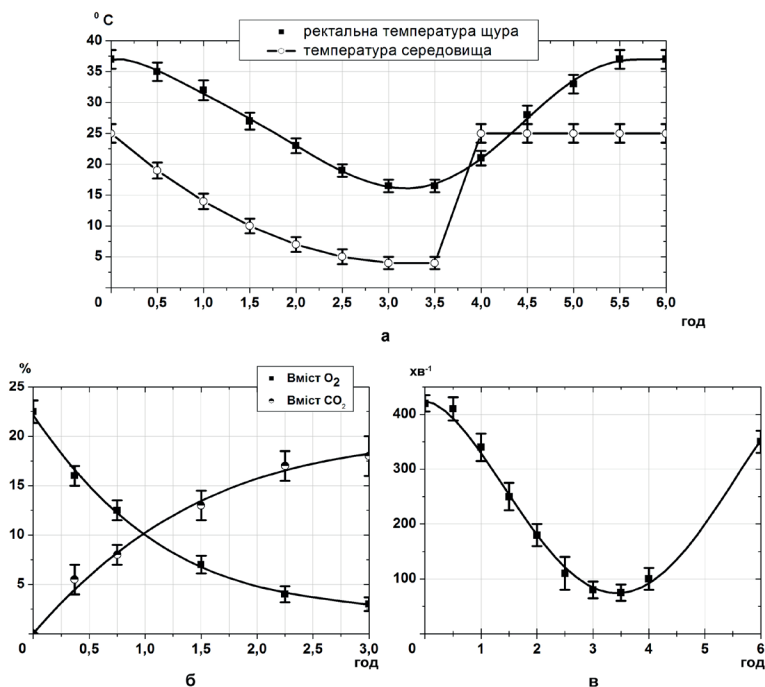


Рис. 1. Температура у гіпобіотичній камері та тіла щурів (а), газовий склад середовища у гіпобіотичній камері (б), частота серцевих скорочень щурів (в) за розвитку гіпобіозу та виходу з цього стану

біохімічні показники крові щурів за гіпобіозу та при виході з нього [21] характеризують адаптивні зміни організму до комплексного впливу гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії.

У формуванні адаптивного стану клітин важливу роль відіграє функціонування мітохондрій [18, 22]. Результати досліджень показників окисного фосфорилування мітохондрій кардіоміоцитів свідчать, що у разі використання малату за гіпобіозу V_4^S зменшується в середньому у 2,4 раза, V_3 – у 2,5 раза, V_4^{ATP} – у 2,0 раза, а V_ϕ – на 52 % щодо контролю. Аналогічні зміни спостерігаються і за використання сукцинату: V_4^S зменшується в середньому у 1,9 раза; V_3 – у 2,1 раза; V_4^{ATP} – у 2,0 раза, а V_ϕ – на 33 % щодо контролю (табл. 1).

Таким чином, в умовах гіпобіозу, запускаючи дихальний ланцюг як з I, так і II комплексу спостерігається зменшення швидкості поглинання кисню мітохондріями кардіоміоцитів. Тобто потік протонів через ВМ мітохондрій знижується. Ефективність його використання для синтезу АТФ оцінювали за показниками АДФ/О та ДК. В дослідях з використанням малату АДФ/О знижується на 20,1 %, а ДК – на 22,8 % відносно контролю, що свідчить про часткове роз'єднання спряження процесів окиснення та фосфорилування. При цьому знижується гідролізуюча активність H^+ -АТФази, оскільки V_4^S/V_4^{ATP} зменшується на 22 % щодо контролю (рис. 2). У разі

використання сукцинату АДФ/О знижується на 24,4 %, а величини ДК та V_4^S/V_4^{ATP} не змінюються відносно контролю (див. рис. 2), що вказує на ефективність спряження процесів дихання та фосфорилування. Можливо, це пояснюється роллю сукцинатного типу дихання, який реалізується за різних стрес-реакцій для підтримання рівня життя [4].

Визначення активності ферментів ВМ мітохондрій кардіоміоцитів показано таке. Сукцинат-КоQ-оксидоредуктазна активність ВМ (II комплекс) в умовах дослідів не відрізняється від контролю. НАДН-КоQ-оксидоредуктазна активність ВМ (I комплекс) за гіпобіозу зменшується на 26,1 % щодо контролю і повертається до контрольних значень при виході з цього стану (табл. 2). Подібне зниження активності відбувається в період зимової сплячки тварин, оскільки, в мозку тварин-гібернантів виявлено інгібітори НАДН-КоQ-оксидоредуктази, які впливають на функціональну активність ізольованого серця жаби [23].

Отримані результати свідчать, що ФАД-залежні субстрати (сукцинат), які використовуються II комплексом, можуть більш інтенсивно утилізуватись, ніж НАД-залежні (малат), які використовуються I комплексом. Тобто в умовах штучного гіпобіозу перевага надається функціонуванню II комплексу ЕТЛ мітохондрій.

Цитохром c оксидоредуктаза (цитохромоксидаза) – термінальна ділянка ЕТЛ,

Таблиця 1. Показники дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Малат		Сукцинат	
	Контроль	Гіпобіоз	Контроль	Гіпобіоз
Інтенсивність дихання:				
у стані 2 (V_4^S), мктом O_2 /хв·мг білка	0,052±0,003	0,022±0,003*	0,031±0,005	0,016±0,003*
у стані 3 (V_3), мктом O_2 /хв·мг білка	0,146±0,012	0,059±0,002*	0,097±0,006	0,047±0,004*
у стані 4 (V_4^{ATP}), мктом O_2 /хв·мг білка	0,041±0,006	0,021±0,003*	0,022±0,003	0,011±0,002*
Швидкість фосфорилування (V_ϕ), мкмоль АДФ/хв·мг білка	0,493±0,025	0,238±0,017*	0,316±0,032	0,211±0,031*

* $P \leq 0,05$ щодо контролю.

функціонування якої може впливати на весь ланцюг [24]. Цитохромоксидазна активність ВМ мітохондрій в умовах дослідження істотно не змінюється щодо контролю. H^+ -АТФазна активність ВМ також не зазнає вірогідних змін (див. табл. 2), що вказує на підтримання енергетичної активності мітохондрій кардіоміоцитів.

Функціонування мембранних систем, в тому числі інтегральних мембранних білків, залежить від їх ліпідного оточення та динамічних властивостей, а регуляція

активності мембранозв'язаних ферментів відбувається на рівні молекулярних взаємодій білкових молекул та анулярних ліпідів (білок-ліпідні взаємодії) [25].

Інтенсивність власної флуоресценції (при $\lambda_{\text{макс.}} = 295 \text{ нм}$) ВМ мітохондрій зростає за гіпобіозу на 40,1 % відносно контролю, що може бути зумовлено конформаційними перебудовами білкових молекул, які супроводжуються переходом триптофанових залишків у більш гідрофобну область [26]. Через 24 год після гіпобіозного стану цей показник повертається до рівня контролю (рис. 3, а).

В умовах дослідження спостерігається гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції ВМ мітохондрій. Відсутність зсуву максимуму флуоресценції триптофанів за гіпобіозу щодо контролю (результати не представлено) може пояснюватись наявністю ефективного переносу енергії між триптофанілами в гетерогенній популяції, яке зумовлює однакове гасіння їх флуоресценції, оскільки відомо, що зсув піку емісії відбувається лише за жорстких денатуруючих умов [26].

Як розраховано з модифікованого графіка Штерна-Фольмера, за гіпобіозу не змінюється частка триптофанових залишків, що піддаються гасінню (f_a ; рис. 3, б). За кутом нахилу прямих розраховано і ефективну константу гасіння (K_{SV}), яка збільшується на 33% ($P < 0,05$). Зростання цього показника може бути зумовлено зменшенням структурної жорсткості мембранних білків мітохондрій [26, 27].

Таким чином, структурні перебудови ВМ мітохондрій кардіоміоцитів за штучного гіпобіозу супроводжуються конформаційними модифікаціями білкових молекул, що може призводити до змін просторової організації білок-ліпідних комплексів та, зокрема, впливати на функціональну активність ферментних комплексів ЕТЛ. Вони короточасні і є реакцією на дію чинників гіпобіозу.

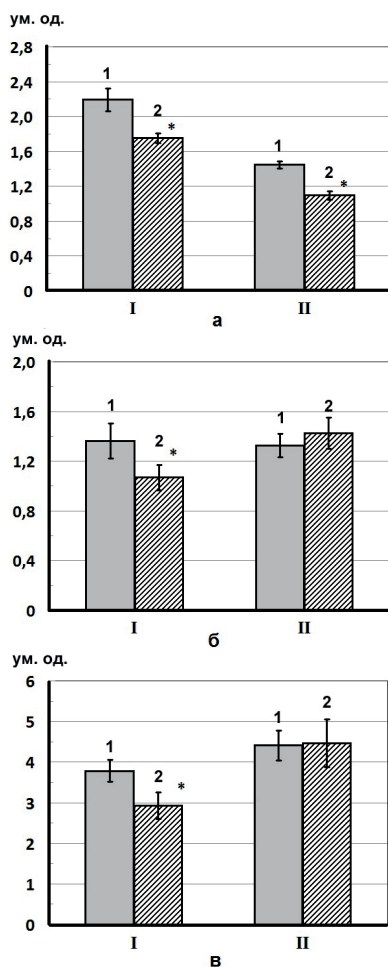


Рис. 2. Енергетичні показники мітохондрій кардіоміоцитів щурів: а – ефективність фосфорилування доданого АДФ (АДФ/О), б – активність АТФ-гідролітичних реакцій (V4S/V4АТФ), в – коефіцієнт дихального контролю (ДК); I – малат, II – сукцинат; 1 – контроль, 2 – гіпобіоз.

* $P \leq 0,05$ щодо контролю.

Таблиця 2. Активність ферментів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n=7$)

Фермент	Контроль	Гіпобіоз	Після гіпобіозу, год	
			2	24
НАДН-КоQ – оксидоредуктаза, нмоль калію фериціаніду відновленого/ хв·мг білка	571,3±40,5	422,1±31,3*	524,7±23,6	517,1±43,4
Сукцинат-КоQ –оксидоредуктаза, нмоль сукцинату / хв·мг білка	554,6±52,2	604,5±52,4	547,6±49,2	549,8±43,3
Цитохромоксидаза, нмоль цитохрому с окисленого /хв·мг білка	600,4±52,2	601,1±56,8	672,2±60,2	619,8±59,2
H^+ -АТФаза, мкмоль P_n /хв·мг білка	2,39±0,22	2,41±0,20	2,22±0,20	2,38±0,21

* $P \leq 0,05$ щодо контролю.

Підсумовуючи отримані результати можна відзначити, що за моделювання штучного гіпобіозу (вплив гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії) знижується використання кисню мітохондріями кардіоміоцитів та часткове роз'єднання процесів спряження окиснення та фосфорилування при запуску ланцюга з I комплексу. Встановлене при цьому пригнічення НАДН-КоQ-оксидоредуктазної активності внутрішньої мембрани (I комплекс), на відміну від сукцинат-КоQ-оксидоредуктази (II комплекс), свідчить про перевагу утилізації ФАД- над НАД-залежними субстратами. Відсутні зміни цитохром-оксидазної (IV комплекс) та H^+ -АТФазної активності внутрішньої мембрани. Перерозпо-

діл в функціональній активності окремих комплексів ЕТЛ, можливо попереджають розвиток мітохондріальних дисфункцій за рахунок ощадливого використання кисню. Важливе значення при цьому можуть відігравати конформаційні перебудови внутрішньої мембрани мітохондрій, які супроводжуються зростанням внутрішньомолекулярної динаміки білкових молекул. Дослідження, які проведені за моделювання штучного гіпобіозу та при виході з цього стану, свідчать про адаптивний характер структурно-функціональної модифікації внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів до впливу гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії.

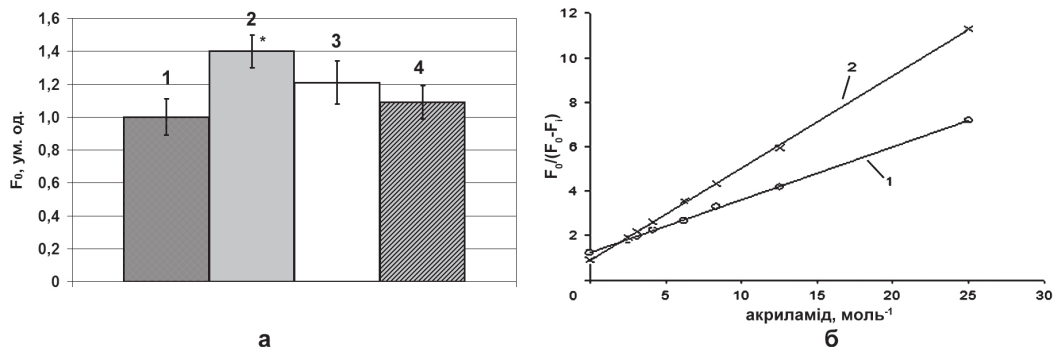


Рис. 3. Триптофанова флуоресценція (а) внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів: 1 – контроль; 2 – штучний гіпобіоз; 3, 4 – через 2 та 24 год після гіпобіозу. Модифікований графік Штерна-Фольмера (б) гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів: 1 – контроль; 2 – штучний гіпобіоз; (F_0 та F_i – інтенсивність флуоресценції відповідно за відсутності та наявності гасника).

* $P \leq 0,05$ щодо контролю

**С.Д. Мельничук¹, С.В. Хижняк¹,
В.С. Морозова¹, Л.И. Степанова²,
А.А. Уманская¹, В.М. Войцицкий¹**

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ

Исследовано влияние искусственного углекислотного гипобииоза на функциональную активность митохондрий кардиомиоцитов крыс (окислительного фосфорилирования, активности ферментов электрон-транспортной цепи) и структурного состояния внутренней мембраны митохондрий. Снижение дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий свидетельствует об угнетении скорости поглощения кислорода в условиях гипобииоза, наряду с возможным компенсаторным явлением гипергликемии. Установлено частичное разобщение процесса сопряжения окисления и фосфорилирования при запуске цепи только из I комплекса. Это согласуется с понижением на 26,1% относительно контроля НАДН-КоQ-оксидоредуктазной активности внутренней мембраны митохондрий (I комплекса), а сукцинатдегидрогеназная (II комплекс) и цитохромоксидазная (IV комплекс) активности не изменяются. Показана конформационная модификация белковых молекул внутренней мембраны митохондрий при гипобииозе. Сделан вывод о поддержании в условиях гипобииоза энергетической функции митохондрий кардиомиоцитов, о чем свидетельствует АТФ-синтетазная активность, возможно вследствие структурно-функциональной модификации внутренней мембраны митохондрий, которая носит адаптационный характер.

Ключевые слова: искусственный гипобииоз; кардиомиоциты; митохондрии; электрон-транспортная цепь; внутренняя мембрана митохондрий.

**S.D. Melnychuk¹, S.V. Khyzhnyak¹, V.S. Morozova¹,
L.I. Stepanova², A.A. Umanskaya¹,
V.M. Voitsitsky¹**

THE ENERGY FUNCTION OF RAT CARDIAC MITOCHONDRIA UNDER ARTIFICIAL HYPOBIOSIS

We investigated the energy activity of mitochondria from rat cardiomyocytes under the artificial carbon dioxide hypobiosis, which led to physiological changes in the organism (the decrease of body temperature, the reduction of heart rate, etc.). The respiratory and phosphorylation activities in mitochondria of cardiomyocytes is reduced when using two oxidation substrates (succinate and malate), which characterize the rate of the oxygen consumption by the mitochondria. The partial uncoupling of the oxidation and phosphorylation processes when using the malate unlike succinate was established. The activity of NADH-KoQ-oxidoreductase (complex I of the respiratory chain) is inhibited, but the activities of succinate

dehydrogenase and cytochrome oxidase don't change. Probably, the priority of the succinate use under the artificial hypobiosis provides the support of the mitochondria functional activity on a sufficient energy level. It is evidenced by the ATP-synthetase activity. The modifications of the structural and functional state of the inner mitochondria membrane of the cardiomyocytes are directed to the adaptation under the artificial carbon dioxide hypobiosis.

Key words: artificial hypobiosis, cardiomyocytes, mitochondria, respiratory chain, inner mitochondrial membrane, conformational modification.

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University

REFERENCES

1. Melnychuk SD, Vyhovanc VI. The influence of the artificial hypobiosis on the energy metabolism in the rats. *Ukr Biokhim Zh* 2005;77(3):131–35. [Ukrainian].
2. Melnychuk SD, Melnychuk DO. The animal hypobiosis state (molecular mechanisms and practical implications for the agriculture and medicine). Kyiv: NULES press; 2007. [Ukrainian].
3. Withers PC, Cooper CE. Metabolic depression: a historical perspective. *Prog Mol Subcell Biol* 2010;(49):1–23.
4. Timofeev NN. Hypobiosis and cryobiosis. Past, present and future. Moscow: Inform-Znanie; 2005. [Russian].
5. Zhenyin T, Zhaoyang Z, Cheng CL. 5'-Adenosine monophosphate induced hypothermia reduces early stage myocardial ischemia/reperfusion injury in a mouse model. *Am J Transl Res* 2011;3(4):351–61.
6. Staples JF, Brown JC. Mitochondrial metabolism in hibernation and daily torpor: a review. *J Comp Physiol B* 2008; 178(7):811–27.
7. Melnychuk SD, Morozova VS, Khyzhnyak SV, Voitsitsky VM. The oxidative phosphorylation parameters of the cardiomyocyte mitochondria of the rats under the artificial hypobiosis. *Dopovidy NAN of Ukraine* 2013;(4):148–53. [Ukrainian].
8. Litasova EE, Lomivorotov VN, Karaskov AM, Ginko AV. Combined hypothermia during the open heart surgery: guidelines. Novosibirsk; 2000. [Russian].
9. Melnychuk SD. The main indicators of the blood acid-base status and metabolism in the rats under the amputation in the conditions of the hypobiosis and general anesthesia. *Ukr Biokhim Zh* 2001;73(6):104–107. [Ukrainian].
10. Severin SE, Solov'eva GA. Workshop on Biochemistry. Moscow: MSU press; 1989. [Russian].
11. Greenberg CS, Craddock PR. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin Chem* 1982;28(7):1725–26.
12. Frank GM, editor. Study guide of biological oxidation by polarographic method. Moscow: Nauka; 1973. [Russian].
13. Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L, Bergstrand A.

- An electron-transport system associated with outer membrane of liver mitochondria. The Journal of Cell Biology 1967;(32):415–38.
14. Tyler DD, Natanailides C. Assay of maximal cytochrome c oxidase activity in fish muscle. Basic and Applied Myology 1995;5(Pt I):99–102.
15. Prohorova MI, editor. The methods of the biochemical research. Leningrad: Leningrad university press; 1982. [Russian].
16. Krause F, Reifschneider NH, Goto S. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 2005;(329):583–90.
17. Dobrecov GE. Fluorescent Probes in the study of cell membranes and lipoproteins. Moscow: Nauka; 1989. [Russian].
18. Portnychenko VY, Portnychenko AG, Sydorenko AM. Glycemia as a determinant factor of the restructuring ways of the metabolism and respiratory system under the hypoxia. Pathologia 2011;8(2):52–5. [Ukrainian].
19. Jemirbekov JeZ, Lvova SP. Mechanisms of the biochemical changes at low body temperatures. Rostov-on-Don: Rostov university press; 1985. [Russian].
20. Ignat'ev DA, Suhova GS, Ljashkov AE. Temperature and cardiotropic effects of the kyotorphin and neokyotorphin peptides in the experiments on hibernating and non hibernating animals. Uspekhi fiziologicheskikh nauk 2009;40(3):68–88. [Russian].
21. Melnychuk SD, Khyzhnyak SV, Morozova VS, Boyko VV, Babych LV, Voitsitsky VM. The biochemical serum parameters of the rats under the artificial hypobiosis. Bioresursy i pryrodokorystuvannja 2013;5(3–4):5–11. [Ukrainian].
22. Lukjanova LD. Modern problems of the adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in the system regulation. Patol fiziologija i jeksperim terapija 2011;(1):3–19. [Russian].
23. Ashmarin IP, Sosulina LJ, Suhova GS, Kuzmin VS. The ADP-ribose and cADP-ribose like endogenous regulators of the cellular ion balance. The cardiotropic effect of the ADP-ribose. Uspekhi fiziologicheskikh nauk 2006;(1):3–17. [Russian].
24. Skulachev VP, Bogachev AV, Kasparinskij FO. Membrane energy. Moscow: Moscow university press; 2010. [Russian].
25. Gennis R. Biomembranes: molecular structure and function. Moscow: Mir; 1997. [Russian].
26. Laktovich Dzh. Basic principles of the fluorescence spectroscopy. Moscow: Mir; 1986. [Russian].
27. Tyson PA, Steinberg M. Assembly of tryptophan residues in Na⁺, K⁺-ATPase. J Biol Chem 1987; 262(10):4644–48.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.06.2014*

В.І. Хорєвін

Внесок ГАМК-ергічного гальмування в формування вибіркової налаштованості нейронів superior colliculus до реакції на пересування світлової плями з різною швидкістю

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail:vladkh4@gmail.com

Формування вибіркової чутливості до пересування зорових об'єктів навколишнього середовища з різною швидкістю дотепер залишається невирішеною проблемою. Передбачається, що в основі створення такої чутливості можуть бути як процеси гальмування, так і полегшення на різних рівнях зорової системи. В роботі вивчена роль ГАМК-ергічного гальмування в формуванні швидкісної чутливості зорової системи за допомогою іонофорезу антагоніста ГАМК_A-рецепторів бікукуліну на відповіді, які виникали в 80 нейронах superior colliculus (SC) на пересування світлової плями зі швидкістю 5 - 45°/с у хом'яків, наркотизованих уретаном. Після іонофорезу бікукуліну в порівнянні з контролем 30 % одиниць змінили налаштованість до пересування світлової плями з певною швидкістю, 61,25 % нейронів змінили свою вибірку швидкісної чутливості більше ніж на 10 %, у 8,75 % клітин не виявлено подібних змін їх відповідей. Ці результати свідчать про те, що внутрішньоклікулярні ГАМК-ергічні ланцюги беруть участь у формуванні налаштування SC-нейронів до переміщення зорових об'єктів з різними швидкостями.

Ключові слова: superior colliculus; нейрони; ГАМК-ергічне гальмування; швидкісна налаштованість.

ВСТУП

Здатність нейронів різних рівнів зорової системи вибірково реагувати на пересування світлових об'єктів з різною швидкістю докладно описана на прикладі сітківки [1], латерального колінчастого тіла [2], верхніх горбиках (superior colliculus, SC) чотиригорбикового утворення [3, 4]. Така властивість в англomовній літературі визначена як velocity tuning. Незважаючи на значну кількість досліджень, механізми, які забезпечують вибірку чутливості нейронів різних рівнів зорової системи на пересування з різними швидкостями, залишаються нез'ясованими.

SC у хом'яка добре підходить як об'єкт дослідження для вивчення швидкісного налаштування нейронів з кількох причин. По-перше, це утворення середнього мозку

бере участь в аналізі руху зорових об'єктів і відіграє важливу роль в орієнтаційній поведінці [5, 6]. По-друге, у гризунів, поверхневі шари верхніх горбиків отримують прямі входи з сітківки і є однорідними з точки зору специфічності до швидкості пересування зорових об'єктів і більшість клітин цієї підкіркової структури віддають перевагу світловим стимулам, що рухаються з малими швидкостями. По-третє, SC-нейрони однорідні відносно структури рецептивних полів [3].

Вважається, що специфічна чутливість до швидкості пересування об'єкта в полі зору може виникнути як результат певної організації аферентних входів за допомогою надходження інформації через різні аферентні канали [4, 7] або внаслідок взаємодії процесів збудження та гальмування на кожних рівнях зорової

© В.І. Хорєвін

системи [8, 9]. Дослідження попередніх авторів продемонстрували важливість процесів гальмування у створенні швидкісної селективності в зоровій корі [10, 11] і в латеральному колінчастому тілі [12].

Мета нашої роботи – з'ясувати як ГАМК-ергічна передача в SC-нейронах відбивається у зміні їх налаштування до пересування об'єктів в полі зору з різною швидкістю.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на хом'яках масою 130–190 г. Експериментальна процедура виконана відповідно до вимог з догляду і використання лабораторних тварин. Хом'яків наркотизували уретаном (0,7 г/мл; 0,03 мл/кг) в 4-6 внутрішньоперитонеальних ін'єкціях, розділених 20-хвилинним інтервалом. Зіниці розширювали 1 %-м розчином атропіну сульфату. Під час операції голову тварин закріплювали в стереотаксичній позиції за допомогою носових/ротових пластин. Для візуалізації SC трепанували череп та відсмоктували зорову кору з обох боків. Після виконання операції голову хом'яка фіксували під кутом 30° відносно горизонтальної лінії, що завдавало горизонтальну орієнтацію поверхні верхніх горбиків. Стабілізацію ока забезпечували лігатурою, проведеною через медіальний прямий м'яз ока і прив'язаною до рами стереотаксичного пристрою. Для попередження висихання рогової оболонки її покривали контактною лінзою, а мозок зрошували стерильним фізіологічним розчином. Температуру тіла тварини підтримували постійною за допомогою обігрівача. Зорову стимуляцію застосовували до ока, протилежного до місця відведення нейронної активності SC, через домінування прямих контралатеральних входів з сітківки до цієї структури середнього мозку [3].

Ідентифікацію нейронів верхніх горбиків, чутливих до зорової стимуляції, а потім і меж рецептивного поля, визначали в темряві за допомогою кишенькового олівцевого

ліхтарика. Після цього монітор, який використовували в подальшому для зорової стимуляції, розташовували на відстані 40 см перед оком хом'яка таким чином, що центр рецептивного поля нейрона збігався з центром монітора. Чутливість нейронів до руху зорових стимулів з різною швидкістю визначали пересуванням на екрані монітора світлової плями діаметром 2,5° в скронево-назальному напрямку зі швидкістю 5 – 45 °/с.

Кожну послідовність зорових подразників, яка складалася з 9 слідуєчих один за одним пересувань світлової плями зі швидкістю, що збільшувалась від 5 °/с до 45 °/с, повторювали 5 разів. Відповіді SC-нейронів представляли як середню величину кількості потенціалів дії та її похибку ($M \pm SEM$) для кожної швидкості пересування світлової плями. Всю сукупність обстежених клітин в залежності від їх налаштованості до руху об'єкта з різними швидкостям розділили на чотири групи.

Згідно з літературними даними [13], на підставі залежностей кількості потенціалів дії, які генерували нейрони у відповідь на пересування світлової плями з певною швидкістю, більшість клітин верхніх горбиків (рис. 1; а, б, в) визначені як переважно чутливі до низьких швидкостей (ЧНШ-нейрони). Підставою для визначення клітин як ЧНШ-нейронів були такі ознаки: 1) кількість потенціалів дії у відповідях нейронів, тобто величина відповіді, на пересування з мінімальними швидкостями (5 °/с і 10 °/с) була більшою ніж вдвічі від кількості потенціалів дії у відповідях на пересування зорового подразника зі максимальними швидкостями, тобто 40 та 45 °/с; 2) нейронна відповідь постійно зменшувалась при збільшенні швидкості пересування. До групи SC-клітин, переважно чутливих до високих швидкостей пересування (ЧВШ-нейрони), віднесені ті одиниці, відповіді яких на максимальні швидкості пересування були більшими ніж вдвічі за відповіді при пересуванні з мінімальними швидкостями і впродовж кожної послідовності з дев'яти

стимулів кількість імпульсів збільшувалась при збільшенні швидкості руху світлової плями на екрані монітора (див. рис. 1, г). Нейрони верхніх горбиків більше чутливі до проміжних швидкостей, тобто 15 -25 °/с, були визначені як ЧСШ-клітини (див. рис. 1,

д). Відповіді ЧСШ-клітин на такі подразники були вдвічі більшими, ніж відповіді на пересування світлової плями з мінімальними та максимальними, як до цієї роботи, швидкостями. До швидко і нечутливих одиниць (ШНЧ-нейрони) віднесені клітини, відповіді

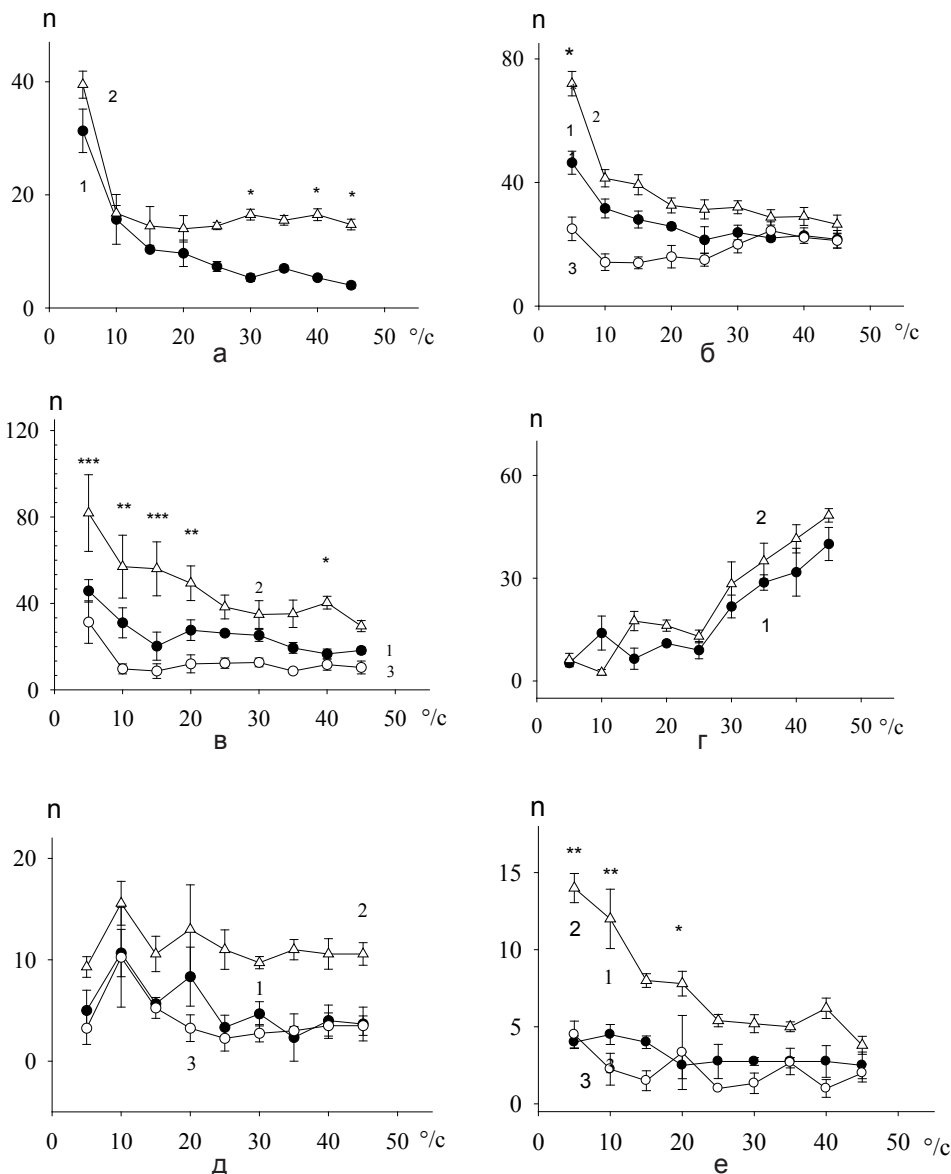


Рис. 1. Вплив іонофорезу бікукуліну-метйодиду(БМІ) на залежність відповіді 6 репрезентативних SC-клітин при різних швидкостях пересування зорового подразника: а, б, в – 3 чутливих до низьких швидкостей нейрони, г – клітина, чутлива до високих швидкостей, д – до середніх швидкостей, е – формування швидкісної налаштованості до низьких швидкостей у нейрона, який не мав преференцій до жодної з швидкостей у вихідному стані. За віссю абсцис – швидкість зорових подразників, за віссю ординат – середні значення кількості імпульсів. 1 – вихідний стан, 2 – те саме при іонофорезі БМІ, 3 – стан відновлення після закінчення іонофорезу БМІ. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) – при парних порівняннях з застосуванням критерію Тьюкі.

яких на мінімальні, проміжні та максимальні швидкості відрізнялись менше ніж вдвічі (див. рис.1, е).

Для визначення внеску ГАМК-ергічного гальмування у налаштованість нейронів верхніх горбиків до пересування світлової плями з певною швидкістю через багатоканальні мікропіпетки з зовнішнім діаметром кінчика 4–10 мкм застосовували іонофоретичну аплікацію речовин, які діяли на ГАМК-рецептори. Один канал, який заповнювали 3 моль/л NaCl, використовували для позаклітинного відведення потенціалів дії SC-нейронів. Інші канали (два або чотири) заповнювали такими свіжими водними розчинами: блокатором ГАМК_A-рецепторів, бікукулін-метйодидом (БМІ), 5–20 ммоль/л в 150 ммоль/л NaCl та ГАМК, 0,2 моль/л в дистильованій воді, а для балансу струмових ефектів - 165ммоль/л NaCl в дистильованій воді. рН всіх розчинів доведено до 3,0 за допомогою 0,1 моль/л HCl. При досягненні стабільного відведення імпульсної активності від SC-нейрона починали іонофоретичну аплікацію. БМІ та ГАМК іонофоретично аплікували як катіони струмами позитивної полярності (ГАМК – +20 - +40нА, БМІ – +60 - +100нА), і протилежність їх ефектів доводила природну дію цих агентів, а не струму. Для запобігання витоку речовин з мікропіпеток до них приклали постійний запірний струм негативної полярності (10 нА). В одному треку аплікацію ГАМК та БМІ застосовували тільки до одного нейрона для запобігання післядії ГАМК-ергічних речовин. Фармакологічну ефективність БМІ як антагоніста ГАМК_A-рецепторів визначали за допомогою титрації [14–16]. Процедуру титрації починали з реєстрації п'яти контрольних відповідей на пересування світлової плями зі швидкостями 5–45 °/с без застосування іонофорезу. Після отримання вихідних даних, які були використані як контрольні, починали аплікацію ГАМК, повільно збільшуючи силу струму іонофорезу до значень 20–30 нА, таким чином, щоб кількість імпульсів у

відповідях нейрона на оптимальну швидкість пересування (в більшості клітин – 5 °/с) зменшилась на 30–50 % відносно контрольного рівня. Після встановлення гальмівного ефекту ГАМК починали сумісну аплікацію ГАМК і БМІ для визначення тривалості і сили струму БМІ, який нейтралізував гальмівну дію ГАМК блокуванням ГАМК_A-рецепторів. Встановлено, що дози БМІ, які нейтралізують гальмівний ефект іонофорезу ГАМК, забезпечувались протягом 5 хв іонофорезу БМІ струмом 60 нА, що збігається з даними інших авторів [15–17]. Ізольована аплікація ГАМК, виконана за 10 хв після закінчення сумісної аплікації, спричиняла чіткий гальмівний ефект. Це свідчило про зворотність дії іонофоретично аплікованої кількості БМІ, що спостерігали в більшості клітин. Після цього проводили ізольовану аплікацію БМІ для блокування ГАМК_A-рецепторів (з тривалістю і силою струму, визначеними в процедурі титрації) для отримання даних щодо внеску гальмування, опосередкованого ГАМК_A-рецепторами, в формування специфічної швидкісної чутливості SC-нейронів. Якщо клітина після аплікації БМІ демонструвала значне збудження, тобто величина відповіді перевищувала в кілька разів контрольний рівень до іонофорезу, то робили перерву в відведенні нейронної активності або закінчували дослід. Відомо, що БМІ збільшує нейронну відповідь, що використовують для визначення внеску гальмування, опосередкованого ГАМК_A-рецепторами [18]. В роботі такий факт був використаний для порівняння результатів, отриманих у контролі, тобто до іонофорезу БМІ, та під час аплікації цієї речовини. Індекс налаштованості нейрона до пересування світлової плями в полі зору з певною швидкістю визначали як відношення відповідей на найкращі, тобто оптимальні, швидкості до відповідей на неоптимальні швидкості в контролі – I(C) і під час іонофорезу БМІ – I(B). Внесок ГАМК-ергічного гальмування I(Гал) визначали як відношення індексів швидкісної налаштованості I(C)

в контролі і під час іонофорезу І(В). Якщо БМІ однаково збільшував величини на оптимальні та неоптимальні швидкості, то $I(\text{Гал})$ приблизно дорівнював 1,0. У разі, коли БМІ більше збільшував відповіді на неоптимальні швидкості, ніж на оптимальні, то $I(\text{Гал}) < 1,0$. Якщо ж нейронні відповіді на оптимальні швидкості під впливом БМІ збільшувалися більше, ніж на неоптимальні, то $I(\text{Гал}) > 1,0$. Для статистичного порівняння результатів імпульсної активності одного нейрона до і впродовж аплікації ГАМК-ергічних речовин використовували двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) з наступним застосуванням критерію Тьюкі для парних порівнянь.

РЕЗУЛЬТАТИ

Імпульсна активність 80 SC-нейронів зареєстрована при позаклітинному відведенні електричних потенціалів до і під час іонофорезу БМІ після проведення процедури титрації. Типовою ознакою дії БМІ було збільшення як нейронних відповідей, так і амплітуди фокального потенціалу, що виникало за 3–5 хв після початку аплікації. Це є свідченням нейтралізації локального ГАМК-ергічного гальмування, на що вказують і інші автори [15, 17].

Більшість досліджених SC-нейронів до використання БМІ (55 з 80 клітин) визначені як ЧНШ-нейрони, вісім клітин мали властивості ЧВШ-одиниць, шість клітин віднесені до ЧСШ-нейронів. Решта 11 одиниць визначені як ШНЧ-нейрони (див. рис. 1).

Після іонофорезу БМІ 11 нейронів втратили свою швидкісну селективність (до іонофорезу БМІ серед них були 6 ЧНШ-клітин, 2 ЧВШ-нейрона і 3 ЧСШ-клітини), 13 одиниць змінили свою швидкісну налаштованість до пересування світлової плями з певною швидкістю (10 одиниць отримали ЧНШ-профіль, одна клітина стала налаштована як ЧСШ-одиниця, 2 нейрони перетворилися в ЧВШ-клітини). Таким чином, у 24 нейронів або 30,0 % від загальної кіль-

кості досліджених одиниць виявлена участь ГАМК-ергічного гальмування у формуванні категорій їх налаштування до пересування світлової плями з певною швидкістю – одного з важливих функціональних призначень верхніх горбиків, які входять до складу нервових структур керування рухами очей. Однак кількість нейронів в кожній з 4 категорій клітин з різною швидкісною налаштованістю після аплікації БМІ вірогідно не відрізнялась (рис. 2) від кількості клітин, які у вихідному стані демонстрували переважну чутливість до низьких, середніх і високих швидкостей пересування або не мали специфічної швидкісної налаштованості (χ^2 тест, $\chi^2 = 3,6381$, $DF = 3$, $P > 0,3$).

Розподіл нейронів в залежності від індивідуальних ефективних швидкостей (тобто швидкості, при якій нейронна відповідь була найбільшою порівняно з іншими швидкостями) пересування подразника, при блокуванні ГАМК-ергічного гальмування БМІ вірогідно (χ^2 тест, $\chi^2 = 29,8775$, $df = 7$, $P < 0,0001$) відрізнявся від розподілу цих самих нейронів між ефективними швидкостями

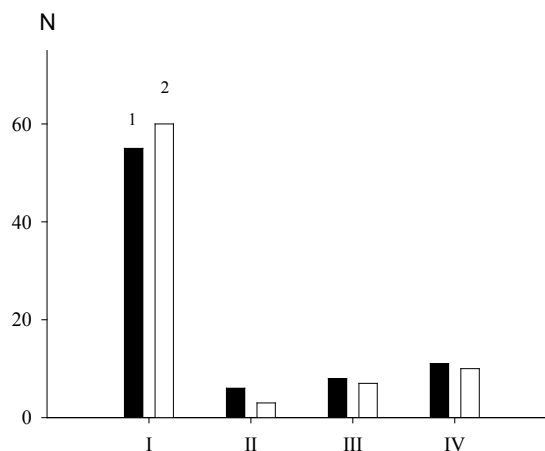


Рис. 2. Відсутність впливу іонофорезу бікукуліну-метйодиду (БМІ) на розподіл SC-нейронів між категоріями клітин, переважно чутливих до низьких (I), середніх (II), високих (III) швидкостей пересування зорових подразників та таких, що не мали вибіркової швидкісної чутливості (IV). За віссю абсцис – категорії колікулярних клітин, за віссю ординат – кількість нейронів. 1 – значення показників всіх нейронів у вихідному стані, 2 – при іонофорезі БМІ

в контролі (рис. 3). Частка клітин, у яких оптимальна швидкість становила 5 °/с, при іонофорезі БМІ складала 79,7 %, тоді як у вихідному стані таких одиниць було 65,2 %. Наведені результати свідчать, що блокування постсинаптичного гальмування, яке опосередковане ГАМК_A-рецепторами, зсуває швидкісну налаштованість SC-нейронів у бік мінімальних швидкостей. Це підтверджується порівнянням нормалізованих даних швидкісної налаштованості всіх досліджених нейронів у вихідному стані та при іонофорезі БМІ (рис. 4). В умовах іонофоретичного блокування ГАМК-ергічного гальмування відповіді всієї сукупності нейронів були достовірно іншими в порівнянні з контролем ($F=(8, 632)=1,9817$, $P=0,04638$), а середня величина нормалізованих відповідей на пересування світлової плями вірогідно відрізнялась від контролю тільки при швидкості 5 °/с (критерій Тьюкі для парних порівнянь, $P=0,000183$).

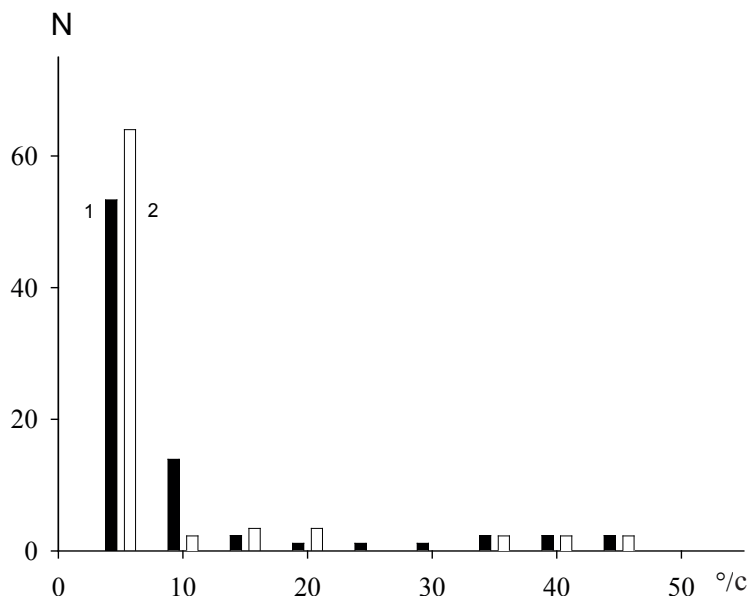


Рис. 3. Зміни у розподілі нейронів верхніх горбиків в залежності від швидкості пересування зорових подразників, при якій відповідь була максимальною, під впливом бікуліну-метйодиду (БМІ) в порівнянні з контролем (χ^2 тест, $P<0,0001$). За віссю абсцис – швидкість зорових подразників; за віссю ординат – кількість одиниць. 1 – значення показників всіх нейронів у вихідному стані, 2 – при іонофорезі БМІ

Блокування ГАМК-ергічного гальмування значно збільшувало відповідь ЧНШ-нейронів, але воно було неоднаковим на різних швидкостях. Під час іонофорезу БМІ швидкісна налаштованість 29 з 55 ЧНШ-одиниць (52,7 % від загальної кількості ЧНШ-клітин) зменшилась, про що свідчить зменшення $I(\text{Гал})$, який характеризує внесок ГАМК-ергічного гальмування в цей процес, на 10 % і більше. Типова клітина цієї групи клітин зображена на рис 1, а. У такого нейрона $I(\text{Гал})$ дорівнював 0,36, що зумовлено достовірно більшими відповідями при неоптимальних для цього ЧНШ-нейрона швидкостях (30, 40 та 45 °/с) в умовах іонофорезу БМІ порівняно з контролем. Для всіх 29 ЧНШ-клітин цієї групи різниця відповідей між вихідним станом і при іонофорезі БМІ, була достовірною ($F=(8, 224)=3,6560$, $P=0,0050$), а внесок ГАМК-ергічного гальмування за $I(\text{Гал})$ був 0,83. Це відбулось через те, що при блокуванні ГАМК-ергічного

гальмування середні величини нейронних відповідей на малих швидкостях збільшились тільки в 3 рази, в той час як кількість потенціалів дії на проміжних і високих швидкостях зростає в 3,5 і 3,8 разів відносно контролю відповідно. Шість з 29 розглянутих ЧНШ-клітин втратили швидкісну селективність при аплікації БМІ.

У 20 або 36,4% усіх ЧНШ-нейронів внаслідок іонофорезу БМІ кількість імпульсів при пересуванні світлової плями з швидкістю 5 °/с зростає більше порівняно з іншими швидкостями, що спричинило більшу налаштованість цих ЧНШ-одиниць до пересування світлової плями з мінімальними швидкостями. $I(\text{Гал})$ для всіх цих 20 нейронів був 1,22 при достовірній різниці їх від-

повідей у контролі та при аплікації БМІ ($F=(8, 152)=33,2560$, $P=0,0000$). Типову клітину цієї групи показано на рис. 1, б, де продемонстровано достовірне збільшення відповідей тільки при мінімальній швидкості в умовах іонофорезу БМІ порівняно з вихідним станом. Внаслідок переважного збільшення таких відповідей порівняно з реакціями на пересування зорових подразників з іншими швидкостями І(Гал) у цієї клітини складав 1,2.

У 6 одиниць або 10,9 % всіх ЧНШ-клітин іонофорез БМІ призводив до достовірної різниці величин відповідей порівняно з контролем ($F=(8, 40)= 2,2783$, $P=0,04114$), хоча вони змінили свою налаштованість менше, ніж 10,0 %, а І(Гал) дорівнював 0,94. У одного з нейронів, який є типовим для цієї групи клітин (див. рис. 1, в), спостерігалися достовірно більші відповіді, які збільшувались майже вдвічі відносно контролю на пересування світлової плями з малими та великими швидкостями. Однак І(Гал) був 0,97, вказуючи, що при блокуванні ГАМК-ергічного гальмування у цієї клітини не з'явилась здатність генерувати розряди переважно на малі швидкості. Таким чином, у невеликої групи ЧНШ-клітин ГАМК-ергічне гальмування майже не впливало на формування їх налаштованості до малих швидкостей пересування зорових подразників, хоча спричиняло значний гальмівний вплив, обмежуючи збудливість.

Різностороннім виявився ефект БМІ на реакції ЧВШ-нейронів, викликаних пересуванням світлової плями з різними швидкостями. Дві одиниці зовсім втратили свою здатність генерувати найбільшу кількість потенціалів дії на великі швидкості пересування зорового подразника (40 і 45 °/с) і перетворились у ШНЧ-клітини.

Швидкісна чутливість інших 6 ЧВШ-клітин змінилась більше ніж на 10 % порівняно з контролем. У двох ЧВШ-нейронів іонофорез БМІ призвів до генерації відносно більшої кількості імпульсів на малі швидкості руху світлової плями, а 4 ЧВШ-клітини збільшили свою специфічну налаштованість за рахунок більших відповідей на пересування з максимальними швидкостями, тоді як відповіді на малі швидкості майже не змінились. Типовий приклад одного з таких нейронів наведений на рис. 1, г. Слід зазначити, що у цієї клітини, а також у всіх ЧВШ-нейронів не було достовірних відмінностей відповідей порівняно з вихідним станом.

Більш однорідним був вплив БМІ на ЧСШ-нейрони. Три з них перетворились у ЧНШ-одиниці через те, що внаслідок блокування ГАМК-ергічного гальмування відповіді на малі швидкості стали більшими вдвічі порівняно з реакціями на великі швидкості. Три ЧСШ-клітини втратили свою швидкісну налаштованість, як це показано

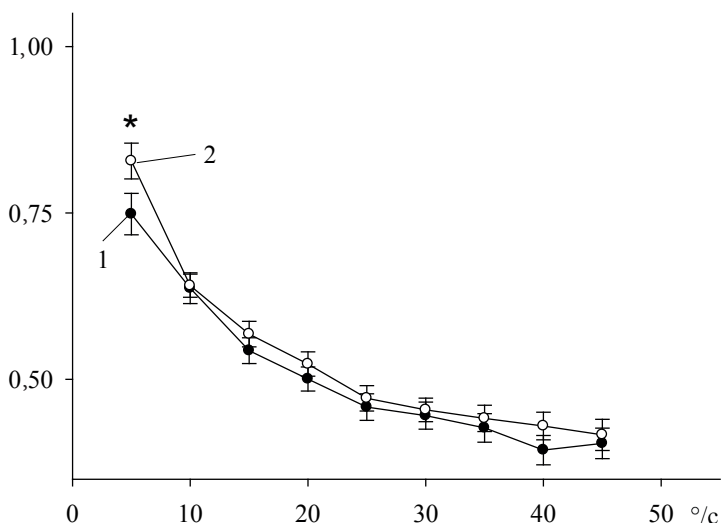


Рис. 4. Вплив іонофорезу бікукулін-метйодиду (БМІ) на чутливість дослідженої популяції SC-клітин до руху з різними швидкостями. За віссю абсцис – швидкість зорових подразників; за віссю ординат – середні значення відповідей всіх нейронів, нормалізованих відносно максимальної реакції кожної клітини серед відповідей на пересування зі швидкістю 5 – 45 °/с. 1 – значення показників у вихідному стані, 2 – при іонофорезі БМІ. (* $P<0,05$) – при парних порівняннях з застосуванням критерію Тьюкі

для однієї з таких одиниць, отримавши профіль ШНЧ-нейрона (див. рис. 1, д). Достовірні відмінності між відповідями порівняно з контролем отримані тільки для перших трьох ЧСШ-нейронів, у яких внесок ГАМК-ергічного гальмування в створенні їх швидкісної чутливості полягав у пригніченні відповідей на малі швидкості руху світлової плями.

10 з 11 ШНЧ-нейронів, які у вихідному стані не демонстрували преференцій в генерації імпульсів на окремі швидкості пересування світлової плями, після іонофорезу БМІ отримали певну швидкісну налаштованість. Сім з них отримали характеристики ЧНШ-нейронів за рахунок переважної генерації потенціалів дії на пересування подразника з малими швидкостями. На рис. 1, е показаний один з таких нейронів, у якого відповіді на малі швидкості пересування світлової плями збільшились відносно контролю в 3 рази, а на середні і великі швидкості – в 1,6 та 1,2 рази відповідно. Два ШНЧ-нейрона після іонофорезу БМІ стали демонструвати профіль ЧВШ-одиниць, а ще одна клітина – профіль ЧСШ-нейрона. Загалом у групі всіх ШНЧ-клітин достовірних відмінностей їх відповідей порівняно з контролем не було.

Таким чином, блокування ГАМК-ергічного гальмування БМІ призвело до змін у здатності багатьох SC-нейронів генерувати специфічні розряди на пересування зорових подразників з певними швидкостями. Це виявилось в тому, що 49 нейронів або 61,25 % всіх досліджених клітин верхніх горбиків змінили швидкісну налаштованість на 10 % і більше; 13,75 % одиниць втратили здатність вибірково реагувати на пересування світлової плями з певною швидкістю, 16,25 % нейронів змінили свою категорію швидкісної налаштованості, 8,75 % одиниць не виявили вказаних змін.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Важлива роль ГАМК-ергічних локальних ланцюгів при обробці інформації була

встановлена у ряді сенсорних систем [12, 16–19, 20]. Ці локальні нервові утворення регулюють тривалість та величину нейронних відповідей і забезпечують формування реакцій на фізіологічно значущі поведінкові подразники [21, 22]. На наш погляд, ГАМК-ергічні ланцюги верхніх горбиків функціонують як дорсальне ядро латерального колінчастого тіла, в якому вони діють на певні групи нейронів цієї структури таламуса, викликаючи різні стани їх збудливості [22]. У природних умовах ГАМК-ергічне гальмування може створювати вибіркочну чутливість у SC-нейронах переналаштуванням нейронних зв'язків, як це передбачається в роботах інших авторів [17, 24]. Після аферентної стимуляції таке гальмування організує ці міжнейронні зв'язки, і ланцюги нейронів верхніх горбиків генерують розряди відповідно до швидкісної специфічності зорового подразника. Іонофоретичне застосування БМІ дало нам можливість знайти внутрішньоклікулярні сенсорні нейрони, які в природних умовах могли бути пригнічені ГАМК-ергічними ланцюгами.

Виникає питання як співвідносяться внутрішньоклікулярні ГАМК-ергічні ланцюги з тими SC-нейронами, на яких закінчуються аференти гангліозних клітин сітківки. Дотепер прийнято, що входи до зорових нейронів середнього мозку формують два різні канали передачі сенсорної інформації W та Y- типів [4, 26]. Нейрони, які відносяться до W-типу, розташовані поверхнево в верхніх шарах, а Y-типу – в глибоких шарах верхніх горбиків. Нейронні ланцюги W-типу утворюють типові синаптичні тріади з релейних клітин і інтернейронів, в яких знайдений кальцій-зв'язувальний білок - калбіндин. Інтернейрони цього каналу містять ГАМК-ергічні пресинаптичні дендрити. Y-канал складається з відносно однорідних нейронів, які містять інший кальцій-зв'язувальний білок – парвальбумін [25]. Встановлено, що нейрони W-каналу

мали низький рівень фонові активності і забезпечували сприйняття пересування зорових об'єктів, переважно з малими швидкостями, та мали значну варіабельність відповідей. Y-канал складається з клітин, які виявляли більш високі рівні фонові активності, генерували стабільні високочастотні групи імпульсів, особливо на рух зорових подразників з високими швидкостями [4]. При вивченні стабільності нейронних розрядів W- та Y-каналів верхніх горбиків з використанням Фано-фактора, який є строго специфічним для всіх природних явищ і характеризує відношення сигналу до шуму, з'ясовано, що цей показник для W-нейронів збільшувався при підвищенні частоти розрядів, а для Y-нейронів – зменшувався [26]. Передбачається, що формування основних категорій SC-нейронів, які найбільш чутливі до певних швидкостей пересування світлової плями, обумовлено різним ступенем перекриття на них входів з W- та Y-каналів: в ЧНШ-клітинах та ШНЧ-нейронах домінують входи з W-каналу, в ЧВШ-одиницях – Y-каналу, в ЧСШ-нейронах представництво W- і Y-каналів приблизно однакове. Внесок ГАМК-ергічного гальмування у створенні специфічної чутливості зазначених категорій нейронів верхніх горбиків до відповідних швидкостей руху зорових об'єктів може реалізуватися кількома шляхами. По-перше, мембранний потенціал всіх SC-нейронів постійно підтримується на рівні близькому, але трохи нижчому, до порога генерації імпульсів, завдяки тонічному впливу розгалуженої системи ГАМК-ергічного гальмування. Це забезпечує високу чутливість сенсорного процесінга на рівні верхніх горбиків через значні величини відношення сигналу до шуму. По-друге, пригнічення ГАМК-ергічною системою одного з каналів (Y-каналу в ЧНШ-нейронах та W-каналу в ЧВШ-нейронах) сприяє формуванню в таких клітинах переважної чутливості до пересування світлової плями з

низьким і високими швидкостями відповідно. Профіль швідкісної чутливості ЧСШ-клітин зумовлений гальмівними впливами різної інтенсивності на W- і Y-канали, що забезпечує переважну чутливість цієї категорії нейронів до середніх швидкостей руху. По-третє, ГАМК-ергічна система через зворотне гальмування контролює нейронні реакції (тривалість, кількість імпульсів). Наші результати про те, що частина SC-одиниць втрачала швідкісну налаштованість або навпаки отримувала таку здатність після блокування ГАМК-ергічного гальмування бікукуліном може свідчити що SC-нейронні мережі не є статичними, а скоріше динамічними. Це припущення збігається з даними літератури, що реорганізація рецептивних ділянок центральних клітин при дії аферентних стимулів супроводжується змінами відносин між нейронами різних структур головного мозку і являє собою динамічний процес, який залежить від зв'язку аферентних стимулів [8, 22]. Передбачається, що моделювальна роль ГАМК-ергічного гальмування у верхніх горбиках пов'язана з нейронними механізмами уваги, тож налаштованість нейронів цієї структури середнього мозку до пересування зорових подразників з певною швидкістю є одним з нейронних корелятивів зорово-моторної поведінки.

Хоревин В.И.

ВКЛАД ГАМК-ЕРГИЧЕСКОГО ТОРМОЖЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ НАСТРОЕННОСТИ НЕЙРОНОВ SUPERIOR COLLICULUS К РЕАКЦИИ НА ПЕРЕМЕЩЕНИЕ СВЕТООВОГО ПЯТНА С РАЗНЫМИ СКОРОСТЯМИ

Формирование избирательной чувствительности к передвижению объектов окружающей среды с разной скоростью до сих пор остается нерешенной проблемой. Предполагается, что в основе создания такой чувствительности могут быть как процессы торможения, так и облегчение на разных уровнях зрительной системы. В работе изучена роль ГАМК-ергического торможения в формировании скоростной чувствительности зрительной

системы путем ионофореза антагониста ГАМК, бикикулина, на ответы, которые возникали в 80 нейронах superior colliculus (SC) на передвижение светового пятна со скоростью 5–45°/с у хомяков, наркотизированных уретаном. После ионофореза бикикулина по сравнению с контролем 30 % единиц изменили категорию своей чувствительности к передвижению светового пятна с определенной скоростью, 61,25 % нейронов изменили свою избирательную скоростную чувствительность более чем на 10 %, в 8,75 % клеток не обнаружено подобных изменений их ответов. Эти данные свидетельствуют о том, что внутриколиккулярные ГАМК-ергические цепочки участвуют в формировании настройки SC-нейронов к перемещению зрительных объектов с разными скоростями. Ключевые слова: superior colliculus, нейроны, ГАМК-ергическое торможение, скоростная настройка

Khorevin V.I.

THE CONTRIBUTION OF GABA-ERGIC INHIBITION TO THE VELOCITY TUNING OF THE SUPERIOR COLLICULUS NEURONS

The formation of selective sensitivity to the movement of the environment at different velocities still remains an unsolved problem. It is assumed that the basis of the creation of such sensitivity can be as processes of inhibition and facilitation at different levels of the visual system. We studied the role of GABA-ergic inhibition in shaping the velocity tuning by affecting GABA antagonist iontophoresis, bicuculline on responses that occur in 80 neurons of the superior colliculus (SC) on the movement of the light spot at 5–45 °/s in hamsters anesthetized by urethane. After the bicuculline iontophoresis compared with the controls 30 % of units have changed the velocity tuning category; 61,25 % of neurons modified their velocity selectivity more than 10 %; 8,75 % of cells were found without similar changes. These data suggest that the intracollicular GABA-ergic chains are involved in the formation of velocity tuning of SC-neurons.

Key words: superior colliculus, neurons, GABA-ergic inhibition, velocity tuning

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Sivyer B, van Wyk M, Vaney DI, Taylor WR. Synaptic inputs and timing underlying the velocity tuning of direction-selective ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol.* 2007 Oct;98(4):2285-96. Epub 2007 Jun 27.
2. Hess R, Wolters W. Responses of single cells in cat's lateral geniculate nucleus and area 17 to the velocity of moving visual stimuli. *Exp Brain Res.* 1979 Jan 15;34(2):273-86.
3. Chalupa LM, Rhoades RW. Responses of visual, somatosensory, and auditory neurones in the golden hamster's superior colliculus. *J Physiol.* 1977 Sep;270(3):595-626.
4. Waleszczyk WJ, Wang C, Burke W, Dreher B. Velocity response profiles of collicular neurons: parallel and convergent visual information channels. *Neuroscience.* 1999;93(3):1063-76.
5. Lomber SG, Payne BR, Cornwell P. Role of the superior colliculus in analyses of space: superficial and intermediate layer contributions to visual orienting, auditory orienting, and visuospatial discriminations during unilateral and bilateral deactivations. *J Comp Neurol.* 2001 Dec 3;441(1):44-57.
6. Tardif E, Delacuisine B, Probst A, Clarke S. Intrinsic connectivity of human superior colliculus. *Exp Brain Res.* 2005 Oct;166(3-4):316-24. Epub 2005 Jul 20.
7. Burke W, Dreher B, Wang C. Selective block of conduction in Y optic nerve fibres: significance for the concept of parallel processing. *Eur J Neurosci.* 1998 Jan;10(1):8-19.
8. Priebe NJ, Ferster D. Direction selectivity of excitation and inhibition in simple cells of the cat primary visual cortex. *Neuron.* 2005 Jan 6;45(1):133-45.
9. Wörgötter F, Koch C. A detailed model of the primary visual pathway in the cat: comparison of afferent excitatory and intracortical inhibitory connection schemes for orientation selectivity. *J Neurosci.* 1991 Jul;11(7):1959-79.
10. Movshon JA. The velocity tuning of single units in cat striate cortex. *J Physiol.* 1975 Aug;249(3):445-68.
11. Patel HH, Sillito AM. Inhibition and velocity tuning in the cat visual cortex [proceedings]. *J Physiol.* 1978 Nov;284:113P-114P.
12. Berardi N, Morrone MC. The role of gamma-aminobutyric acid mediated inhibition in the response properties of cat lateral geniculate nucleus neurones. *J Physiol.* 1984 Dec;357:505-23.
13. Razak KA, Huang L, Pallas SL. NMDA receptor blockade in the superior colliculus increases receptive field size without altering velocity and size tuning. *J Neurophysiol.* 2003 Jul;90(1):110-9. Epub 2003 Jan 15.
14. Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA, McLennan H. Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res.* 1971 Oct 8;33(1):57-73.
15. Sillito AM. The effectiveness of bicuculline as an antagonist of GABA and visually evoked inhibition in the cat's striate cortex. *J Physiol.* 1975 Sep;250(2):287-304.
16. Binns KE, Salt TE. Different roles for GABAA and GABAB receptors in visual processing in the rat superior colliculus. *J Physiol.* 1997 Nov 1;504 (Pt 3):629-39.
17. Shevelev IA, Lazareva NA, Sharaev GA, Novikova RV, Tikhomirov AS. Selective and invariant sensitivity to crosses and corners in cat striate neurons. *Neuroscience.* 1998 Jun;84(3):713-21.
18. Wang Y, Fujita I, Tamura H, Murayama Y. Contribution of GABAergic inhibition to receptive field structures of monkey inferior temporal neurons. *Cereb Cortex.* 2002 Jan;12(1):62-74.
19. Alloway K.D, Burton H. Differential effects of GABA and bicuculline on rapidly- and slowly-adapting neurons in primary somatosensory cortex of primates. *Exp Brain Res.* 1991;85(3):598-610.

20. Foeller E, Vater M, Kössl M. Laminar analysis of inhibition in the gerbil primary auditory cortex. J Assoc Res Otolaryngol. 2001 Sep;2(3):279-96.
21. Serkov FN. Cortical inhibition. – Kiev, Naukova dumka. - 1986. –246p (in Russian).
22. Sillito AM, Grieve KL, Jones HE, Cudeiro J, Davis J. Visual cortical mechanisms detecting focal orientation discontinuities. Nature. 1995 Nov 30;378(6556):492-6.
23. Sanchez-Vives MV, Bal T, McCormick DA. Inhibitory interactions between perigeniculate GABAergic neurons. J Neurosci. 1997 Nov 15;17(22):8894-908.
24. Sillito AM. The contribution of inhibitory mechanisms to the receptive field properties of neurones in the striate cortex of the cat. J Physiol. 1975 Sep;250(2):305-29.
25. Mize RR. Neurochemical microcircuitry underlying visual and oculomotor function in the cat superior colliculus. Prog Brain Res. 1996 112:35–55.
26. Mochol G, Wójcik DK, Wypych M, Wróbel A, Waleszczyk WJ. Variability of visual responses of superior colliculus neurons depends on stimulus velocity. J Neurosci. 2010 Mar 3;30(9):3199-209. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3250-09.2010.
27. Ego-Stengel V, Mello e Souza T, Jacob V, Shulz DE. Spatiotemporal characteristics of neuronal sensory integration in the barrel cortex of the rat. J Neurophysiol. 2005 Mar;93(3):1450-67. Epub 2004 Oct 20.

*Матеріал надійшов
до редакції 11.07.2014*

Н.В. Григорова

Розподіл цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів при введенні речовин, які змінюють функціональний стан кори надниркових залоз і автономної нервової системи

Запорізький національний університет; E-mail: alex_camelotzp@qip.ru

За допомогою біохімічних та цитохімічних методів досліджувався вміст цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів, яким вводили речовини, що змінюють функціональний стан кори надниркових залоз, симпатoadреналової та парасимпатичної нервової систем. Встановлено, що ін'єкції кролям адреналіну, преднізолону та пілокарпіну викликають різноспрямовані зміни в клітинах і позаклітинному просторі. Спостерігалася вірогідне збільшення кількості цинку на 33–42%, магнію – на 33–50%, а також зменшення міді на 25–50% у гранулоцитах крові тварин, яким вводили гормони надниркових залоз. Під впливом холіноміметика в зернистих лейкоцитах кролів суттєво знижувався вміст цинку на 58%, магнію – на 33%, а міді – зростав на 50%. Протилежна картина спостерігалася в сироватці крові. Призначення адреналіну та преднізолону зумовлювало достовірне зниження концентрації цинку на 20–24%, магнію – 22–33%, а міді – підвищення на 36–43%. Після ін'єкції пілокарпіну зменшення вмісту цинку та магнію становило 28 і 33% ($P < 0,01$) відповідно, а міді – збільшення на 43% ($P < 0,001$). Отримані результати вказують також на синергічні взаємини у клітинах цинку та магнію, але антагоністичні – цих металів з міддю.

Ключові слова: адреналін; преднізолон; пілокарпін; цинк; магній; мідь; гранулоцити; сироватка крові.

ВСТУП

Цинк, магній і мідь є життєво важливими елементами, що входять до складу багатьох ферментів, вітамінів, гормонів, дихальних пігментів [1–6]. Відповідно до своїх фізико-хімічних характеристик вони визначають функціональний стан різних процесів, впливають на активність клітин організму, в тому числі гранулоцитів крові [1–4, 6, 7]. Встановлена роль металів у регуляції активності ферментативних систем лейкоцитів, підтриманні стабільності їх цитолем [1–6, 8–10]. У гранулах базофілів і мастоцитів знаходиться цинк, іони якого стабілізують клітинні мембрани та запобігають дегрануляції мастоцитів за рахунок утворення меркап-

тидів з тіоловими групами протеїнів мембран та пригнічення ферментів аденозинтрифосфатази і фосфоліпази A_2 , що контролюються цинком [3, 11]. Показаний гальмівний вплив іонів цинку на активність лізоциму [6, 11]. Вони також пригнічують виділення з клітин глютаміну та лізосомальних ферментів, знижують фагоцитуючу здатність гранулоцитів. При цьому фагоцитарна функція клітин страждає меншою мірою, ніж їх хемотаксис. Доведено, що поглинальна активність фагоцита безпосередньо залежить від кількості в ньому мідьвмісного білка [3, 9]. Цинк у концентрації 10^{-6} – 10^{-4} моль/л сповільнює вивільнення гістаміну з гранулоцитів [3, 6, 11, 12]. На здатність клітин накопичувати та секретувати гістамін впливає і магній

[1–4, 13]. При його недостатності кількість поліморфоядерних і еозинофільних клітин у крові знижується [4, 7].

Враховуючи роль гормонів надниркових залоз (глюкокортикоїдів, катехоламінів) у пригніченні вивільнення лізосомальних ферментів і фагоцитарної активності, а також холінергічних агентів, навпаки, в стимулюванні цих процесів, представляло інтерес визначення кількості металів у клітинах з паралельним дослідженням їх концентрації у позаклітинному просторі при дії цих факторів.

Мета нашої роботи – встановити характер розподілу вмісту цинку, магнію та міді в гранулоцитах і сироватці крові кролів при введенні речовин, які змінюють функціональний стан кори надниркових залоз, симпатoadrenalової і парасимпатичної нервової систем.

МЕТОДИКА

У дослідах було використано 45 статевозрілих кролів віком 5-6 міс, масою 2,2 – 2,6 кг. Тварин поділили на 4 групи. I контрольну групу склали 15 інтактних тварин, до II, III і IV дослідних груп увійшло по 10 тварин. Преднізолон вводили кролям внутрішньом'язово в дозі 10 мг/кг у вигляді 1%-го розчину, адреналіну гідрохлорид і пілокарпін – підшкірно в дозах 0,05 і 1 мг/кг у вигляді 0,01 і 0,1%-х розчинів відповідно. Через 0,5-1 год після ін'єкції пілокарпіну, через 2 год після введення адреналіну та преднізолону у тварин брали з вуха кров для біохімічних та цитохімічних досліджень вмісту цинку, магнію та міді. Цитохімічні методи розроблені в умовах нашої лабораторії та захищені патентами на винахід [14-16].

Концентрацію цинку в сироватці крові визначали колориметричним методом без депротеїнізації стандартним набором реактивів «SPINREACT» (Іспанія), а вміст магнію та міді – фотометричними методами з використанням стандартних наборів реактивів “Lachema” (Чехія) [17-19].

Мазки крові фіксували протягом 5 хв у висхідних парах формаліну. Потім їх занурювали в суміш для забарвлення, де витримували впродовж 3 год при 70°C. Суміш містила 1%-й розчин сульфарсазену, 4%-й розчин ацетату натрію, 25%-й розчин гідроксиду амонію. Після цього препарати промивали протягом 1 хв дистильованою водою та заливали в желатин. Мазки розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах кількість цинку визначали в гранулах зернистих лейкоцитів за помаранчевим забарвленням.

Вміст магнію в гранулоцитах крові встановлювали за допомогою магнезонової реакції. Мазки крові, попередньо фіксовані в формаліні, фарбували протягом 12 год у суміші, що складалася з 1%-го розчину магнезону, 10%-го розчину ацетату натрію, 0,25%-вого розчину гідроксиду амонію та дистильованої води. Потім їх промивали дистильованою водою протягом 5 хв. Мазки вивчали під світловим мікроскопом з використанням імерсійної олії. На препаратах у цитоплазмі гранулоцитів виявлялась червона зернистість.

Для визначення вмісту міді в гранулоцитах крові за допомогою реакції дитіооксаміду (ДТО), фіксовані в формаліні мазки фарбували розчином цього реагента (суміш насиченого спиртового розчину рубеанової кислоти, 2%-го розчину ацетату натрію та 25%-го розчину гідроксиду амонію) протягом 3 год при 70°C. Потім мазки промивали дистильованою водою впродовж 5 хв, підсушували на повітрі, заливали в гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом. На препаратах у цитоплазмі гранулоцитів виявлялась темно-зелена зернистість.

Інтенсивність цитохімічних реакцій (дитизону, магнезону та ДТО) оцінювали за трибальною системою, запропонованою Соколовським, Хейхоу та Квагліно [20, 21]. За один бал приймали слабопозитивну реакцію, два бали – помірну, три бали – виражену реакцію. На підставі підрахунку на 100 клітинах виводили середнє значення інтенсивності реакції.

Експериментальні результати оброблялися з використанням критерію *t* Ст'юдента, що пояснюється нормальним характером розподілу варіант у вибірках (критерій Колмогорова-Смірнова, Statistica 6.0). На всіх етапах експерименту дотримувалися вимог «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що після ін'єкції адреналіну вміст цинку достовірно підвищувався в гранулоцитах на 42% і знижувався в сироватці крові на 24%. Подібна картина спостерігалась у разі введення преднізолону. При цьому показники були відповідно на 33% ($P<0,001$) вище і на 20% ($P<0,05$) нижче від контролю. Протилежні зміни розвивались під впливом пілокарпіну. Вміст металу зменшувався на 58% ($P<0,001$) у зернистих лейкоцитах і збільшувався на 28% ($P<0,01$) у сироватці крові (табл.1).

У тварин, які отримали адреналін, вміст магнію в гранулоцитах крові підвищувався на 50% ($P<0,001$), а в сироватці знижувався на 33% ($P<0,01$). Під впливом преднізолону цей показник зростав у зернистих лейкоцитах на 33%, але знижувався в сироватці крові на 22% ($P<0,01$). Після введення пілокарпіну вміст магнію зменшувався на 33% ($P<0,001$) у клітинах і збільшувався на 33% ($P<0,01$) у

сироватці крові (табл.2).

Таким чином, ін'єкції адреналіну та преднізолону викликали накопичення цинку та магнію в гранулоцитах крові за рахунок його втрати сироваткою. У разі введення пілокарпіну вміст металів знижувався в зернистих лейкоцитах і підвищувався в сироватці крові. У всіх випадках встановлена негативна кореляція змін вмісту цинку та магнію в гранулоцитах і сироватці крові.

У тварин під впливом адреналіну зменшувався вміст міді в гранулоцитах крові на 50% ($P<0,001$) та збільшувався на 43% ($P<0,05$) у сироватці крові. Після ін'єкції преднізолону встановлено вірогідне зниження цього показника в зернистих лейкоцитах на 25%, підвищення – в сироватці крові на 36%. Призначення пілокарпіну викликало зростання вмісту міді в гранулоцитах на 50% і зменшення в сироватці крові на 43% ($P<0,001$; табл.3).

Таким чином, під впливом адреналіну та преднізолону зменшувався вміст міді в зернистих лейкоцитах і збільшувався в сироватці крові. Протилежні зміни розвивались після введення пілокарпіну. У всіх випадках встановлена негативна кореляція змін цього показника в гранулоцитах і сироватці крові.

Згідно з літературними даними, важлива роль у розподілі цинку в клітинах і позаклітинному просторі належить металотіонеїнам (MT) – низькомолекулярним

Таблиця 1. Вміст цинку в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема досліджу	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, мкмоль/л	r_1
Контроль (n=15)	1,2±0,08	25±1,2	-0,41*
Дослід (n=10)			
адреналін	1,7±0,12***	19±2,3**	-0,43*
преднізолон	1,6±0,10***	20±1,19*	-0,42*
пілокарпін	0,5±0,03***	32±2,4**	-0,41*

Примітка. Тут і в табл.2 і 3: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ порівняно з контролем; r_1 – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку в гранулоцитах і сироватці крові; r_2 – коефіцієнт кореляції змін вмісту магнію в гранулоцитах і сироватці крові; r_3 – коефіцієнт кореляції змін вмісту міді в гранулоцитах і сироватці крові.

Таблиця 2. Вміст магнію в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема досліджу	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, ммоль/л	r_2
Контроль (n=15)	0,6±0,04	0,9±0,07	-0,64*
Дослід (n=10)			
адреналін	0,9±0,05***	0,6±0,04**	-0,69**
преднізолон	0,8±0,06**	0,7±0,03*	-0,82***
пілокарпін	0,4±0,02***	1,2±0,08**	-0,48*

цитозольним білкам (близько 6,5 кДа), збагаченим тіоловими групами. Обмін цинку та МТ у клітинах тісно пов'язаний. МТ – головний цинкзв'язуючий білок, а цинк – його фізіологічний індуктор [19, 20]. Крім цинку синтез цього білка індукуює мідь, але перший – активніший, а друга утворює більш стійкі комплекси з МТ [13, 22]. Cu-МТ – форма МТ в організмі, що посідає друге місце після Zn-МТ. МТ зв'язують іони міді, беруть участь разом з церулоплазміном у транспорті, розподілі та реалізації її біологічних ефектів [9, 22, 23]. Подібно до цинку, мідь збільшує антиоксидантну та антиокисну активність МТ [3, 5, 6, 22, 24]. Відомо, що глюкокортикоїди та інші стресорні гормони індукують експресію та синтез МТ, що викликає зниження концентрації цинку в плазмі крові. Одночасно (в складі церулоплазміну) підвищується вміст міді [22, 23, 25]. Це підтверджується результатами наших експериментів по визначенню вмісту цинку та міді в сироватці крові кролів. Наші попередні дослід-

ження вказують на накопичення цинку та магнію, зниження вмісту міді в гранулоцитах крові тварин інших видів, яким вводили адреналін і преднізолон. Протилежний характер змін металів у клітинах встановлений у разі введення пілокарпіну [26 - 28]. Вважають, що вивільнення цинку з клітини зумовлено розпадом його внутрішньоклітинних лігандів, зокрема МТ [22, 29].

Зіставлення результатів визначення вмісту цинку, магнію та міді в зернистих лейкоцитах і сироватці крові кролів дає змогу стверджувати, що адреналін, преднізолон і пілокарпін викликали протилежні зміни в клітинах крові і позаклітинному просторі, причому між цинком і магнієм спостерігався синергічний характер взаємин, а цими металами та міддю – антагоністичний.

ВИСНОВКИ

Уведення кролям гормонів надниркових залоз (адреналіну, преднізолону), які активують

Таблиця 3. Вміст міді в гранулоцитах і сироватці крові ($M \pm m$) і їх взаємозв'язок (r) при введенні кролям адреналіну, преднізолону, пілокарпіну

Схема досліджу	Гранулоцити, ум.од.	Сироватка, мкмоль/л	r_3
Контроль (n=15)	0,4±0,03	14±1,3	-0,42*
Дослід (n=10)			
адреналін	0,2±0,01***	20±2,4*	-0,41*
преднізолон	0,3±0,02*	19±1,7*	-0,44*
пілокарпін	0,6±0,04***	8±0,5***	-0,47*

стан їх кори та симпатoadреналової системи, викликало накопичення цинку та магнію в гранулоцитах і зниження в сироватці крові.

Призначення пілокарпіну, що пригнічує стан кори надниркових залоз і симпатoadреналової системи й активує парасимпатичну нервову систему, зумовлювало збільшення вмісту цинку та магнію в сироватці крові, а також їх дефіцит у зернистих лейкоцитах.

Кількість міді в гранулоцитах крові кролів зростала після ін'єкції пілокарпіну та знижувалась після введення адреналіну та преднізолону; у сироватці дослідних тварин зміни цього показника мали протилежний характер.

Н.В. Григорова

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА, МАГНИЯ И МЕДИ В ГРАНУЛОЦИТАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВЕЩЕСТВ, КОТОРЫЕ ИЗМЕНЯЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРЫ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ И АВТОНОМНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С помощью биохимических и цитохимических методов исследовалось содержание цинка, магния и меди в гранулоцитах и сыворотке крови кроликов, которым вводили вещества, изменяющие функциональное состояние коры надпочечных желез, симпатoadреналовой и парасимпатической нервной систем.

Установлено, что инъекции кроликам адреналина, преднизолон и пилокарпина вызывают разнонаправленные изменения в клетках и внеклеточном пространстве. Наблюдалось достоверное увеличение количества цинка на 33 - 42%, магния – на 33-50%, а также уменьшение меди на 25-50% в гранулоцитах крови животных, которым вводили гормоны надпочечников. Под влиянием холиномиметика в зернистых лейкоцитах кроликов существенно снижалось содержание цинка на 58%, магния – на 33%, а меди – повышалось на 50%. Противоположная картина наблюдалась в сыворотке крови. Назначение адреналина и преднизолон обуславливало достоверное снижение концентрации цинка на 20-24%, магния – 22-30%, а меди – повышение на 36-43%. После инъекции пилокарпина уменьшение содержания цинка и магния составляло 28 и 33 % ($P<0,01$) соответственно, а меди – увеличение на 43% ($P<0,001$). Полученные результаты также указывают на синергические взаимоотношения в клетках цинка и магния, а также антагонистические - этих металлов с медью. Ключевые слова: адреналин, преднизолон, пилокарпин, цинк, магний, медь, гранулоциты, сыворотка крови.

N.V. Grigorova

ALLOCATION OF ZINC, MAGNESIUM AND COPPER IN GRANULOCYTES AND SERUM OF RABBITS WHILE INTRODUCTION OF SUBSTANCES THAT CHANGE THE FUNCTIONAL STATE OF ADRENAL CORTEX AND THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM

It was investigate the content of zinc, magnesium and copper in granulocytes and blood serum of the rabbits, that were injected with substances, that change the functional state of adrenal cortex, sympathetic-adrenal and parasympathetic nervous systems. It has been found that adrenaline, prednisolone and pilocarpine caused the multidirectional changes of these metals content in cells and in extracellular space. In this significant increase of zinc concentration by 33 - 42%, magnesium – by 33 - 50%, and also decrease of copper content by 25–50% was observed in granulocytes of animals after adrenal hormones injections. Under the influence of cholinomimetics content of zinc and magnesium were essential decreased in granulocytes of the rabbits, by 58% and by 33% respectively, and content of copper was risen by 43% ($P<0,001$).

The opposite pattern was observed in serum. Adrenaline and prednisolone prescription caused a significant decrease of zinc concentration by 20–24%, magnesium – by 22–33%, and increase of copper content by 36–43%. Pilocarpine injection caused a decrease of zinc and magnesium content by 28 and 33 % ($P<0,01$) respectively, and an increase of copper concentration by 43% ($P<0,001$). The obtained results also indicate a synergistic relationship between zinc and magnesium in cells, but antagonistic - these metals with copper.

Key words: adrenaline; prednisolone; pilocarpine; zinc; magnesium; copper; granulocytes; blood serum.

Zaporizhzhya National University

REFERENCES

1. Skalniy AV. Chemical elements in human physiology and ecology. Moscow: Onyx - 21 vek: Mir; 2004. [Russian].
2. Chmylenko FO, Chmylenko TS, Sapa YS, Sayevych OV. Chemical elements and substances in the human body in health and in disease. Dnepropetrovsk: Publishing of Dnepropetrovsk University; 2006. [Ukrainian].
3. Haase H, Maret W. Cellular and molecular Biology of metals. CRC Press. 2010; 10 (5): 181-212.
4. Laires MJ, Monteiro CP, Bicho V. Role cellular magnesium in health and human disease. Front Biosci. 2004; 9: 262-76.
5. Shin SJ, Lee HS, Kwon ST. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase. Plant Physiol Biochem. 2005; 43(1): 55-60.
6. Tudor R, Zaleski PD, Ratnaik RN. Zinc in health and chronic disease. J Nutr Health Aging. 2005; 9(1): 45-51.
7. Marushko YV, Marushko TV, Grischak TV. The role of magnesium deficiency in pediatric. Sovr pediatriya. 2009;

- 25(3): 41-5. [Ukrainian].
8. Freitas M, Porto G, Lima JL. Zinc activates neutrophils' oxidative burst. *Biometals*. 2010; 23(1): 31-41.
9. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*. 2003; 32(1): 43-54.
10. Uchida T, Itoh H, Nakamura Y. Zinc and magnesium ions synergistically inhibit superoxide generation by cultured human neutrophils a promising candidate formulation for amniocentesis fluid. *J Reprod Immunol*. 2010; 85(2): 209-13.
11. Wellinghausen N, Rink L. The significance of zinc for leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 1998; 64(5): 571-7.
12. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2007; 28: 1-4.
13. Mooren FC, Golf SW, Völker K. Effect of magnesium on granulocyte function and on the exercise induced inflammatory response. *Magnes Res*. 2003; 16(1): 49-58.
14. Grigorova NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of magnesium definition in blood granulocytes. Patent 27576 Ukrainian 200706133. 2007 12 november.
15. Grigorova NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of copper definition in blood granulocytes. Patent 25158 Ukrainian 200613382. 2007 10 may.
16. Grigorova NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA, inventors; Zaporizhzhya National University, successor of right. Method of zinc definition in blood granulocytes. Patent 30461 Ukrainian 200712551. 2008 25 february.
17. Makino T, Saito M, Horiguchi D. Definition of zinc in blood. *Clinica Chimica Acta*. 1982; 120: 127-35.
18. Menshikov VV, Deliktorskaya LN, Zolotnitskaya RL. Laboratory investigations methods in clinica. Moscow: Medicina; 1983. [Russian].
19. Thomas T. Clinical laboratory diagnosis. Frankfurt: Verlagsgesellschaft; 1998.
20. Sokolovskiy VV. Histochemical investigations in toxicology. Leningrad: Medicina; 1971. [Russian].
21. Hayhoe F, Quaglino D. Haematological cytochemistry. Moscow: Medicina; 1983. [Russian].
22. Baraboy VA, Petrina LG. Metallothioneins: structure and action mechanisms. *Ukr Biochem J*. 2003; 5(4): 28-35. [Ukrainian].
23. Maret W. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877(28): 3378-83.
24. Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp Gerontol*. 2008; 43: 363-9.
25. Barashkov GK, Zaitzeva LI, Kondahchan MA, Konstantinova EA. Distribution of chemical elements in whole blood and plasma. *Biomed Chemistry*. 2011; 3(2): 9-14. [Ukrainian].
26. Grigorova NV, Eshchenko YV, Karpov AK. Zinc content in blood granulocytes and B-insulocytes people and animals, other species under adrenaline, prednisolone and pilocarpine introduction. *Visnik Zaporizh Nat Univer. Biolog Science*. 2009; 1: 89-92. [Ukrainian].
27. Eshchenko VA, Grigorova NV, Nizhnyak EA. Zinc and magnesium in neutrophils animals during the action of adrenaline, prednisolone and pilocarpine. *Vital Question Biol, Ecol and Chemist*. 2011; 3(2): 9-14. [Ukrainian].
28. Grigorova NV. Comparative investigations contents of copper in blood granulocytes and zinc in B-insulocytes. The Materials IV Intern Scientific Praktic Conference "Dinamic of Investigations". 2008; 22: 71-2. [Ukrainian].
29. Zorin SN. Experimental characteristic by essential microelements of organic complexes (zinc and selen). *Microelem in Med*. 2008; 9(1, 2): 16-7. [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 04.09.2014*

Л.М. Лісуха, В.Я. Березовський

Вплив нормобаричної гіпоксії на зорово-моторну реакцію дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях

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

Досліджено вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на латентний період складної зорово-моторної реакції в умовах вибору у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій. Оцінювали також показники тривожності за тестом Спілберга – Ханіна. Обстежено 48 дітей віком від 6 до 17 років. Дітей поділено на дві групи: I група – 6-11 років, II група – 12-17 років. Показано, що після курсу сеансів нормобаричної гіпоксії (12 % O_2 в азоті) вірогідно зменшується латентний період складної зорово-моторної реакції вибору одного із трьох кольорів (PB_{1-3}) – на 23 % та складної зорово-моторної реакції вибору двох із трьох кольорів (PB_{2-3}) – на 27 %. Виявлено, що латентний період PB_{1-3} триває довше, ніж PB_{2-3} . У хлопчиків в обох випадках відмічали тенденцію до більш швидкого реагування, ніж у дівчаток. Встановлено, що після сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії особистісна тривожність в обох групах дітей вірогідно зменшилася на 20 та 23 % відповідно.

Ключові слова: переривчаста нормобарична гіпоксія, складна зорово-моторна реакція, центральна нервова система, діти з радіоактивно забруднених територій.

ВСТУП

Переривчаста нормобарична гіпоксія (ПНГ) саногенного рівня, підвищує неспецифічну резистентність організму [1, 2]. Відомо, що збудливість центральної нервової системи (ЦНС) залежить від парціального тиску кисню в навколишньому середовищі [3, 4].

Вивчення часу латентного періоду (ЛП) складної зорово-моторної реакції (СЗМР) при адаптації організму дорослої людини до гіпоксії характеризує динаміку реакцій ЦНС. ЛП показує скільки часу потрібно клітинам нервової системи щоб перейти у стан збудження або гальмування. У цей період входить: а) час збудливості рецептора (фотохімічне перетворення світлової енергії в нервовий імпульс); б) проведення нервового імпульсу по зоровому нерву; в) синаптична затримка у ЦНС; г) проведення нервового імпульсу по руховому моторному волокну;

© Л.М. Лісуха, В.Я. Березовський

д) збудливість і скорочення м'яза.

Відомо, що час сенсомоторної реакції вибору (РВ) істотно довший, ніж простої зорово-моторної реакції. Для розрізнення близьких кольорів (червоного та жовтого) потрібно більше часу, ніж для віддалених (червоного і зеленого). Час простої реакції не може бути нижче від певної фізіологічної межі, або «нескорочуваного» мінімуму і становить 100 мс [5]. Раніше проведені у нашому відділі дослідження показали, що після курсу сеансів ПНГ скорочується ЛП СЗМР і підвищується рухливість нервових процесів. Все це було досліджено у дорослих [6, 7]. У літературних джерелах ми не знайшли даних щодо впливу нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на ЛП СЗМР вибору у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях.

Формування поведінкових реакцій зале-

жить від активності нервових елементів сенсорних і рухових систем мозку, тобто сенсорномоторної координації. Оскільки на розвиток моторики (сила, швидкість, виносливисть), діяльність вегетативної нервової системи впливають фактори як екзогенного, так і ендогенного середовища, тому вони краще піддаються регуляції при цілеспрямованому впливі на дитячий організм.

Мета нашої роботи – вивчення впливу переривчастої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на стан ЦНС за показниками тривалості ЛП СЗМР у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях.

МЕТОДИКА

Обстежено 48 дітей віком від 6 до 17 років, яких було поділено на дві групи залежно від віку: до I групи – 6–11 років увійшли 25 осіб, до II – 12–17 років – 23 особи які проживають у 2-й, 3-й та 4-й зоні за радіоактивним забрудненням [8]. Діти знаходилися на стаціонарному обстеженні в клініці ДУ «Національного наукового центру радіаційної медицини НАМН України». Дослідження функціональної рухливості нервової системи оцінювали за методикою Хільченко, модифікованою Макаренком, та приладу ПНН 3–01 [9]. Визначали: ЛП (СЗМР) вибору одного із трьох (РВ₁₋₃) сигналів на світлові подразники – червоний колір (права рука); ЛП СЗМР двох із трьох сигналів (РВ₂₋₃) – червоний та зелений кольори (права рука, ліва рука). Дослідження ЛП РВ₁₋₃ та ЛП РВ₂₋₃ проводили в одному режимі (режим 1) [10, 11]. Перед реєструванням показників дітям проводили одне тренування.

Психоемоційний і вегетативний стан вивчали за допомогою тесту Спілбега – Ханіна [12] та оцінювали реактивну і особистісну тривожність, де кількість балів до 30 відповідає низькій тривожності, до 45 – помірній, 46 і більше – наявній. Нами також застосовано «Дитячий опитувальник неврозів» Седнева [13] з оцінкою шкал

«астенії» та «тривожності», де кількість балів в межах 1–10 – норма, 11–15 – підвищений ризик, 16–20 – наявні невротичні порушення.

Діти отримували курс сеансів ПНГ. Для цього застосовували нормобаричну газову гіпоксичну суміш, що складалася із 12 % кисню і 88 % азоту. Сеанси ПНГ проводили один раз на добу та підбирали індивідуально для кожної дитини. В основному використовували базовий курс: три цикли дихання гіпоксичною газовою сумішшю у проміжках між якими пацієнт дихав атмосферним повітрям. Період деоксигенації тривав 15–20 хв, а період реоксигенації 7–10 хв. Курс лікування в середньому становив від 7 до 10 сеансів. ПНГ проводили за допомогою індивідуального апарата гірського повітря типу «Борей» виробництва наукового медико-інженерного центру «НОРТ» НАН України, м. Київ. Принцип його дії полягає в сепарації складових атмосферного повітря (O₂ та N₂) за допомогою молекулярних сит. Струмінь повітря створювали медичним компресором УК–40 (виробництва – Київського заводу «Медапаратура»). Суміш подавали під прозорий шолом (блістер).

Для визначення індивідуальної чутливості до гіпоксії перед початком лікування проводили пробний сеанс дихання гіпоксичною газовою сумішшю. Вимірювали частоту серцевих скорочень, артеріальний тиск, частоту дихання та враховували загальне самопочуття. Контрольні вимірювання здійснювали до та після кожного сеансу. Парціальний тиск кисню (Р_{О₂}) газової суміші на I сеансі становив 106 мм рт. ст. У II та III сеансах Р_{О₂} знижували ступінчасто так, що IV і наступні сеанси відбувалися за рівня Р_{О₂} 76–72 мм рт. ст. Тривалість пробного сеансу становила 15 хв. Його оцінювали за ступінчастою шкалою, після чого підбирали індивідуальні режими проведення ПНГ [4].

Обстеження проведено з дотриманням національних норм біоетики та положень Гельсінської декларації (у редакції 2013 р.)

за письмовою згодою батьків хворих дітей після докладного інформування про цілі, тривалість та процедуру дослідження.

Статистичну обробку проводили з використанням методів параметричної статистики, програми «Microsoft Excel» та програмного забезпечення «Origin Pro 7,5». Розраховували середні значення показників (M), їх стандартну похибку (m). Вірогідність відмінностей для вибірок, після перевірки на нормальність розподілу визначали за критерієм t Стюдента. Статистично значущими вважалися відмінності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що до сеансів ПНГ вихідний рівень ЛП СЗМР PB_{1-3} був $412,0 \pm 11,0$ мс, PB_{2-3} – $492,2 \pm 15,1$ мс. Після сеансів ці значення вірогідно зменшилися. ЛП PB_{1-3} у всіх обстежених дітей скоротився на 23 %, а ЛП PB_{2-3} – на 27 %. Різниця обстежуваних I і II груп статистично значуща. У I групі дітей ЛП PB_{1-3} , в середньому, скоротився на 25 %, а у II групі – на 21 %. При цьому PB_{2-3} у I групі скоротився на 27%, у II групі – на 27,4% (рис. 1).

Таким чином, проведення курсу сеансів ПНГ змінює стан ЦНС, що проявляється у вірогідному скороченні ЛП СЗМР.

Згідно з літературними даними, ЛП PB_{2-3} вважають інформативним критерієм

оцінки функціональної рухливості нервових процесів (працездатності головного мозку) [14]. Подовження ЛП СЗМР, збільшення значення при повторних обстеженнях деякі автори розглядають як ознаки погіршення функціонального стану ЦНС [15-17].

Раніше проведені дослідження відносно ступеня дії гіпоксії показали, що зі зниженням парціального тиску кисню може бути тимчасове різке поліпшення функціональної рухливості нервових процесів. Цей феномен супроводжується підвищенням уважності та показників умовно-рефлекторної діяльності. Наступна фаза – послаблення функціональної рухливості нервових процесів, навпаки, супроводжується зниженням розумової працездатності. Відносно тривалості ЛП СЗМР на дію сеансів ПНГ зареєстровано скорочення ЛП [6, 7, 18]. У дітей, що мешкають на радіоактивно забруднених територіях, після сеансів ПНГ також реєстрували скорочення тривалості ЛП СЗМР як в умовах PB_{1-3} так і PB_{2-3} .

В наших дослідженнях перед проведенням сеансів ПНГ у дітей I групи вихідний рівень PB_{1-3} становив $448,5 \pm 16,0$ мс, а PB_{2-3} – $548,0 \pm 20,3$ мс. У дітей II групи вихідний рівень PB_{1-3} був – $372,2 \pm 10,0$ мс, а PB_{2-3} – $431,6 \pm 14,4$ мс. Після сеансів PB_{1-3} та PB_{2-3} вірогідно скоротився в обох групах. При цьому латентний період PB_{2-3} займав більше часу, ніж PB_{1-3} . Різниця між PB_{1-3}

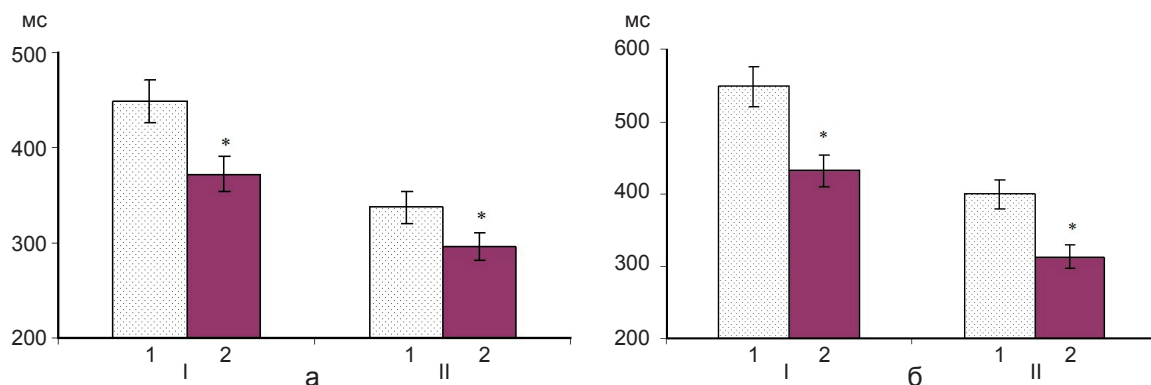


Рис.1. Зміна тривалості латентного періоду складної зорово-моторної реакції вибору одного із трьох кольорів (а) та двох із трьох кольорів (б) у дітей до(1) та після (2) сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії: I – діти віком від 6 до 11 років ($n=25$); II – від 12 до 17 років ($n=23$). * $P < 0,05$

і PB_{2-3} у I групі дітей становила 62,2 мс, а у II групі дітей – 17,4 мс. У дітей II групи відмічається більш короткий ЛП на PB_{1-3} і PB_{2-3} . Це збігається з літературними даними про психофізіологічні показники дітей старшого віку [15, 19]. Анатомо-фізіологічні особливості дітей молодшого шкільного віку характеризуються процесами морфофункціонального розвитку ЦНС. У цих дітей низький рівень мієлінізації волокон, довший час синаптичних переключень [20].

Вихідні значення ЛП PB_{2-3} у дівчаток в обох групах був вищим, ніж PB_{1-3} . Після сеансів ПНГ зареєстровано вірогідне зниження середніх показників ЛП в обох групах (рис. 2).

У дівчаток II групи середні показники ЛП PB_{1-3} і PB_{2-3} після сеансів ПНГ були нижчими, ніж у дівчаток I групи, тобто збільшення віку забезпечує більш швидке реагування (див. рис. 2, а). У хлопчиків середні значення ЛП PB_{1-3} після сеансів ПНГ теж скорочувалися відносно PB_{2-3} (рис. 2, б). При цьому у хлопців II групи ЛП PB_{1-3} і PB_{2-3} були меншими, ніж у хлопців I групи. Таким чином у дітей у віці 12–17 років зорово-моторна реакція вибору після сеансів ПНГ прискорюється. Зіставлення середніх показників ЛП PB_{1-3} та PB_{2-3} у групі між дівчатами та хлопцями показало вірогідне зниження. Більш швидка реакція правою верхньою кінцівкою відмічалася у хлопчиків.

Відомо, що втома призводить до зменшення швидкості простої реакції і збільшення швидкості складної – даний феномен відомий як комплекс швидкості і точності. ЛП залежить від індивідуальних особливостей організму, віку дитини, стану вегетативної нервової системи, модальності подразника, різних зовнішніх умов, наявності захворювань, дії фармакологічних препаратів тощо [21, 22]. Зміна стану ЦНС є суттєвою у розвитку вегетативних, соматичних і психічних порушень. Дослідження останніх років показали, що у осіб – носіїв різного поліморфізму генів 5HTT, DRD2, COMT найбільша велика швидкість простої зорово-моторної реакції і реакції вибору спостерігається при високій концентрації серотоніну і низькій – дофаміну [23–26]. Скорочення ЛП СЗМР у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях, може свідчити про певну стимуляцію реактивності ЦНС після впливу нормобаричної гіпоксії саногенного рівня.

Результати опитування за тестом Спілберга – Ханіна показали, що до сеансів дихання ПНГ високий рівень реактивної тривожності спостерігали у 40 %, а особистісної – 50 % дітей. Тривожність свідчить про наявність певного постстресорного стану в умовах хронічної дії радіоактивного забруднення, що негативно впливає на

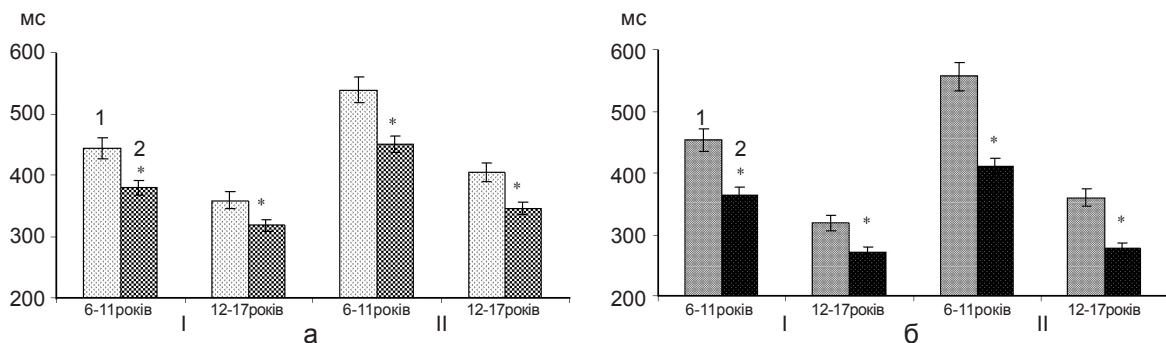


Рис. 2. Зміна тривалості латентного періоду складної зорово-моторної реакції вибору на один із двох кольорів (I) та двох із трьох кольорів (II) у дівчаток у віці від 6 до 11 (n=12) та від 12 до 17 років (n=12), до (1) та після (2) сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) (а). Зміна тривалості латентного періоду складної зорово-моторної реакції вибору на один із трьох кольорів (I) та двох із трьох кольорів у хлопців у віці від 6 до 11 років (n=13) та від 12 до 17 років (n=11) до (I) та після (II) сеансів ПНГ (б). *P<0,05

зорово-моторну реакцію [27-29]. Реактивна та особистісна тривожність є суб'єктивним проявом, але вони можуть свідчити про недостатню емоційну пристосованість. У дітей молодшого віку – про незрілість психоемоційної сфери. При цьому діяльність в умовах високої тривожності може переходити в пошукову активність факторів потенційної загрози та захисту від них. У дітей це може проявлятися контролем над ситуацією, що породжує напруження, збудливість, дратівливість. А тому «натискати на кнопку» відходить на другий план. При цьому будь-яка нова інформація оцінюється як важлива, зменшується обсяг її сенсорного потоку, що і призводить до збільшення часу реакції на заданий стимул. Подовження ЛП зорово-моторної реакції може свідчити про зміну реактивності ЦНС [30, 31].

Після курсу сеансів ПНГ середні значення реактивної тривожності знизилися на 15 %, а особистісної – на 21,5 %. При розподілі дітей за віком відмічали тенденцію до зниження

реактивної тривожності (рис. 3) та вірогідне зниження особистісної (рис. 4).

Відомо, що на локальне кровопостачання головного мозку впливає ПНГ саногенного рівня, що можна розглядати як наслідок адаптативної реакції [18]. У дітей, що страждають на вади розвитку ЦНС, стимулювальна дія сеансів ПНГ може відновити співвідношення процесів збудливості та гальмування, фізіологічну життєдіяльність нейронів головного мозку. Все це поліпшує як соматичний, так і психофізіологічний стан дітей [32, 33].

За тестом Седнева у обстежених нами дітей (особливо II групи) ризик розвитку астенії був до 14 балів, тривожності до 13 балів. Після сеансів дихання ПНГ цей показник знизився до 10 балів, що не виходить за межі нормального фізіологічного стану. Тобто після адаптації до гіпоксії саногенного рівня діти майже не скаржилися на знижений настрій, втомлюваність, емоційну лабільність, дратівливість і порушення сну.

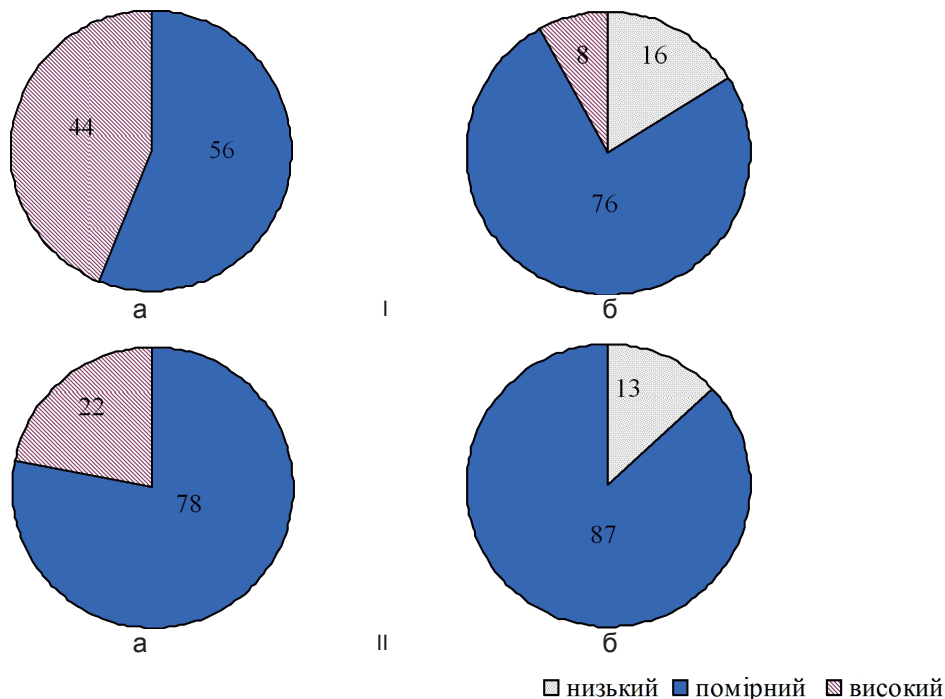


Рис. 3. Рівень реактивної тривожності у дітей за результатами тесту Спілберга – Ханіна (відсоток) до (а) та після (б) сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії : I – діти 6–11 років (n=25); II – діти 12–17 років (n=23)

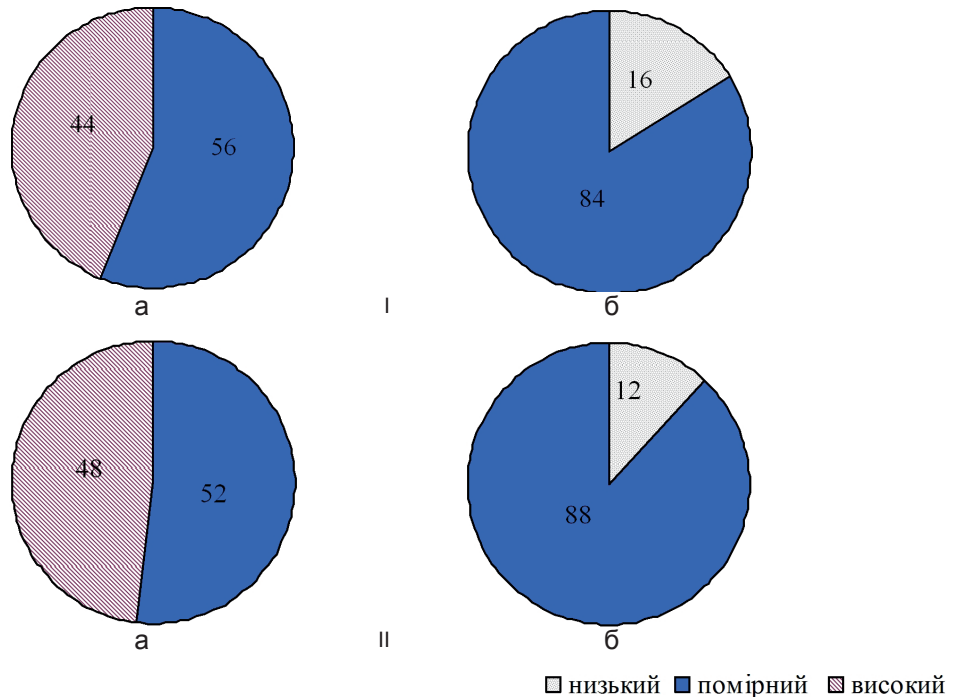


Рис. 4. Рівень особистісної тривожності у дітей за результатами тесту Спілберга—Ханіна (відсоток) до (а) та після (б) сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії: I – діти 6-11 років (n=25); II – діти 12-17 років (n=23)

ВИСНОВКИ

1. У дітей шкільного віку як тривалість ЛП СЗМР вибору одного із трьох сигналів, так і двох із трьох сигналів після курсу сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії статистично значуще скоротилась на 23 і 27 % відповідно.

2. У дітей старшого шкільного віку (12–17 років) ЛП СЗМР (PB_{1-3} , PB_{2-3}) був коротший, ніж у дітей молодшого віку (6–11 років).

3. У хлопчиків ЛП СЗМР (PB_{1-3} , PB_{2-3}) був коротшим, ніж у дівчаток.

4. Результати тесту Спілберга—Ханіна виявили високу як реактивну (ситуаційну), так і особистісну тривожність у дітей, що мешкають на радіоактивно забруднених територіях. Після сеансів ПНГ саногенного рівня показники тесту переходили з високого рівня в помірний та низький. При цьому особистісна тривожність у дітей обох груп вірогідно знизилася на 20 % (I група) та 23 % (II група).

5. У переважної більшості дітей до курсу сеансів переважала емоційна лабільність, дратівливість, порушення сну, втомлюваність, сонливість. Після курсу ПНГ у всіх дітей зареєстровано позитивну динаміку більшості показників.

6. Як показники тривалості ЛП СЗМР в умовах вибору, так і результати тесту Спілберга – Ханіна дають підстави рекомендувати сеанси ПНГ (інструментальної оротерапії) для поліпшення стану ЦНС у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях.

Л.М. Лісуха, В.А. Березовский

ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ЗРИТЕЛЬНО-МОТОРНУЮ РЕАКЦИЮ ДЕТЕЙ, КОТОРЫЕ ЖИВУТ НА РАДИОАКТИВНО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

Исследовано влияние прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня на латентный период сложной зрительно-моторной реакции в условиях выбора у детей – жителей радиоактивно загрязненных

територій. Оценивали также показатели тревожности по тесту Спилберга – Ханина. Обследовано 48 детей в возрасте от 6 до 17 лет. Дети разделены на две группы: I группа – 6-11 лет, II группа – 12-17 лет. Показано, что после курса сеансов нормобарической гипоксии (12 % в азоте) достоверно уменьшается латентный период сложной зрительно-моторной реакции выбора одного из трех цветов (PB_{1-3}) - на 23 % и сложной зрительно-моторной реакции выбора двух из трех цветов (PB_{2-3}) - на 27 %. Выявлено, что латентный период PB_{1-3} длится дольше, чем латентный период PB_{2-3} . У мальчиков в обоих случаях отмечали тенденцию к более быстрому реагированию, чем у девочек. Установлено, что после сеансов прерывистой нормобарической гипоксии личностная тревожность в обеих группах детей достоверно уменьшилась на 20 и 23 % соответственно.

Ключевые слова: прерывистая нормобарическая гипоксия; сложная зрительно-моторная реакция; центральная нервная система; дети с радиоактивно загрязненных территорий.

L.M. Lisukha, V.A. Berezovskiy

INFLUENCE OF THE NORMOBARIC HYPOXIA ON VISUAL-MOTOR CHILDREN'S RESPONSE LIVED IN RADIOACTIVELY CONTAMINATED TERRITORIES

We investigated the influence of intermittent normobaric hypoxia of sanogenic varying levels on the latent period of a complex visual-motor reaction in terms of choice in children - residents of radioactive contaminated territories. Indicators of anxiety were assessed with Spielberg - Hanin test. The study involved 48 children aged 6 to 17 years. The children were divided into two groups: the first one included the group from 6 to 11 years, and the second group from 12 to 17 years. It is shown that the intermittent normobaric hypoxia course sessions (12 % O_2 in nitrogen) reduced the latent period of complex visual-motor response of one of three colors (RC_{1-3}) choice – 23 % and complex visual-motor response of two of the three colors (RC_{2-3}) choice – 27 %. It was revealed that the latent period RC_{1-3} lasts longer than the latent period RC_{2-3} . The boys in both cases tend to have more rapid response than girl. It was found that after the sessions of varying normobaric hypoxia personal anxiety in both groups of children decreased by 20 and 23% respectively.

Key words: intermittent normobaric hypoxia; complex visual-motor response; central nervous system; children from radioactive contaminated territories.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Strelkov RB. Normobaric hypoxia. Moscow, 1988. [Russian].
2. Strelkov RB, Chizhov AY. Intermittent normobaric hypoxia: prevention, treatment, rehabilitation. 2 nd ed. Yekaterinburg : «Ural worker»; 2001. [Russian].
3. Sirotnin N. Comparative physiology of acclimatization to the mountain- climate. Kiev, 1963. p. 3–13. [Ukrainian].
4. Berezovskiy VA, Horban YM, Levashov MI, Sutkovsky AD. Technology body resistance increase using hypoxotherapy. Kyiv; 2000. [Ukrainian].
5. Milov VN, Shlyakhtin GS. The measurement time of the human sensomotoric reactions. Nizhny Novgorod, 2001. [Russian].
6. Volobuev MI. Oroterapiya - a new method of mental performance improvement Problems of military health care and the ways of its reforming. Kiev: Ukrain. military medical. acad; 1996. p. 212–15. [Ukrainian].
7. Volobuev MI. Investigation of the influence of breathing sessions artificial mountain air breathing session on sensomotoric cadet's reactivity. Problems of military health care and its reform path. Kiev: Ukrain military medical acad; 1997. p. 548–50. [Ukrainian].
8. Medical and demographic consequences of the Chernobyl disaster in Ukraine. Chornobylinform. Kiev; 2004. p. 58–75. [Ukrainian].
9. Makarenko NV. Psycho-physiological functions a man operator's is labour. Kiev: Naukova Dumka;1991. [Ukrainian].
10. Makarenko NV. Principles of professional selection of military specialists and methods of studying individual physiological differences among people. Kyiv; 2006. [Ukrainian].
11. Makarenko NV, Kol'chenko NV, Maydikov YL. Definition of functional mobility of the human nervous system on PNN – 3 devise. J Phys higher nervous activity IP Pavlova. 1984; XXIV (5) : 972 – 4. [Russian].
12. Eliseev OP Workshop on personality psychology. St. Petersburg; 2004. [Russian].
13. Sednev VV. Children's questionnaire nevroses. Donetsk, 1997. [Ukrainian].
14. Makarenko NV, Lyzogub VS, Bezakopylnyy OP.Guidance for the workshop on differential psychophysiology and physiology of higher nervous activity of a man. Kyiv – Cherkassy; 2014. [Ukrainian].
15. Kolesnikov AO, Kuvshinov DY, Barabash NA, Kagan ES. Complex assessment of neurodynamics parameters at young people. Med Scien. 2013; 2 : 42 – 9. [Russian].
16. Andronova LB, David Davoudi Seid, Panyukov MV. Functionul features status of students with neurocirculatory dystonia of hypotonic type according to Luscher test results and visual-motoric reaction. Sportyvnyaya medicine: Scien and Pract. 2013; 1 (10) : 26 – 7. [Russian].
17. Korkushko OV, Osmak ED. Age-related characteristics of cerebral circulation and mental performance in hypoxia at aged healthy people with different types of aging - physiological and accelerated (premature). Circ and hemos. 2013; 2 : 7 – 26. [Ukrainian].
18. Berezovskiy VA. Natural and instrumental oroterapia. Zaslavsky AY, editor. Donetsk; 2012. [Ukrainian].

19. Zaitsev AV, Lupandin VI, Surina OE. Age dynamics of the reaction time to visual stimulus. Hum Physiol. 1999; 25(6) : 34 – 8. [Russian].
20. Badaljan LO. Pediatric neurology. Moscow : Medicine; 1984. 576 p. [Russian].
21. Kerr B, Blanchard C, Miller K. Children's use of sequence in partially predictable reaction- time sequences. J Exp Child Psychol. 1980 ; 29 (3) ; 529 – 8.
22. Kyenya AI, Kirichenko OV. Sensomotoric reactivity of children living in radioactive adverse zone. Hum Physiol. 2001; 27(2) : 98 – 103. [Russian]
23. Oman A. Mechanisms of speed-accuracy tradeoff: evidence from covert motor processes. Biological Psychology. 2000; 51 (2 –3) : 173 – 99.
24. Dennis L., Murphy, Lerner A., Rudnik G., Lesch K. Serotonin transporter: Gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. Molec and Clin Psychobiol. 2004; 4(2) : 109 – 22.
25. Polikanova IS, Sysoeva OV, Tonevitsky AG. Association between serotonin transporter (5HTT) and mental fatigue development. Psikholog Issledov. 2012; 5(24) : 7 – 11. [Russian].
26. Polikanova IS, Sysoeva OV, Tonevitsky AG Association between 5HTT polymorphism and cognitive fatigue development. Intern J of Psychophysiol. (Special Issue). 2012; 85 : 411. [Russian].
27. Nekhoroshkova AN. Features of visual-motor reactions of children from 10 to 11 years with a high level of anxiety. Herald of new med Technolog. 2011; XVIII (3) : 14 – 6. [Russian].
28. Nekhoroshkova AN, Griбанov AV. Features of visual-motoric reactions of children from 8 to 11 years with a high level anxiety. Hum ecol. 2011; 5 : 43 – 8. [Russian].
29. Demakova OA, Sherstyanykh VA. Dependence of the simple visual-motor response on the latent period of stimulus presentation and the level of functional stress. Biology - the science of the twenty-first century: 8-th Puschynskaya school- conference of young scientists. Pushchino; 2004. [Russian].
30. Krivoschekov SG, Kovtun LT, Nekipelova NV. Cardio-respiratory system response of healthy people acute hypoxia depending on psychophysiological features. Bul. SO RAMS. 2010; 30 (4) :14 – 18. [Russian].
31. Rozhentsev VV, Polevshchikov MM, Matveyev RY. Determination of the optimal duration of paired light pulses for estimation of nervous system excitation. Fundamental research. 2010 ; 117 – 122. [Russian].
32. Nazar OV. Effect of normobaric hypoxic training on quality of life children with cerebral palsy. Mod. pediatr. 2011; 5 (39) : 100 – 102. [Russian].
33. Yatsenko KV, Berezovsky VA. Use of intermittent normobaric hypoxia in combination therapy of infantile cerebral paralysis. Intern. Neurol. J. 2012 ; 1(47) : 51 – 6. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 01.10.2014*

D.M. Nozdrenko¹, K.I. Bogutska¹, Yu.I. Prylutskyi^{1*}, V.F. Korolovych^{1,2},
M.P. Evstigneev³, U. Ritter⁴, P. Scharff⁴

Impact of C₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in *soleus* muscle of rat at ischemia-reperfusion injury

^{*1}Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine; E-mail: prylut@ukr.net; ²Saratov State University, Saratov, Russia; ³Department of Biology and Chemistry, Belgorod State University, Belgorod, Russia; ⁴Technical University of Ilmenau, Institute of Chemistry and Biotechnology, Ilmenau, Germany

The effect of C₆₀ fullerene nanoparticles (30-90 nm) on dynamics of force response development to stimulated soleus muscle of rat with ischemic pathology, existing in muscle during the first 5 hours and first 5 days after 2 hours of ischemia and further reperfusion, was investigated using the tensometric method. It was found that intravenous and intramuscular administration of C₆₀ fullerene with a single dose of 1 mg/kg exert different therapeutic effects dependent on the investigated macroparameters of muscle contraction. The intravenous drug administration was shown to be the most optimal for correction of the velocity macroparameters of contraction due to muscle tissue ischemic damage. In contrast, the intramuscular administration displays protective action with respect to motions associated with generation of maximal force response or continuous contractions elevating the level of muscle fatigue. Hence, C₆₀ fullerene, being a strong antioxidant, may be considered as a promising agent for effective therapy of pathological states of the muscle system caused by pathological action of free radical processes.

Key words: C₆₀ fullerene, soleus muscle of rat, ischemia-reperfusion injury, dynamics of muscle contraction, dynamic light scattering.

Ischemic muscle injury may be viewed as a series of biochemical reactions initiated under conditions of hypoxia already after few minutes of ischemia as a consequence of insufficient blood supply [1]. As a rule this pathology is related to a secondary effect commonly developed after insults, infarcts or mechanical injuries. Destruction of the majority of cells occurs due to activation of chemical agents produced during and after ischemia. Ischemic cascade usually proceeds within 2-3 hours after ischemia, although in certain cases it may last several days even after recovery of normal blood stream. Quick determination of the level of ischemic injury is of crucial importance for its further therapy [2]. The action of ischemia decreases the force of muscle contraction by

40% after 1 hour of ischemia, and by 90% after 2 hours. Recovery of muscle force generation was observed only by the end of second week after ischemia [3]. After the ischemia pathologic processes are operating in muscle within few days and are usually characterized by progressive dynamics. The processes of regeneration start by the end of the first week after 2 hours of ischemia. Experimental data point out that the initial pathologic effects after continuous ischemia-reperfusion may be incomplete thus extending the ischemic state for up to several days [4]. Increase of the duration of ischemia from 1 to 2 hours significantly slows down the processes of regeneration [3].

Complexity of molecular mechanisms of muscle contraction and insufficient knowledge

© D.M. Nozdrenko, K.I. Bogutska, Yu.I. Prylutskyi, V.F. Korolovych, M.P. Evstigneev, U. Ritter, P. Scharff

of their operation under conditions of ischemic injury often do not allow interpreting of large amount of experimental data. The general picture of the pathologies being developed is complicated by the fact that fast and slow muscle filaments differently respond to ischemic injury. Recovery of their kinetic characteristics also occurs for different time intervals independent of their location [5].

The pristine C_{60} fullerene as a unique class of carbon allotropes is able to penetrate through the cell membrane [6], to exhibit antioxidant properties [7, 8] and, being nontoxic (at low concentration at least) [9], to exert specific health effects [10]. Biomedical applications require the dispersal of C_{60} fullerene in a solvent, with aqueous dispersions being preferred because of biocompatibility, safety, or environmental concerns. Although pristine C_{60} fullerene has extremely low water solubility, it can form stable colloid solution containing individual C_{60} fullerenes as well as C_{60} fullerene aggregates (clusters) in water [11] when subjected to extended mixing, sonication or solvent exchange [12].

It is known that C_{60} molecule is able to bind 34 methyl radicals [13]. C_{60} fullerene can effectively immobilize and inactivate either superoxide anion-radical and hydroxyl radicals [14]. C_{60} fullerene derivatives are now considered as strong adsorbents of free radicals, which are being produced as a consequence of ischemic injury of small intestine [15]. In [16] it was shown that intravenous administration of C_{60} (FC4S) 15 minutes before occlusion in 10 and 100 $\mu\text{g/kg}$ doses significantly lowers the level of focal cerebral ischemia. In this case the pH level and gas content in blood do not change, as well as the frequency of heart contraction and arterial pressure remain unaltered. Hence, it may be assumed that C_{60} fullerene, as a strong antioxidant, may exert protective effects against ischemic injuries of tissues. That is why the main goal of the present work was to investigate the influence of pristine C_{60} fullerene on dynamics of evolution of the

processes of force response development to stimulated excitation of *soleus* muscle of rat with ischemic pathology, appearing during the first 5 hours and first 5 days after 2 hours of ischemia and further reperfusion. The evolution of the processes of force response change in ischemic muscle determined during the experiment enables establishing important relationships between the macroscopic parameters of ischemic muscle state and the level of its efferent activity.

METHODS

Highly stable reproducible pristine C_{60} fullerene aqueous colloid solution (C_{60} FAS) in 0.15 mg/ml C_{60} fullerene concentration used in the experiments, was prepared according to protocol [17, 18].

Measurement of the *hydrodynamic* size distribution for C_{60} fullerene aggregates was performed by dynamic light scattering (DLS) at 25 °C on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Ins. Ltd) with upload of Multiple narrow modes (high resolution). DLS instrument equipped with a HeNe gas laser (max. output power: 4 mW) operating at a wavelength of 633 nm, was used. The measurements were performed at 173° scattering angle (Non-Invasive Back-Scatter (NIBS) technology). The autocorrelation function of the scattered light intensity was analyzed by the Malvern Zetasizer software. In DLS measurements the C_{60} fullerene refraction index was equal to 1.90.

Experiments were performed on 60 male Wistar rats in the age of 3 months, having weight of 170 ± 5 g. Administration of C_{60} FAS at a dose of 1 mg/kg [19] was carried out in two ways: intravenously (20 animals per group) and intramuscularly (20 animals per group) 2 hours before the beginning of each experiment. The control group (not received C_{60} FAS) also contained 20 animals.

The protocol of injecting of C_{60} fullerenes was based on experimental work [7] reporting that C_{60} fullerenes administered intraperitoneally to rats (the maximum tolerated dose was

500 mg/kg) were subjected to clearance from the organism within 2-4 days.

Animals were anesthetized by intraperitoneal administration of nembutal (40 mg/kg). For muscle ischemia the branch of the femoral artery which provides blood supply in experimental muscle was dragged by ligatures. In this case the so-called incomplete ischemia of the muscle was induced, because within few hours after the operation the blood supply to the muscle was reduced by 25-30% due to the accession of small lateral collaterals to the femoral artery. Preparation of the experiment also included cannulation (*a. carotis communis sinistra*) for drug administration and pressure measurement, tracheotomy and laminectomy at the lumbar spinal cord level. *Soleus* muscle of rat was separated from the surrounding tissues. Its tendon portion was transversely cut in the distal part. The ventral roots were cut in points of their exit from the spinal cord to stimulate efferent fibers in L7-S1 segments.

The animals used in this study were treated in accordance with international principles of the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986).

Variations of muscle contraction were measured using hypersensitive strain gauges, which are based on measuring the change in resistance of an array of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) by deformation [20]. SWCNTs were located in the back of the micropipette, and its front part was attached to the investigated muscle tendon. The programmable signal generators of the special shape were used to form the stimulating electrical signals with duration of 2, 3, 4 and 5 sec.

The muscle contraction force was measured during the first 5 hours (the first series of experiments) and on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th day (the second series of experiments) after 2 hours of ischemia.

The study of dynamic properties of muscle contraction was performed under conditions of muscle activation using the modulated

stimulation of efferent fibers. Five filaments of the cut ventral roots were fixed on stimulating electrodes, and a special device was used for cyclic sequence distribution of electrical signals to stimulate the filaments. The distributed stimulation allowed one to get monotonous and uniform muscle contraction at low stimulation frequencies of individual filaments. Stimulation of efferent fibers in L7-S1 segments was performed by rectangular shape electric pulses (duration was 2 msec), formed by means of a pulse generator controlled by ADC through the platinum electrodes (voltage was 7 V). The characteristics of stimulating signal were programmed and transmitted from the ADC-DAC device to a generator. Controlling of external load on the muscle was carried out with the help of mechanical stimulator. The electromagnetic linear motor was used for perturbation load.

The experimental curves obtained reflect the change in the studied parameters as a percentage of intact control muscle parameters taken as 100%. Each of these curves is a result of averaging 10-12th similar measurements.

The statistical analysis of the results was carried out by the methods of variation statistics, using the Statistica 8.0 ("StatSoft", USA) software. Testing of the datasets for their match to normally distributed population was performed using Shapiro-Wilk test. To determine the most probable differences between the mean values of the sampled populations the U-criterion of Mann-Whitney test was used. Statistical significance of any differences was set to $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Knowledge of structural state of C₆₀ fullerene in solution is important for estimation of nanostructure bioactivity and perspectives of its biomedical application [21]. In order to characterize the structural state of C₆₀FAS the DLS investigation was performed.

Fig. 1a demonstrates the experimental distribution of the scattered light intensity

over the hydrodynamic sizes of light scattering C_{60} fullerene particles in C_{60} FAS at room temperature. The presence of two peaks in DLS spectrum of C_{60} FAS shows the existence of C_{60} fullerene aggregates with different hydrodynamic sizes. As one can see in Fig. 1b the C_{60} FAS contains C_{60} fullerene aggregates with hydrodynamic sizes from 30 nm to 90 nm (~92% of the total number of particles), and small number (~8%) of aggregates having dimensions from 100 nm up to 300 nm. Moreover, according to the DLS data the dimensions of C_{60} fullerene aggregates do not depend on time during the

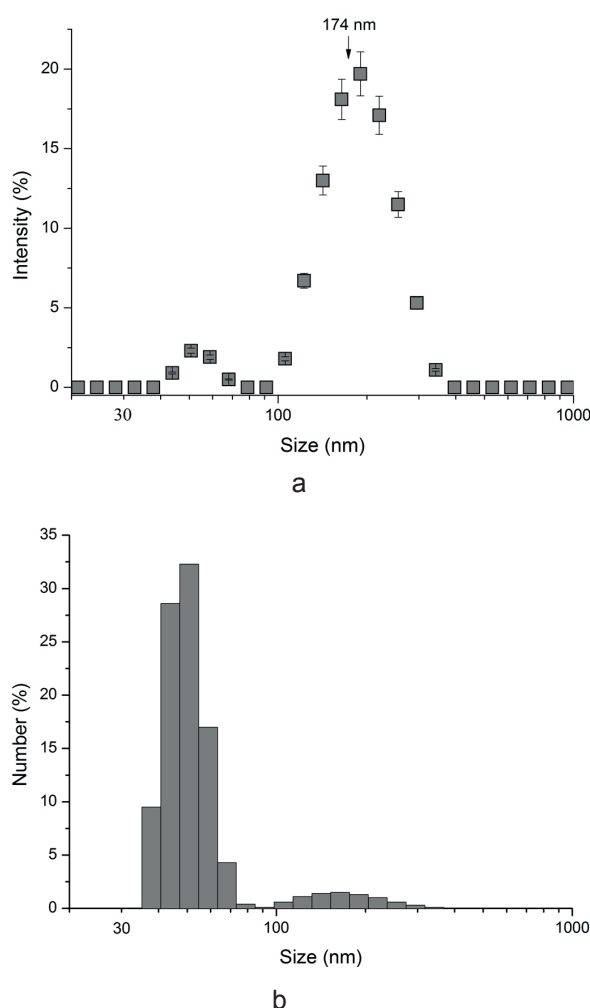


Fig. 1. DLS results of C_{60} FAS (0.15 mg/ml) at room temperature: (a) distribution of the scattered light intensity over the hydrodynamic sizes of light scattering C_{60} fullerene particles; (b) distribution of the number of light scattering C_{60} fullerene particles over their hydrodynamic sizes

period 70-270 days starting from the day of C_{60} FAS preparation.

Skeletal muscles possess higher resistance to ischemia than other organs, however, continuous ischemia may result in various pathologies, in particular, muscle necrosis and apoptosis. Usually the main goal during ischemia treatment is fast recovery of blood supply (reperfusion) in the injured zones. However, the reperfusion therapy leads to a new pathophysiological process called reperfusion trauma, which also induces significant tissue damage [22]. The principal pathological processes, which invoke the cascade of ischemic pathologies in the injured muscle, are occurring during the first hours after reperfusion [23]. Based on this, the first step in our study was the investigation of the changes in the dynamics of contraction within the first 5 hours after the reperfusion of the ischemic rat *soleus* muscle. By means of comparative analysis of intravenous and intramuscular C_{60} FAS administration we have been trying to select an optimal method for achieving the maximal therapeutic effect.

Note, the changes in ischemic muscle contraction force by using similar stimulus pools were described in detail in our previous work [24].

The change in the force of contraction of the ischemic rat *soleus* muscle during the first 5 hours after its reperfusion activated by stimulating pools with duration of 5 sec, is given in Fig. 2. In the control (ischemic muscle in the absence of the drug) the decrease of maximal force response was observed either on increase of time passed after ischemia and on increase of the duration of stimulating excitation signal (Fig. 3(I)). Independent of the method of C_{60} fullerene administration an insignificant decrease of the force response was observed on increasing the duration of the excitation signal, which was mainly dependent on the time passed after the reperfusion.

The results of calculation of such important biomechanical indicator as the integrated power of muscle contraction (calculated from the total

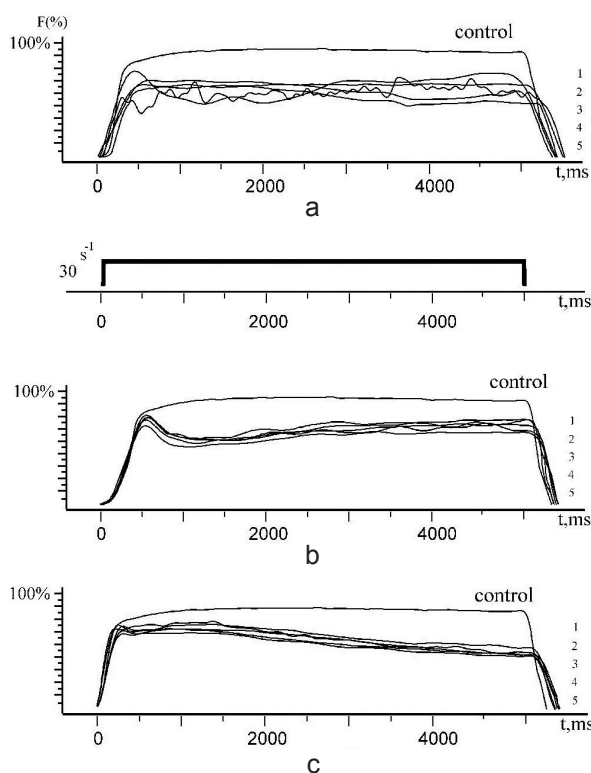


Fig. 2. Curves of contraction force generation, $F(\%)$, of ischemic rat *soleus* muscle: (a) – the control (in the absence of C₆₀FAS); (b) – intravenous injection of C₆₀FAS; (c) – intramuscular injection of C₆₀FAS. 1, 2, 3, 4, 5 – hours passed after reperfusion of ischemic muscle

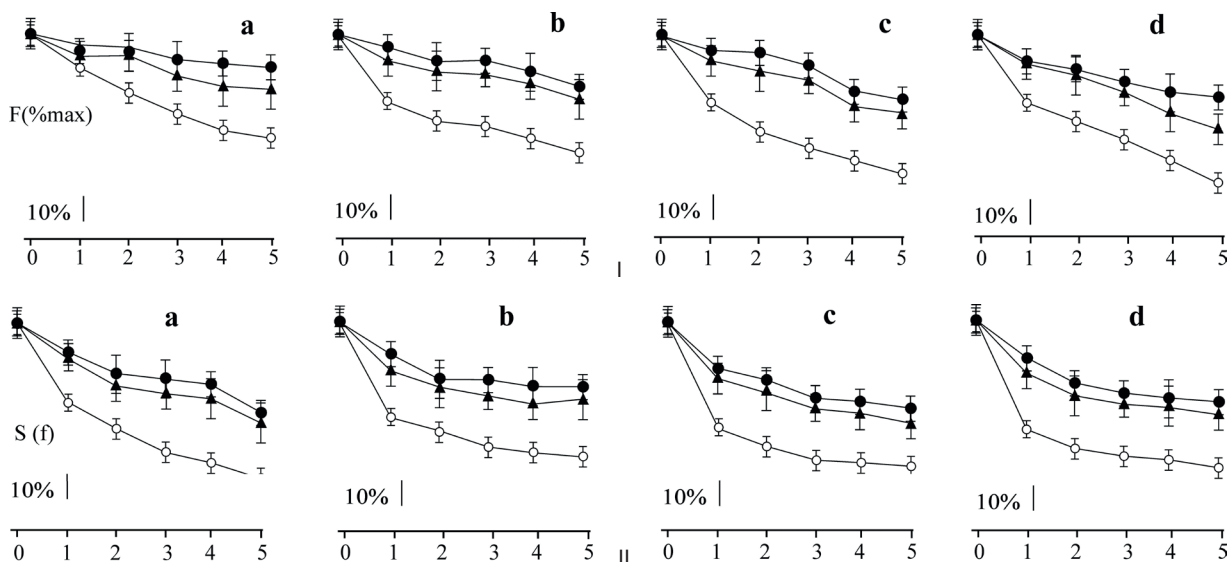


Fig. 3. Maximal contraction force change, $F(\%max)$ (I), and integrated power change, $S(f)$ (II), of ischemic rat *soleus* muscle for different duration of modulated electrostimulation: a, b, c, d – stimulation during 2, 3, 4, 5 sec, respectively; (○) – the control (in the absence of C₆₀FAS); (▲) – intravenous injection of C₆₀FAS; (●) – intramuscular injection of C₆₀FAS. 1, 2, 3, 4, 5 – hours passed after reperfusion of ischemic muscle; * $p < 0.05$

area under the force curve, $S(f)$) are given in Fig. 3(II). It was found that the decrease of the integrated power on increase of the time passed after the reperfusion and increase of the stimulating signal duration to much extent was compensated by the action of C₆₀FAS independent of the method of its administration. It is worth noting that this protective effect of C₆₀ fullerene can be observed already during the first hours of ischemic injury, when the initiation of the main ischemic cascades of muscle tissue damaging occurs.

Taking into account that the muscle contraction is a dynamic oscillating process involving interdependent reactions, it is possible to assume that under the condition of appearing of pathological changes in muscle filaments induced by artificial ischemia, an optimal interrelation of the parameters of stimulation which can involve the maximal number of sarcomer structures for the most optimal course of contraction, must exist. Although the heterogeneity of the contractile component of the skeletal muscle complicates the estimation of the damage of each particular element, the overall picture of the development of pathological

process may be tracked by means of measuring the changes of maximal force of contraction during several days (Fig. 4). In the control the muscle activity exerts a tendency of linear decrease of the force response on increasing the time after the reperfusion, which may be due to development of muscle fatigue. However in contrast to the processes of fatigue, fluctuating components can be clearly seen on the force curves starting from the 2nd day of experiment. If the force decrease is associated with the decrease in the number of molecular force generators (i.e. decrease in the number of active cross-bridges), in the case of fluctuating contractions the damages must be observed nearly for all contractile components of myocyte. It is therefore reasonable to say just about relative resemblance of the force responses in fatigue

and artificial ischemia. Significant dependence of dynamic characteristics of contraction on the activity of the main types of proprioceptors strongly complicates controlling of the motion activity of injured muscle by central nervous system (CNS), if the uncontrolled fluctuating responses of the ischemia injured muscle appear as a reaction to even a simple stimulating signal. Removal of these oscillating components of contraction (Fig. 4) due to the action of C₆₀FAS independent of the method of its administration is a very important feature of the protective effect of this compound.

It is seen that on applying the modulated stimulation one can observe qualitative and quantitative differences in the contraction of ischemic injured *soleus* muscle of rat in the control and after the action of C₆₀FAS (Fig. 4). In the all studied processes the control values of maximal force of contraction and the integrated power were decreasing on increasing the duration of period after the reperfusion as well as the duration of the stimulated excitation (Fig. 5). Administration of C₆₀ fullerene had revealed its apparent protective action on the studied characteristics of the force of contraction. In particular, the pronounced protective effects were observed on the 5th day after the ischemia at the maximal 5 sec duration of the stimulated excitation. It was found that the protective effect associated with the maximal force response amounted to 30-35%, whereas the same effect with respect to integrated power was more than 50% as compared to the control values. In all cases the intramuscular administration of C₆₀FAS displayed 10-15% greater protection with respect to the intravenous administration.

Differences in the dynamics of force and integrated power of ischemic injured muscle on intravenous and intramuscular drug administration (Fig. 5) indicate complexity of molecular mechanisms of contraction, which, presumably, differ from each other depending on the state in which the muscle exists, and different mechanisms of developing the antioxidant action of C₆₀ fullerene. At the

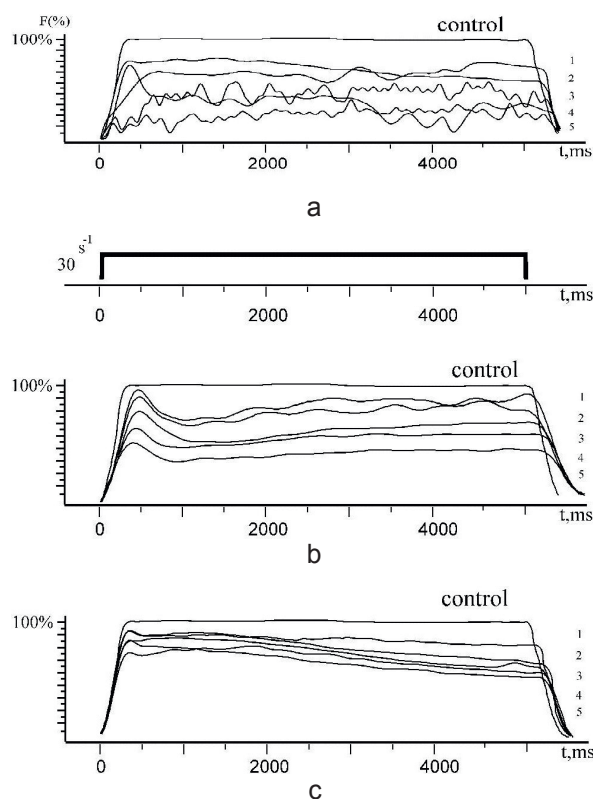


Fig. 4. Curves of contraction force generation, $F(\%)$, of ischemic rat *soleus* muscle: (a) – the control (in the absence of C₆₀FAS); (b) – intravenous injection of C₆₀FAS; (c) – intramuscular injection of C₆₀FAS. 1, 2, 3, 4, 5 – a day after reperfusion of ischemic muscle

same time on C₆₀FAS injection directly into the injured muscle the concentration of C₆₀ fullerene must be significantly higher specifically in the hearth of damage in muscle as compared with the intravenous administration of this compound (Fig. 5). In such case it is reasonable to say about the concentration dependence of the protective effect of C₆₀ fullerene with respect to maximal force and integrated power of the ischemic injured muscles.

The above-discussed effects may be related to the fact that during the 2 hours of ischemia of rat *soleus* muscle the ATP concentration is getting significantly lowered which is accompanied by considerable elevation of the lactate level. After 3 hours of ischemia the lowering of ATP level reaches approximately 95%, whereas the glycogen appears to be outspent by 88% [25]. These results confirm hypothesis that large amount of high-energy phosphates is being utilized by the injured muscle cell for maintaining homeostasis altered due to ischemic injury. As a consequence it leads to elevation of the level of muscle fatigue, further resulting in lowering the maximal force response on increasing the duration of stimulating signal.

It has recently been shown [26], that C₆₀FAS is capable to induce the ATPase activity and the superprecipitation reaction of rabbit skeletal muscle actomyosin. This may be due to the binding of C₆₀ fullerene with aminoacid residues of the active site of myosin. Alternatively, the protective effect of C₆₀ fullerene with respect to the processes of generation of maximal force response of ischemic injured muscle may be connected with its antioxidant properties, whereas the most pronounced therapeutic effects observed on C₆₀FAS intramuscular administration can be explained by its injection directly to the hearth of damage.

In the modern theories of motor control it is commonly assumed that when muscle pathologies are being developed the CNS restricts the motions of limb in such a way to minimize the number of degrees of freedom which are associated with movement of certain segments. The synergies (involvement of non-damaged or weakly damaged muscle filaments) are thought to lie behind this process, which may lead to more difficult managing of actions and thereby worsen the control over execution of purposeful motions. Because the structure

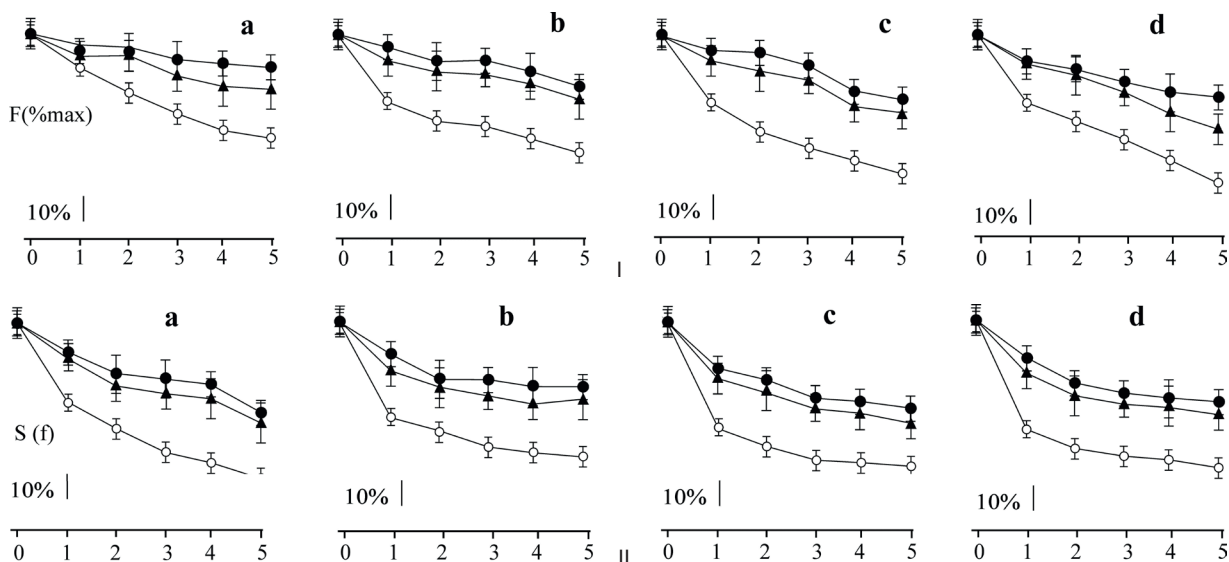


Fig. 5. Maximal contraction force change, $F(\%max)$ (I), and integrated power change, $S(f)$ (II), of ischemic rat *soleus* muscle for different duration of modulated electrostimulation: a, b, c, d – stimulation during 2, 3, 4, 5 sec, respectively; (\circ) – the control (in the absence of C₆₀FAS); (\blacktriangle) – intravenous injection of C₆₀FAS; (\bullet) – intramuscular injection of C₆₀FAS. 1, 2, 3, 4, 5 – a day after reperfusion of ischemic muscle; * $p < 0.05$

of dynamic component of stimulation, i.e. the interrelation of its amplitude and duration, determines the speed and amplitude of motion, the change in the character of efferent activity by ischemic muscle results in errors in precision of positioning of the joint as a whole. When making even simple motions there is the possibility of establishing cause-effect relation between the mechanical activity of ischemic injured muscles of the joint and the main dynamic parameters of the motions. The accuracy of such analysis may be improved by means of analysis of tetanic areas of contraction accompanied by controlling mechanical parameters of motion. Hence, investigations of changes in dynamics of contraction of ischemic injured muscle specifically on tetanic areas of contraction makes possible to trace the level of muscle damage and the quality of therapeutic action of the studied drug.

Fig. 6(I) demonstrates the changes in force response of ischemic rat *soleus* muscle during the application of stimulating signal with increased time of tetanic phase during the first 5 hours after the reperfusion. As one can see, already within the first hour after the reperfusion in control studies the decrease of maximal force of contraction and increase of the time needed for achieving it are observed. The force curves exhibit a marked smoothing of the transition from dynamic to steady-state phase of contraction (the transition between Δt_3 and Δt_4 regions). Hence, the use of C_{60} FAS independent of the method of its administration has apparently affected the force curves, viz. resulted in clear separation of the dynamic and steady-state regions of contraction.

Increase of the time needed to reach the maximal level of contraction force in rat *soleus* muscle already after 1 hour after reperfusion, and linear increase of retention time during the next 5 hours, most likely is due to the growing inability of ischemic muscle to fully activate the targeted accuracy descending pools of afferent activity. The most pronounced influence of C_{60} fullerene on tetanic regions of contraction, than on maximal force response, from our

viewpoint, is connected with induction of irreversible pathologic changes in generation of the contraction force in the most affected molecular components belonging to the elements of the muscle contraction system, which are being activated on different stages of contraction. However, the observed insignificant protective effect of C_{60} fullerene on tetanic regions of contraction is of great importance because it specifically affects further development of pathologic injures neutralizing free radicals on the very beginning of ischemic muscle injury.

Slowing down of dynamic processes on increase of the time passed after the reperfusion within the first hours of experiment, at least in part, may be associated with destruction of the myocyte membranes which occurs already on the first stages of ischemic injury [23] before the administration of C_{60} FAS. This process obviously emphasizes the role of rigidity of muscle contraction, and its impact is getting most pronounced under condition of ischemic damage of muscle filaments. A proof to this assumption comes from the fact that the increase in time required to reach the maximal contraction force and decrease of the magnitude of maximal force, occur on similar level.

Investigations of the changes in dynamic parameters of contraction by means of electrostimulation during 5 days (Fig. 6(II)) enabled establishing direct dependence of lowering the velocity of reaching the maximal level of force on the time passed after the reperfusion in control groups. Administration of C_{60} FAS strongly influences this process, viz. decrease of this velocity after the first day after the ischemia did not significantly change during the next 4 days of experiment. Intravenous drug administration demonstrated better protective effect (by 10%) with respect to intramuscular administration. More apparent transition from the dynamic component of contraction to maintaining of equilibrium level of force may be due to the fact that C_{60} fullerene favors the involvement of energetically favorable mechanisms which are able to minimize the level of ischemic damage.

The velocity by which the muscle reaches the maximal force response is one of the important biomechanical characteristics of the fast muscle filaments. Increase of this parameter in the ischemic muscles under the action of C_{60} FAS may facilitate involvement

of motoneuron pools of activity encoding the limb motion. As reported in [27] the pattern of pathologic processes development in slow and fast muscles is similar during the first 2 weeks after the ischemia. Hence, the effects observed on slow rat *soleus* muscle must also be spread

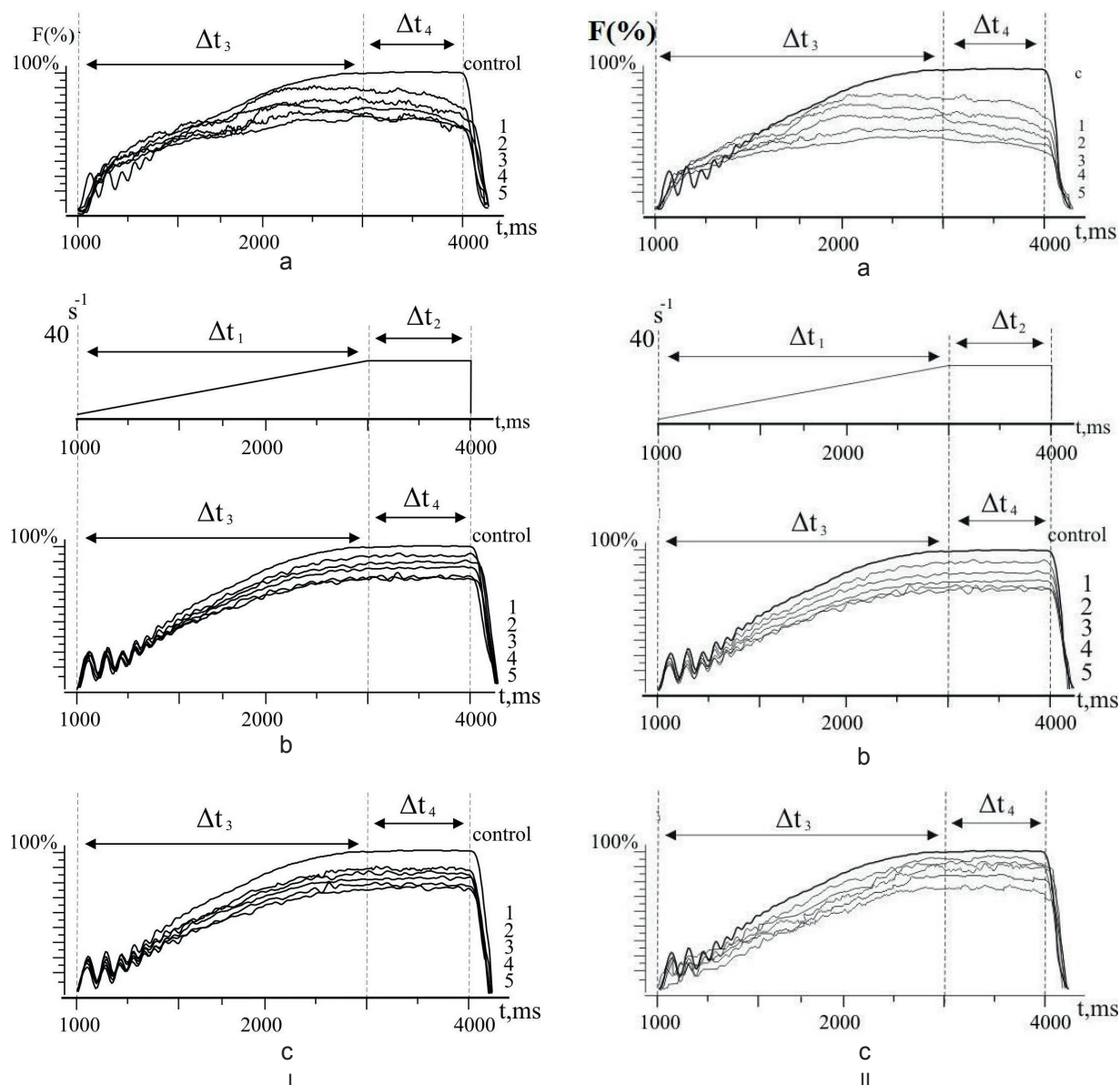


Fig. 6. Curves of contraction force generation, $F(\%)$, of ischemic rat *soleus* muscle on applying stimulating signal with increased tetanic phase of the growing frequency of excitation: (a) – the control (in the absence of C_{60} FAS); (b) – intravenous injection of C_{60} FAS; (c) – intramuscular injection of C_{60} FAS. Δt_1 – the time of growing of the stimulating frequency; Δt_2 – retention time of the maximal frequency of excitation; Δt_3 – the time of growing of the contraction force; Δt_4 – retention time of the maximal contraction force. 1, 2, 3, 4, 5 – hours (I) and days (II) after reperfusion of ischemic muscle

onto the fast muscle filaments, where the effects of precise positioning are of utmost importance in muscle dynamics.

The observed high correlation between the duration of ischemia and viability of muscle filament [2] might be one of the important factors of lowering the maximal force response on increase of time passed after the ischemia not only due to the decrease in the number of viable muscle filaments, but also due to the increase of the fraction of collagen structures in muscle. Ischemia lasting 3 hours causes muscle necrotic changes and nerve degrading. The necrosis fraction in the muscle tissue may reach 60% [28]. In such case the therapeutic action of C_{60} fullerene as an antioxidant will not give any positive effect. So the use of C_{60} fullerene as a therapeutic agent in ischemic injuries may have pronounced positive effect mainly on early stages of development of such pathologies.

The data obtained and discussed above demonstrate complexity of building the detailed model of the protective effect of C_{60} fullerene with respect to ischemic muscle contraction. Biomechanical analysis of the protective action of C_{60} fullerene on ischemic injured muscle filaments should involve detailed investigation of kinematic and dynamic parameters of motion.

CONCLUSIONS

The results obtained in the present work evidence a pronounced protective effect of C_{60} fullerene nanoparticles in rat *soleus* muscle contraction dynamics after ischemic injury. Specifically it was found that low-dose intravenous and intramuscular administration of C_{60} FAS have different therapeutic effects depending on the studied macroparameters of skeletal muscle contraction. It was determined that the intravenous drug administration is the most optimal for correction of the velocity macroparameters of contraction on ischemic damage of muscle tissue, whereas the intramuscular C_{60} FAS administration exerts more strong protective action with respect

to the motions which generate the maximal force responses or continuous contractions characterized by elevated level of muscle fatigue. These results suggest that further development of medical nanotechnologies, which utilize antioxidant properties of C_{60} fullerene, and the absence of any acute intoxication after administration of this drug opens up new possibilities for therapy and prevention of ischemic pathologies. It is reasonable to propose that the development of this area may also result in improvement of the therapy of other pathologic states of the muscle system, which are associated with pathologic action of free radicals.

Acknowledgements

D. Nozdrenko is grateful to Ministry of Education and Science of Ukraine for financial support. M. Evstigneev is grateful to Russian Science Fund for support (project no. 14-14-00328). V. Korolovych is grateful to Government of the Russian Federation for support (grant No. 14.Z50.31.0004).

Д.М. Ноздренко¹, К.І. Богуцька¹, Ю.І. Прилуцький^{*}, В.Ф. Королович^{1,2}, М.П. Євстигнєєв³, У. Ріттер⁴, П. Шарф⁴

ВПЛИВ C_{60} ФУЛЕРЕНУ НА ЗМІНИ СИЛА-ШВИДКІСТЬ В *SOLEUS* MUSCLE ЩУРА ЗА ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Досліджено вплив наночастинок C_{60} фулерену (30-90 нм) на динаміку процесів розвитку силової відповіді у разі стимуляційного подразнення м'яза *soleus* щура на фоні ішемічної патології, яка виникає упродовж перших 5 год та перших 5 днів після 2 год ішемізації і наступної реперфузії. Встановлено, що внутрішньовенне та внутрішньом'язове введення C_{60} фулерену (1 мг/кг) мають різні терапевтичні ефекти залежно від досліджуваних макропараметрів скорочення м'яза. Найбільш оптимальним для корекції швидкісних макропараметрів скорочення за ішемічного ушкодження м'язової тканини є внутрішньовенне введення препарату, а внутрішньом'язове проявляє більш захисну дію за рухів, пов'язаних з генерацією максимальної силової відповіді або тривалих скорочень, які збільшують рівень втомлюваності м'язу. Отже, C_{60} фулерен можна розглядати як перспективний агент для ефективної терапії патологічних станів м'язової системи, в основі розвитку яких лежить патологічна дія вільнорадикальних процесів.

Ключові слова: C₆₀ фулерен; *soleus* м'яз щура; ішемія-реперфузія; динаміка м'язового скорочення; динамічне розсіювання світла.

*¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
*e-mail: prylut@ukr.net;

²Саратовський державний університет імені М.Г. Чернишевського, РФ;

³Белгородський державний університет, РФ;

⁴Технічний університет Ілменау, Інститут хімії і біотехнології, ФРН.

Д.Н. Ноздренко¹, Е.И. Богуцкая¹, Ю.И. Прилуцкий^{1*}, В.Ф. Королович^{1,2}, М.П. Евстигнеев³, У. Риттер⁴, П. Шарфф⁴

ВЛИЯНИЕ C₆₀ ФУЛЛЕРЕНА НА ИЗМЕНЕНИЯ СИЛА-СКОРОСТЬ В *SOLEUS* MUSCLE КРЫСЫ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Исследовано влияние наночастиц C₆₀ фуллерена (30-90 нм) на динамику процессов развития силового ответа на стимуляционное раздражение мышцы *soleus* крысы на фоне ишемической патологии, которая возникает в мышце в течение первых 5 ч и первых 5 дней после 2-часовой ишемизации и следующей реперфузии. Установлено, что внутривенное и внутримышечное введение C₆₀ фуллерена (1 мг/кг) имеют разные терапевтические эффекты в зависимости от исследованных макропараметров сокращения мышцы. Наиболее оптимальным для коррекции скоростных макропараметров сокращения при ишемическом повреждении мышечной ткани является внутривенное введение препарата, а его внутримышечное проявляет более защитное действие при движениях, связанных с генерацией максимального силового ответа или длительных сокращений, которые увеличивают уровень утомляемости мышцы. Таким образом, C₆₀ фуллерен можно рассматривать как перспективный агент для эффективной терапии патологических состояний мышечной системы, в основе развития которых лежит патологическое действие свободнорадикальных процессов.

Ключевые слова: C₆₀ фуллерен; *soleus* мышца крысы; ишемия-реперфузия; динамика мышечного сокращения; динамическое рассеяние света.

*¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
*e-mail: prylut@ukr.net;

²Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, РФ;

³Белгородский государственный университет, РФ;

⁴Технический университет Илменау, Институт химии и биотехнологии, ФРН.

REFERENCES

1. Murdock M, Murdoch MM. Compartment syndrome: a review of the literature. Clin Podiatr Med Surg. 2012; 29(2): 301-10.
2. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. PLoS One. 2014; 9(1): e84783.
3. Rácz IB, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. Eur Surg. 1997; 29(4): 254-63.
4. Loerakker S, Oomens CW, Manders E, Schakel T, Bader DL, Baaijens FP, Nicolay K, Strijkers GJ. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. Magn Reson Med. 2011; 66(2): 528-37.
5. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev. 2001; 53(1): 135-59.
6. Prylutska S, Bilyy R, Overchuk M, Bychko A, Andreichenko K, Stoika R, Rybalchenko V, Prylutsky Yu, Tsierkezos N, Ritter U. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. J Biomed Nanotechnol. 2012; 8: 522-7.
7. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. Nano Lett. 2005; 5(12): 2578-85.
8. Prylutska SV, Grynyuk II, Matyshevskaya OP, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct. 2008; 16: 698-705.
9. Prylutska SV, Matyshevskaya OP, Golub AA, Prylutsky YuI, Potebnya GP, Ritter U, Scharff P. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity *in vitro*. Mater Sci Engineer. 2007; C 27: 1121-4.
10. Prylutska SV, Burlaka AP, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. Exp Oncol. 2011; 33: 162-4.
11. Prilutski Yu, Durov S, Bulavin L, Pogorelov V, Astashkin Yu, Yashchuk V, Ogul'chansky T, Buzaneva E, Andrievsky G. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. Mol Cryst Liq Cryst. 1998; 324: 65-70.
12. Mchedlov-Petrosyan NO. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. Chem Rev. 2013; 113(7): 5149-93.
13. Krustic PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF. Radical reactions of C₆₀. Science. 1991; 254: 1183-5.
14. Prylutska SV, Burlaka AP, Matyshevskaya OP, Golub AA, Potebnya GP, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Effect

- of the visible light irradiation of fullerene-containing composites on the ROS generation and the viability of tumor cells. *Exp Oncol*. 2006; 28(2): 160-2.
15. Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. Free radical scavenging activity of fullerenol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J Surg*. 2000; 24(4): 450-4.
 16. Huang SS, Tsai SK, Chih CL, Chiang LY, Hsieh HM, Teng CM, Tsai MC. Neuroprotective effect of hexasulfoethylated C₆₀ on rats subjected to focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30(6): 643-9.
 17. Scharff P, Carta-Abelmann L, Siegmund C, Matyshevska OP, Prylutska SV, Koval TV, Golub AA, Yashchuk VM, Kushnir KM, Prylutskyi YuI. Effect of X-ray and UV irradiation of the C₆₀ fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon*. 2004; 42(5-6): 1199-201.
 18. Prylutska SV, Matyshevska OP, Grynyuk II, Prylutskyi YuI, Ritter U, Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol Cryst Liq Cryst*. 2007; 468: 265-74.
 19. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutskyi YuI, Ritter U, Scharff P. C₆₀ fullerene effect on the dynamics of fatigue processes in rat *soleus* muscle after ischemia-reperfusion. *Biotechnol Acta*. 2014; 7(3): 43-51.
 20. Ogloblya OV, Prylutskyi YuI, Strzhemechny YuM. Peculiarities of conductance of carbon nanotube-based quantum dots. *Int J Quantum Chem*. 2010; 110: 195-201.
 21. Rud Yu, Buchatskyi L, Prylutskyi Yu, Marchenko O, Senenko A, Schütze Ch, Ritter U. Using C₆₀ fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent viruses. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012; 27(4): 614-7.
 22. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg Res*. 2011; 171(1): 175-82.
 23. Defraigne JO, Pincemail J. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. *Physiopathol Prevent Acta Chir Belg*. 1998; 98(4): 176-86.
 24. Khoma OM, Zavodovskiy DA, Nozdrenko DM, Dolhopolov OV, Miroshnichenko MS, Motuzjuk OP. Dynamics of ischemic skeletal *soleus* muscle contraction of the rat. *Fiziol Zh*. 2014; 60(1): 34-40 [Ukrainian].
 25. Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99(1): 163-71.
 26. Andreichenko KS, Prylutska SV, Medynska KO, Bogutska KI, Nurishchenko NE, Prylutskyi YuI, Ritter U, Scharff P. Effect of fullerene C₆₀ on ATPase activity and superprecipitation of skeletal muscle actomyosin. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(2): 20-6.
 27. Rácz IB, Sarkadi L, Hamar J. The functional damages of ischemic/reperfused skeletal muscle. *Acta Physiol Hung*. 1996; 84(3): 205-16.
 28. Korthals JK, Maki T, Gieron MA. Nerve and muscle vulnerability to ischemia. *J Neurol Sci*. 1985; 71(2-3): 283-90.

Received 22.12.2014

Состояние некоторых физиологических адренергических реакций у белых крыс в процессе развития экспериментального гипертиреоза

Ливанский государственный университет; E-mail: nizar-osman@live.com

В работе изучено действие тиреоидных гормонов на выраженность физиологических реакций при адренергической стимуляции (в дозе $2,0 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 20 мин) в ходе развития экспериментального гипертиреоза. Создано две группы крыс. Животным 1-й группы вводили трийодтиронин. Продолжительность инъекций колебалась от 1 до 12 сут. Следовательно было 12 подгрупп получающих 1, 2, 3 и т.д. вплоть до 12 инъекций гормона. Вторая группа была контрольной. Показано что в процессе развития экспериментального гипертиреоза все физиологические реакции изменяются в соответствии с законом, который может быть описан параболой общего вида при значении степени в уравнении, равной трем.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение состояния физиологических адренергических реакций при различном тиреоидном статусе являлось предметом многочисленных исследований [1, 3, 4, 7]. Однако вопрос о характере действия тиреоидных гормонов на выраженность физиологических реакций при адренергической стимуляции остается открытым [1, 2, 5]. На наш взгляд, это может быть связано с тем, что в различных работах состояние адренергических реакций при гиперфункции щитовидной железы (либо при экспериментальном гипертиреозе) оценивалось при разной степени гипертиреоза – от слабой до выраженного тиреотоксикоза.

Цель настоящей работы – изучение физиологических адренергических реакций в ходе развития экспериментального гипертиреоза. Предполагалось, что в результате такого сравнительного подхода возможно будет выявить закономерности изменения состояния изучаемых реакций в зависимости от степени экспериментального гипертиреоза.

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на 90 белых взрослых крысах-самцах массой 250-300 г. У крыс первой группы экспериментальный гипертиреоз вызывали путем подкожного введения водного раствора трийодтиронина в дозе 100 мкг/кг в сутки. Продолжительность инъекций колебалась от 1 до 12 сут. В связи с этим условно выделялись группы животных (по 5-7 крыс в каждой), получавших 1, 2, 3 и т.д. вплоть до 12 инъекций гормона. Всего, следовательно, было 12 групп. Вторая группа (8 крыс) была контрольной. У всех животных исследовали три типа физиологических реакций, стимулируемых катехоламином (3-адренергического типа действия потребления кислорода) и термогенное (по приросту температуры тела) действие вводимого катехоламина. Соответственно, использовали метод ЭКГ (электрокардиограф), электронный газоанализатор “radiometer” и электрический ректальный термометр. Ход опыта был

следующим. Животных наркотизировали (этамилал натрия, внутривенно в дозе 50 мкг/кг), после чего в дорсальную вену пениса вводили полиэтиленовую канюлю, а внутривенно – датчик электротермометра; ЭКГ-электроды накладывали в 1-м стандартном отведении. После измерения ректальной температуры, величины потребления кислорода и частоты сердечных сокращений включался инфузор и начиналась инфузия изопропилнорадреналина. Катехоламин вводили в течение 20 мин в дозе 2,0 мкг·кг⁻¹·мин⁻¹. Полученные экспериментальные результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе анализа представляют интерес результаты, касающиеся динамики исходных значений исследуемых физиологических показателей при развитии экспериментального гипертиреоза.

По данным табл. 1 видно, что между значениями изучаемых физиологических показателей и продолжительностью введения трийодтиронина существует выраженная связь. Экспериментальный материал позволяет установить характер зависимости между выраженностью гипертиреоза и степенью тахикардии. Использование способа наименьших квадратов и принципа минимальной среднеквадратической погрешности аппроксимации позволило рассчитать соответствующее корреляционное уравнение:

$$\text{ЧСС} = 332 + 75n - 8,41n^2 + 0,3372n^3,$$

где ЧСС - ожидаемая частота сердечных сокращений, мин⁻¹; n - число инъекций трийодтиронина.

В процессе развития экспериментального гипертиреоза наступали выраженные изменения и со стороны других исследуемых показателей – величины потребления кислорода и ректальной температуры (см. табл. 1).

Характер развития названных симптомов также может быть описан соответствующими

уравнениями:

$$\begin{aligned} V\text{O}_2 &= 9,73 + 3,81n - 0,494n^2 + 0,0297n^3 \\ T^{\circ}\text{рект.} &= 34,5 + 1,83n - 0,236n^2 + 0,01068n^3, \end{aligned}$$

где $V\text{O}_2$ и $T^{\circ}\text{рект.}$, соответственно, скорость поглощения кислорода (мкг·кг⁻¹·мин⁻¹) и ректальная температура.

На следующем этапе нашей работы в основном исследовали выраженность ряда адренергических физиологических реакций (табл. 2).

Следует отметить, во-первых, при использованной модели формирования гипертиреоза многократные инъекции трийодтиронина всегда на определенном этапе усиливали выраженность исследуемых физиологических адренергических реакций. Так, величина положительного хронотропного эффекта инфузируемого изопропилнорадреналина (ИНА) превышала контрольный уровень уже после 3-й инъекции тиреоидного гормона (см. табл. 2), а калоригенное (по приросту потребления кислорода) и термогенное (по приросту ректальной температуры, действие ИНА – после 7-й инъекции).

Во-вторых, выраженность изучаемых физиологических реакций в ответ на стимуляцию катехоламином ИНА на разных этапах развития гипертиреоза была неравнозначной. Так, положительный хронотропный эффект ИНА, начиная с 11-й инъекции трийодтиронина уже не увеличивался, а возвращался к контрольному уровню, а после 12-й инъекции был даже меньше него (см. табл. 2). Аналогичным образом изменялся и термогенный эффект ИНА: до 11-й инъекции трийодтиронина возрастал, после чего возвращался к уровню контроля (см. табл. 2). Что же касается калоригенного эффекта ИНА, то вплоть до окончания экспериментального периода его величина существенно превышала уровень, регистрируемый у контрольных животных (см. табл. 2).

В-третьих, характер изменения выраженности физиологических адренергических реакций у крыс на разных этапах развития

Таблица 1. Зависимость между числом инъекций триходтиронина некоторыми физиологическими показателями.

Показатель	Контроль	Экспериментальный гипертиреоз (число инъекций трийодтиронина)										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Частота сердечных сокращений, мин ⁻¹	427±21	462±31	494±8*	486±21*	540±30*	550±23*	584±20*	590±18*	574±21*	552±22*	564±18*	627±19*
Ректальная температура, °С	36,9±0,3	37,4±0,2	38,1±0,3*	38,5±0,1*	39,4±0,2*	39,5±0,1*	39,6±0,1*	39,1±0,1*	39,8±0,1*	39,9±0,4*	40,7±0,4*	40,9±0,3*
Потребление кислорода, мкг·кг ⁻¹ ·мин ⁻¹	17±0,9	17±2	16±2	17±2	21±2	23±1*	23±1*	25±2*	24±4*	25±2*	35±3*	35±4*
*Р<0,05 относительно контроля.												

*P<0,05 относительно контроля.

Таблица 2. Изменение физиологических показателей у крыс опытных и контрольных крыс при внутривенной инфузии изопропиладреналина в дозе 2,0 мкг/кг/мин.

Показатель	Контроль	Экспериментальный гипертиреоз (число инъекций трийодтиронина)										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Прирост частоты сердечных сокращений, мин ⁻¹	60±8	82±11	89*±7	81±21	74±12	70±10	62±8	58±10	114±18*	144±52*	70±13	35±10*
Изменение ректальной температуры, °С	-1,1±0,1	-1,2±0,2	-1,0±0,1	-0,8±0,4	-0,8±0,4	-0,6±0,5	-0,2±0,3*	-0,1±0,1*	+0,6±0,3*	+0,4±0,4*	0,3±0,1*	-0,8±0,4
Прирост потребления кислорода, мкг·кг ⁻¹ ·мин ⁻¹	3±1	+4±1	+6±2	+7,2	+6±1	+5±2	+12±3*	+9±2*	+8±2*	+10±2*	+9±2*	+10±2*

*P<0,05 относительно контроля.

*P<0,05 относительно контроля.

гипертиреоза имел принципиально разные закономерности. Так, для хронотропного эффекта ИНА на определенном этапе развития гипертиреоза характерна зависимость, описываемая уравнением прямой линии ($ДЧСС = 91,1 - 2,6 n$) при низком отрицательном значении коэффициента регрессии. Однако в дальнейшем характер зависимости данного показателя от числа инъекции трийодтиронина описывался уже типичным уравнением параболы: $ДЧСС = 1997,3 + 346,2 n - 22,3 n^2$, где n - число инъекций трийодтиронина.

Термогенный эффект ИНА на первом этапе развития гипертиреоза также описывался уравнением прямой линии:

$$\Delta T^{\circ}_{\text{рект.}} = -1,5 + 0,2 n,$$

а в последующем уравнением параболы:

$$\Delta T^{\circ}_{\text{рект.}} = -20,8 + 4,4 n - 0,2 n^2.$$

Третья изучаемая физиологическая адренергическая реакция (калоригенная) в целом хорошо описывается уравнением типа:

$$\Delta V O_2 = 1,72 + 7,85 \lg n.$$

Таким образом, результаты исследования показали, что характер выраженности изученных физиологических адренергических реакций, участвующих в обеспечении постоянства температуры тела, на разных этапах развития гипертиреоза качественно различается.

Полученные в работе результаты позволяют объяснить противоречивость литературных данных [1, 3, 6-8] относительно состояния адренергических реакций при различном тиреоидном статусе.

ВЫВОДЫ

1. В процессе развития экспериментального гипертиреоза использованной модели три классических его симптома (тахикардия, гиперметаболизм и повышенная температура тела) изменяются в соответствии с определенным законом, который может быть достаточно полно описан параболой общего вида (в частности, одной из ее ветвей)

при значении степени в уравнении, равной трем.

2. На первых этапах развития экспериментального гипертиреоза (до 7-8 инъекций гормона в дозе $100 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) выраженность хронотропной и термогенной адренергических реакций изменяется по линейному закону. На более поздних этапах их характер качественно изменяется и описывается уравнением параболы. Характер изменения калоригенной реакции на всех этапах формирования гипертиреоза описывается логарифмическим уравнением.

Nizar Salim Osman, Mohsen Ismail

THE STATUS OF CERTAIN PHYSIOLOGICAL ADRENERGIC RESPONSES IN ALBINO RATS DURING DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM

In this paper we investigated the effects of thyroid hormones on the expression of physiological reactions during adrenergic stimulation (20 min at a dose of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) during the development of experimental hyperthyroidism. Rats were divided into two groups. The animals in Group 1 were injected with triiodothyronine. The duration of injection ranged from 1 to 12 days. Consequently, 12 subgroups were formed. The second group was the control group. It is shown that in the process of development of experimental hyperthyroidism all physiological responses vary in accordance with the law, which can be described by a parabola of general form with the value of the degree in the equation equal to three.

REFERENCES

1. Гольбер Л.М., В.И. Кандор, И.В. Крюкова. Гипертиреоз и симпат-адреналовая система. М.: АН СССР, 1978. 100с.
2. Соболев В.И., Мерхелевич Л.Г., Масхудов М.С. Влияние экспериментального гипер- и атиреоза на температурную зависимость некоторых адренергических реакций / Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1995. Т.81. №2. С.76-80.
3. Тапбергенов С.О. Взаимоотношения и особенности адренергической и тиреоидной регуляции ферментов энергетического обмена / Пробл. эндокринол. 1982. №4. С. 67-73.
4. Harrison T.S. Adrenal medullary and thyroid relationship / Physiol. Rev. 1964. Vol.44. № 2. P.161-85.
5. Kunos G. , Preiksatis H.G. Induced changes in adreno-receptor properties / Rec. Adv. Pharmacol. Adrenore-

- ceptors. Proc. Satell. Symp. 7th Int. Congr. Pharmacol. Manchester, 24th-26th July; 1978. Amsterdam, 1978. P.209-16.
6. Threatte R. M., Barney C. C. et. al. Dependence of beta-adrenergic responsiveness on thyroid state of male rats. Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol. 1983. Vol.10. № 2. P.101-14.
7. Sobolev V.I. Influence of α - and β -adrenoblockers on the calorigenic effect of epinephrine in rats with experimental hyperthyroidism / Neurosci. Behav. Physiol. 1981. Vol.11. № 4.
8. Sulakhe Susan J., Wilson Thomas R. The impact of hypothyroidism and thyroxine replacement on the expression of hepatic α 1-, α 2- and β 1-adrenergic receptors in rat liver plasma membranes / Gen. pharmacol. 1988. Vol. 19. № 3. P.489-94.

*Материал поступил в
редакцию 30.09.2014*

Д.В. Голишкін¹, Т.М. Фалалєєва¹, К.С. Непорада², Т.В. Берегова¹

Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; ²Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава;
E-mail: dgolyshkin@gmail.com

*Вивчали вплив меланіну дріжджеподібних грибів *Nadsoniella nigra* штаму Х1 на концентрацію адренкортикотропного гормону (АКТГ) і кортизолу в сироватці крові щурів, а також зміни коефіцієнта маси надниркових залоз і ураження слизової оболонки шлунка (СОШ) в умовах нервово-м'язового напруження за Сельє. Введення меланіну відновлювало функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі, що підтверджувалося зростанням концентрації АКТГ на 42% і зниженням кортизолу на 19% відносно 2-ї групи тварин, яким перед моделюванням стресу вводили воду. Коефіцієнти маси надниркових залоз щурів, яким вводили меланін, не відрізнялися статистично значущо від групи контролю. Меланін зменшував площу виразкових уражень СОШ на 64%, а також вільного оксипроліну в СОШ на 29%, вільної фукози на 16% і гексуронових кислот на 24% у порівнянні з 2-ю групою щурів. Зроблено висновок, що в механізм стреспротективної дії меланіну залучені його вплив на виділення глюкокортикоїдів та запобігання деполімеризації колагену і сполук екстрацелюлярного матриксу СОШ. Меланін проявляє властивості гастропротектора і є перспективним засобом для профілактики та лікування наслідків дії стресу на організм.*

Ключові слова: меланін; кортизол; адренкортикотропний гормон; слизова оболонка шлунка; стрес.

ВСТУП

У рамках пошуку стреспротективних сполук нами було виявлено ефективність меланіну – біологічного пігменту, похідного поліфенольних сполук, отриманого з дріжджеподібних грибів *Nadsoniella nigra* штаму Х1. Профілактичне введення меланіну попереджало виникнення уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє оскільки йому властива потужна антиоксидантна дія [1]. Ducrest та співавт. [2] показали, що хребетні тварини, які мають темніше забарвлення шкіри, а отже з більш інтенсивним синтезом меланіну, є стійкішими до дії стресу.

Залишаються поодинокими повідомлення щодо впливу меланіну на основні ланки

стреслімітуючої системи, а також на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозну (ГГН) вісь. Є відомості що у щурів при введенні меланіну на тлі хронічного стресу вміст кортизолу зменшується [3]. Однак недослідженим залишається вплив гострого стресу на цей показник і на концентрацію адренкортикотропного гормону (АКТГ).

У засобах підтримки гомеостазу СОШ важливу роль відіграє збереження структури колагенових і неколагенових білків слизу. Біохімічною основою слизового бар'єра шлунка є протективні сполуки: нейтральні та кислі глікопротеїни, глікозаміноглікани, колагенові білки, вміст продуктів розпаду яких збільшується за умов дії стресу [4,5]. Враховуючи відсутність даних щодо вмісту

© Голишкін Д.В., Фалалєєва Т.М., Непорада К.С., Берегова Т.В.

мукополісахаридів (за концентрацією вільної фукози та гексуринових кислот) і колагенових білків СОШ (за концентрацією оксипроліну) на тлі введення меланіну та моделювання стресових умов, вирішення цього питання заповнить одну з прогалин у вивченні механізмів антистресової дії меланіну.

Мета нашої роботи – дослідити вплив меланіну на стан СОШ щурів за розмірами виразково-ерозивних уражень, вмісту вільних протективних сполук слизу та на реакцію ендокринної системи за концентрацією АКТГ і кортизолу у наслідку дії гострого стресу.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 51 самиці білого нелінійного щура, масою 120 – 150 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [6]. Тварини були розділені на 3 групи по 17 тварин у кожній: до 1-ї ввійшли щури, яким вводили воду (контроль), до 2-ї і 3-ї щури, яким перед моделюванням стресу вводили воду і меланін (в дозі 5 мг/кг) відповідно.

Введення рідин, об'ємом 0,5 мл на щура, проводили внутрішньошлунково за 15 хв перед початком досліду. Продуцентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, були дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штаму X1, що висіяні з зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська Антарктична станція “Академік Вернадський”). Стресові ураження викликали методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Цей метод рекомендований Державним фармакологічним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів [7]. Така модель стресу є найбільш наближеною до природних умов, бо поєднує в собі елементи емоційного та фізичного навантаження [8]. Щурів іммобілізували протягом 3 год на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Через 2 год після припинення

знерухомлення їх умертвляли за допомогою цервікальної транслокації, діставали та зважували надниркові залози. Коефіцієнт маси надниркових залоз обчислювали за формулою: $КМ = \text{маса органа (мг)} / \text{маса тіла тварини (г)} \cdot 100$ [7]. Виймали шлунок, розрізали по малій кривизні, вивертали слизовою назовні та промивали. СОШ аналізували на гастроскопі при транслюмінаційному освітленні за допомогою лупи (збільшення у 4 рази). Диференційно підраховували площу виразок і довжину ерозій. З серцевої сумки збирали кров в пробірки, центрифугували 20 хв при +4 °C (2200 g) та відбирали сироватку. Визначали вміст АКТГ та кортизолу у сироватці крові щурів методом імуноферментного аналізу за допомогою комерційних наборів виробництва “DRG International Inc.” (США) та ТОВ НВЛ «Гранум» (Україна) відповідно. Усі зразки були проаналізовані в двох повторях.

У гомогенаті СОШ визначали вміст вільних оксипроліну [9], фукози [10] і гексуринових кислот [11] за стандартними біохімічними методиками.

Одержані результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Уїлка. Оскільки наші результати виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводили за допомогою критерію t Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього значення (m). Значущими вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в сироватці крові щурів 1-ї групи концентрація АКТГ і кортизолу становила $22,9 \pm 3,7$ пг/мл та $27,4 \pm 3,1$ нмоль/л відповідно. У щурів 2-ї групи, через 2 год після дії стресу, концентрація АКТГ зменшилася відносно групи контролю на 56% ($P < 0,01$), а кортизолу зросла на 320% ($P < 0,001$), що зумовлено відомим негативним зворотним зв'язком між концентрацією кортизолу в

крові і рівнем секреції АКТГ гіпофізом. Введення щурів меланіну перед нанесенням стресу викликало підвищення концентрації АКТГ на 42% ($P<0,05$) та одночасне зниження кортизолу на 19 % ($P<0,05$) відносно значень 2-ї групи (рис. 1, 2). Описане зростання концентрації АКТГ пов'язано зі зменшенням зворотного інгібування його секреції при зниженні концентрації кортизолу.

Одержані результати узгоджуються з даними Чижанської та співавт. [3], які досліджували адаптогенний вплив меланіну за умов дії хронічного стресу у щурів. Вони показали, що концентрація кортизолу у тварин, яким перед початком досліду вводили пігмент істотно зменшувалася відносно значень у тварин, яким вводили воду.

Таким чином, одним з механізмів антистресової дії меланіну є його вплив на гіпофізарно-наднирковозалозну вісь, що призводить до зниження концентрації кортизолу в крові. Одержані результати підтверджені нашими наступними дослідженнями, в яких ми вивчали коефіцієнти маси надниркових залоз. Встановлено, що у щурів 1-ї групи коефіцієнти маси лівої та правої надниркових залоз становили $11,8\pm0,5$ та $14,3\pm0,7$ відповідно. У щурів 2-ї групи ці показники зростали на 53 ($18\pm0,7$, $P<0,001$) та 42%

($20\pm0,6$, $P<0,001$) відповідно, що свідчить про гіпертрофію надниркових залоз, яка є результатом підвищеного синтезу та секреції кортикостероїдів, в т.ч. кортизолу. Коефіцієнти маси лівої та правої надниркових залоз щурів, яким перед моделюванням стресу вводили меланін, статистично значущо не відрізнялися від контролю, що підтверджує виражену стреспротективну активність меланіну (рис. 3).

Раніше нами було встановлено, що профілактичне введення меланіну зменшує інтенсивність перекисного окиснення ліпідів у СОШ щурів [1]. Відомо, що активні форми кисню (АФК) посилюють виділення прозапальних цитокінів. Так, показано, що АФК можуть підвищувати вміст фактора некрозу пухлин α (TNF- α) в альвеолярних макрофагах мишей в умовах отруєння кремнеземом, що ще більше посилює оксидативний стрес [12]. Зростання інтенсивності запальних процесів за умов виділення прозапальних цитокінів зумовлює активацію осі ГГН [13]. Надмірна кількість кортикостероїдів порушує процеси мікроциркуляції в СОШ, погіршує продукцію слизу, що в свою чергу зумовлює збільшення ураженості в шлунку [14]. Профілактичне введення меланіну зменшує утворення АФК, що відповідно пом'якшує перебіг запального

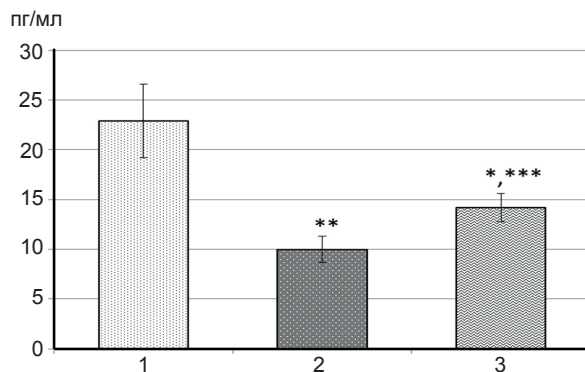


Рис. 1. Концентрація адренокортикотропного гормону в плазмі крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг: 1-контроль, 2-стрес, 3-стрес і меланін ($n=7$).

* $P<0,05$, ** $P<0,01$ у порівнянні з контролем; *** $P<0,05$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

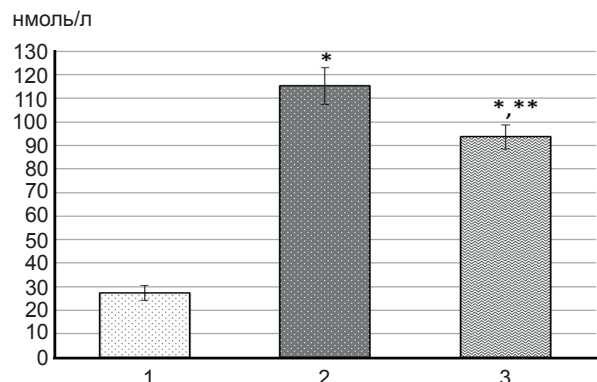


Рис. 2. Концентрація кортизолу в плазмі крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг: 1-контроль, 2-стрес, 3-стрес і меланін ($n=7$).

* $P<0,001$ у порівнянні з контролем, ** $P<0,05$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

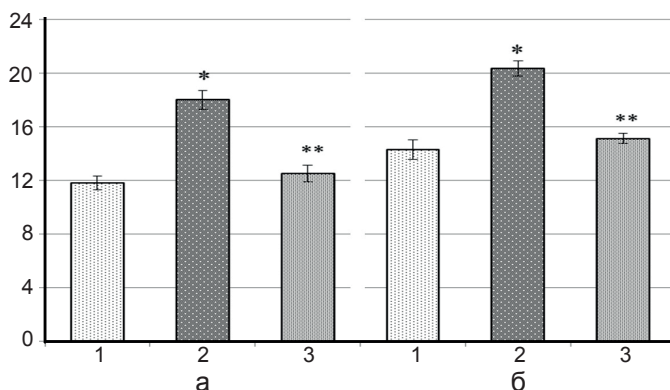


Рис. 3. Коефіцієнт маси лівої (а) та правої (б) надниркової залози після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг: 1-контроль, 2-стрес, 3-стрес і меланін (n=10).

* $P < 0,001$ у порівнянні з контролем, ** $P < 0,001$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

процесу і призводить до зменшення виділення кортикостероїдів. Таким чином уражувачий вплив стресу на СОШ зменшується.

Слід відмітити, що після моделювання стресу в СОШ щурів контрольної групи розвивались виразки та ерозії, площа та довжина яких відповідно становили $9,5 \pm 2,4$ мм² та $14,5 \pm 2,4$ мм із розрахунку на один шлунок. У групі щурів, яким до початку дії стресу вводили меланін, ураженість була значно меншою. Меланін на 64% ($P < 0,05$) зменшував площу виразок (рис. 4). При зменшенні довжини ерозій не спостерігалось статистично значущих змін. Отримані результати дають змогу розглянути меланін як адаптоген природного походження, що має цитопротекторний вплив, зменшуючи концентрацію глюкокортикоїдів у крові до значень, у яких вони чинять протективну дію [15].

Стабільність та відновлення слизового бар'єру забезпечується підтримкою нерво-трофічного постачання його структур. Цей процес характеризується надходженням поживних речовин, кисню та утилізацією таких продуктів обміну, як вуглекислий газ, вільнорадикальні сполуки тощо. Емоційно-фізичне навантаження провокує дезінтеграцію вегетативної нервової системи, що є причиною підвищення секреції шлункового соку та тривалого спазму судин шлунка. Локальне сповільнення кровопостачання зу-

мовлює ішемію відповідних ділянок шлунка. За умов ішемії спостерігається накопичення пуринів, лактату, двоокису вуглецю та інших метаболітів на фоні зниження концентрації кисню в тканині [16]. Відновлення циркуляції крові за допомогою компенсаторних механізмів, як наприклад активація ендотеліальної синтази оксиду азоту, призводить до реперфузійної гіперемії. Клітини усіх шарів стінки шлунка, у тому числі слизового бар'єру, за умов гіперемії, після кисневого голодання, активно споживають кисень, генеруючи перекисні сполуки, що призводить до ураження клітинних мембран та вільнорадикального ульцерогенезу [16].

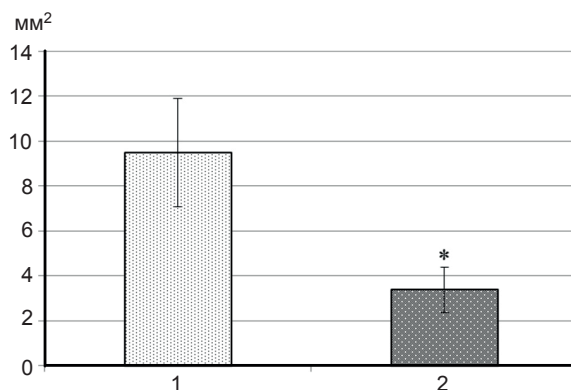


Рис. 4. Площа виразок у слизовій оболонці шлунка щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг: 1-стрес, 2-стрес і меланін (n=10).

* $P < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Під час запального процесу у зоні ураження СОШ підвищується синтез фактора росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактора росту (IGF-1), а також трансформуючого фактора росту β (TGF- β). Вони активують трансформацію фібробластів сполучної тканини у міофібробласти, сприяють ангіогенезу та наступному реепітелізаційному процесу [17]. Під контролем цитокінсигнальної системи (TGF- β) фібробластами сполучної тканини шлунка синтезуються колаген та сполуки екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ - фібрoneктин, глікозаміноглікани, протеоглікани та гіалуронова кислота). Це основні компоненти, необхідні для відновлення уражених ділянок СОШ за допомогою формування нового сполучнотканинного матриксу для стягування країв виразково-ерозивних уражень та забезпечення основи для міжклітинної адгезії, росту та диференціації клітин. Активація імунної відповіді й запального процесу збільшує системний вміст глюкокортикоїдів, що за умов їх надмірного впливу призводить до зниження синтезу цитокінів, мембранних ліпідів та простагландинів [17]. Це зумовлює зниження утворення колагену та сполук ЕЦМ, тоді як їх наявність в СОШ у вільній формі може вказувати на патологічні зміни слизової оболонки, що супроводжуються руйнуванням сполучної тканини. При цьому ускладнюється процес відновлення слизового бар'єру та рубцювання виразкових уражень. За таких умов відбувається руйнування СОШ, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуринових кислот [4,5].

Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити вплив меланіну на стан слизово-епітеліального бар'єру. Встановлено, що після дії стресу в тканині СОШ вміст вільного оксипроліну зростав на 73,2% ($P < 0,001$) порівняно з групою контролю, що свідчить про активацію колагенолітичних процесів (таблиця). При введенні меланіну вміст вільного оксипроліну в СОШ значущо знижувався на 29% ($P < 0,001$) порівняно з 2-ю групою шурів. Nasebe та співавт. [4] показали важливість

оксипроліну як одного з основних маркерів ульцерогенезу за умов водно-імобілізаційного стресу. Тоді як інші автори [18] відмічають необхідність колагену у клітинній диференціації та швидкості гоєння виразкових уражень при етаноліндукованому ульцерогенезі. Отже, меланін може виступати важливим елементом захисту структурної цілісності СОШ за умов дії стресу різного генезу.

Сполуки ЕЦМ також є місцем прикріплення шлункового патогена *Helicobacter pylori*. Зазначена взаємодія можлива через Lewis^b-антиген, фукозильований глікан, що містить $\alpha(1,2)$ -та $\alpha(1,4)$ -зв'язану фукозу. Фукоза - структурний моносахарид СОШ, що бере участь у лейкоцит-ендотеліальній адгезії, взаємодії хазяїн-мікроб та міжклітинній взаємодії через Notch-сигнальну систему [19]. Показано, що *H. pylori* проявляє властивості молекулярної мімікрії, тобто здатна до продукування Lewis^b-подібних структур хазяїна таких, як Lewis^x, Lewis^s та Lewis^b. Експресія вищезазначених фукозильованих гліканів *H. pylori* може індукувати ураження шлункового епітелію, що призводить до атрофічного гастриту у людей інфікованих ним [19]. Отже, ідентифікація підвищеного вмісту фукози у СОШ може слугувати маркером її ураження. Показано, що гострий стрес призводив до збільшення вмісту вільної фукози в слизовому бар'єрі на 55% ($P < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Після введення меланіну, відмічалось статистично значуще зменшення цього компонента в пристінковому слизі на 16% ($P < 0,001$) порівняно з 2-ю групою шурів (див. таблицю). Таким чином, меланін запобігає деградації фукопротеїнів сполучної тканини слизово-епітеліального бар'єру шлунка за умов дії стресу.

Також після нервово-м'язового напруження вміст вільних гексуринових кислот у пристінковому слизі шлунка збільшувався на 75% ($P < 0,001$) порівняно з групою контролю. При профілактичному введенні меланіну цей показник зменшувався на 24% ($P < 0,001$) порівняно з щурами, яким вводили воду (див. таблицю).

Вміст продуктів деградації захисних сполук (мкмоль/г) у пристінковому слизі шлунка щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контроль	Стресс	Стрес і меланін
Оксипролін	1,98±0,07	3,43±0,14*	2,44±0,08***
Фукоза	5,27±0,27	8,14±0,13*	6,81±0,26***
Гексуронові кислоти	0,75±0,04	1,31±0,04*	0,99±0,05***

* $P < 0,001$ у порівнянні з контролем; ** $P < 0,001$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Наші результати свідчать, що меланін ефективно захищає СОШ від деградації глікозаміногліканів.

Отже, профілактичне введення меланіну попереджувало деполімеризацію колагену та сполук ЕЦМ шлунку, свідченням чого є зменшення відповідно концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот. При цьому цілісність слизового бар'єру була наближеною до значень контрольних щурів, що узгоджується з результатами макроскопічного аналізу СОШ. Отримані результати свідчать, що одним з механізмів гастропротекторної дії меланіну є його проникнення через центральну гідрофобну зону клітинних мембран та реалізацію антиоксидантної дії. Такий механізм був запропонований на основі попередньо отриманих змін вольт-амперних характеристик модельних бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ) за умов збільшення концентрації меланіну у навколосмембранному розчині. Так, нами було встановлено, що при збільшенні концентрації меланіну в діапазоні 10^{-9} - 10^{-6} моль/л підвищувалася питома провідності ліпідного бішару та зменшувалася його ємність. Подальше збільшення концентрації меланіну в діапазоні 10^{-6} - 10^{-5} моль/л характеризувалося зменшенням питомої провідності та стабілізуванням електричної ємності БЛМ [20]. Такий ефект можна пов'язати з можливістю накопичення в об'ємі мембрани меланіну для формування додаткового структурного та антиоксидантного бар'єру СОШ.

ВИСНОВКИ

1. Меланін запобігає гіперактивації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі

за умов дії стресу, що підтверджувалося відновленням вмісту кортизолу і адренокортикотропного гормону та зменшенням коефіцієнта маси надниркових залоз.

2. Введення меланіну захищає слизову оболонку шлунку щурів від виразкових уражень, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє.

3. Профілактичне введення меланіну попереджає деполімеризацію колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу шлунку, свідченням чого є зменшення відповідно концентрації вільного оксипроліну, вільної фукози та гексуронових кислот.

4. Меланін проявляє властивості гастропротектора і є перспективним засобом для профілактики та лікування наслідків дії стресу на організм.

Робота виконана за підтримки та на замовлення Держінформнауки ДУ «Національний антарктичний науковий центр» Міністерства освіти і науки України №Н/6-2012 (12ДФ036-08) від 01 серпня 2012 р. «Визначення механізму профілактично-лікувальної дії біологічно активних речовин, виділених з антарктичних організмів». Державний реєстраційний номер 0112U004870.

Д.В. Голышкин¹, Т.М. Фалалеева¹,
К.С. Непорада², Т.В. Береговая¹

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И РЕАКЦИЮ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ ОСИ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА

Изучали влияние меланина дрожжеподобных грибов *Nadsoniella nigra* штамма X1 на концентрацию адрено-

кортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола в сыворотке крови крыс, а также изменения коэффициента массы надпочечников и поражение слизистой оболочки желудка (СОЖ) в условиях нервно-мышечного напряжения по Селье. Введение меланина восстанавливало функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что подтверждалось ростом концентрации АКТГ на 42% и снижением кортизола на 19% относительно 2-й группы животных, которым перед моделированием стресса вводили воду. Коэффициенты массы надпочечников крыс, которым вводили меланин, не отличались статистически значимо от контроля. Меланин уменьшал площадь язвенных поражений СОЖ на 64%, а также снижал содержание свободного оксипролина в СОЖ на 29%, свободной фукозы на 16% и гексуроновых кислот на 24% в сравнении с 2-й группой крыс. Сделано вывод, что в механизм стресспротективного действия меланина вовлечены его влияние на выделение глюкокортикоидов и предотвращение деполимеризации коллагена и соединений экстрацеллюлярного матрикса СОШ. Меланин проявляет свойства гастропротектора и является перспективным средством для профилактики и лечения последствий воздействия стресса на организм. Ключевые слова: меланин; кортизол; аденокортикотропный гормон; слизистая оболочка желудка; стресс.

Golyshkin D.V.¹, Falalyeyeva T.M.¹, Neporada K.S.², Bereгова T.V.¹

THE INFLUENCE OF MELANIN ON THE GASTRIC MUCOSA AND HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENOCORTICAL AXIS UNDER ACUTE STRESS CONDITIONS

We studied the influence of melanin from yeast-like fungi *Nadsoniella nigra* strain X1 on the changes of the levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol in blood serum of rats, adrenal glands weight ratio and lesions of the gastric mucosa (GM) caused by neuromuscular tension by Selye. Melanin administration restored functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis that was evident by an increase of ACTH concentration by 42% and a decrease of cortisol concentration by 19% compared to the rats injected with water (group 2). In rats treated with melanin, the adrenal glands weight ratio, didn't differ from intact control group of the rats. Melanin decreased ulcers area by 64% and reduced the content of free hydroxyproline by 29 %, the free fucose by 16% and the free hexuronic acids by 24% in the GM compared to the group 2 of the rats. It is established that the mechanism of melanin stress-protective properties are based on its regulation of the glucocorticoids secretion and prevention of GM collagen and extracellular matrix substances depolymerization. Melanin possesses gastroprotective properties and is a perspective agent for preventing and treatment of consequences of the stress influence on the organism.

Key words: melanin; cortisol; adrenocorticotrophic hormone; gastric mucosa; stress.

¹ESC "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University, Kyiv

²Higher medical educational institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

REFERENCES

- Golyshkin D, Savytskyi Ya., Falalyeyeva T. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension according to Selye. *Annales universitatis Mariae Curie – Skłodowska*. 2010; (2):251-5.
- Ducrest AL, Keller L, Roulin A. Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends Ecol Evol*. 2008; 23(9):502-10.
- Chyzhanska NV. Influence of the melanin on cortisol level in rats blood before and after the stress. *Bulletin of biology and medicine problems*. 2007; (1):40-4. [Ukrainian]
- Hasebe T. Collagen and collagenase in ulcer tissue-2. Restraint and water immersion induced gastric lesions and effects of cimetidine and misoprostol. *Tokai J Exp Clin Med* 1987; 12(3):181-90.
- Skrypnyk IM. Biochemical mechanism of ulcer development under stressful conditions. *Ukr. Biokhim. Zh*. 2001; 73(1):110-4. [Ukrainian]
- Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act. *Vet Q*. 1986; 8(4):346-9.
- Stefanova OV. Preclinical studies of drugs: guidance. Kyiv: Avicena; 2001. [Ukrainian]
- Ader R. Psychoneuroimmunology. San Diego: Cohen Academic Press; 2001.
- Tetyanets SS. Method for determination of free oxyproline in serum. *Lab delo*. 1985; (1) :61-2. [Russian]
- Sharaev PN, Strelkov NS, Kildiyarova RR. Method for determination of fucose is not bound to proteins. *Clin lab diagnostica*. 1997; (4):17-8. [Russian]
- Sharaev PN. Method for determination of glycosaminoglycans in biological fluids. *Lab delo*. 1987; (5):530-2. [Russian]
- Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN. Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 158 (3):211-20.
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G. et al. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987 Oct 23; 238 (4826):522-4.
- Dekanski JB, Macdonald A, Sacra P. Effects of fasting, stress and drugs on gastric glycoprotein synthesis in the rat. *Br J Pharmacol*. 1975; 55 (3):387-92.
- Filaretova L. Glucocorticoids are Gastroprotective under Physiologic Conditions. *Ther Adv Chronic Dis*. 2011; 2(5):333-42.
- Schirmer CM, Kornbluth J, Heilman CB, Bhardwaj A. Gastrointestinal prophylaxis in neurocritical care. *Neurocrit Care*. 2012 ;16(1):184-93.
- Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur*

- Surg Res. 2012;49(1):35-43.
18. Arisawa T, Shibata T, Kamiya Y., et al. Effects of sucral-fate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxy-proline content in healing of ethanol-hcl-induced gastric lesions. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33(7):628-32.
19. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. Glycobiology. 2003;13(7):41-53.
20. Golyshkin D, Rybalchenko V, Bychko A, Beregova T, Falalyeyeva T. Influence of melanin on electrical characteristics of model bilipid membranes (in vitro). Bulletin of Taras Shevchenko national university of Kyiv. 2014; 66(1): 90-2. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до
редакції 03.09.2014*

Л.Х.М Хассунех

Накопление диацилглицерина нарушает краткосрочную активацию тироксином фосфолипазы Д в клетках печени

Университет Аль-Исра, Амман, Иордания, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина; E-mail: loay.hassouneh@ju.edu.jo

Изучали влияние модуляции содержания эндогенных диацилглицеринов (ДАГ) в изолированных гепатоцитах на краткосрочное действие L-тироксина (LT₄). Эксперименты проводили на меченых [¹⁴C]пальмитиновой и [¹⁴C]олеиновой кислотой гепатоцитах 3- и 24-месячных крыс в условиях модуляции содержания ДАГ. Для оценки краткосрочного действия гормона изучали активацию фосфолипазы Д через 2 и 5 мин воздействия LT₄ на клетки. Установлено накопление ДАГ в клетках печени в старости и под действием их предшественника - пальмитиновой кислоты в гепатоцитах молодых крыс. Снижение содержания ДАГ в старых и молодых гепатоцитах, культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты, с помощью активации ДАГ-киназы α -токоферол ацетатом или в результате длительного воздействия LT₄ сопровождается восстановлением способности клеток адекватно отвечать на краткосрочное действие гормона. Эти результаты свидетельствуют о важной роли ДАГ в нарушении активации LT₄ фосфолипазы Д и о существовании взаимодействия долго- и краткосрочных путей регуляции обмена липидов в печени.

Ключевые слова: старение; гепатоциты; пальмитиновая кислота; диацилглицерины; тироксин; фосфолипаза Д.

ВВЕДЕНИЕ

Дицилглицерины (ДАГ) являются важными компонентами метаболических путей обмена глицеролипидов и играют ключевую роль в процессах сигнальной трансдукции. В то же время хроническое накопление в клетках предшествует изменению их чувствительности к действию ряда гормонов и регуляторных факторов. Относительно высокое базальное содержание этих компонентов и мембранно-связанной протеинкиназы С коррелирует с потерей чувствительности клеток отвечать на действие форболовых эфиров, вазопрессина и кальциевого ионофора – A23187 [1, 2]. Индуцированное высокожировой диетой накопление содержания ДАГ в печени и скелетной мышечной ткани сопровождается развитием резистентности клеток к действию

инсулина [3, 4]. В печени они активируют протеинкиназу С ϵ , которая ингибирует киназу инсулинового рецептора, что в свою очередь снижает стимулированное инсулином фосфорилирование тирозина субстрата 1 и 2 инсулинового рецептора, подавляет стимуляцию гормоном фосфатидилинозитол-3-киназы, протеинкиназы – Akt2, снижает синтез гликогена и супрессию глюконеогенеза.

Установлено, что L-тироксин (LT₄) вызывает быструю и кратковременную активацию фосфолипаз С и Д и образование ДАГ в изолированных гепатоцитах молодых крыс, что сопровождается транслокацией протеинкиназы С из цитозоля в мембраны клеток и ее активацией [5]. Нарушение функции щитовидной железы при старении или при действии мерказолила сопровождается накоплением ДАГ в

гепатоцитах и плазматических мембранах клеток [6], что не изменяет перераспределение протеинкиназ С между цитозолем и мембранами, однако снижает общую активность фермента в клетках печени. Было высказано предположение, что накопление ДАГ в клетках и их плазматических мембранах может нарушать сигнальную трансдукцию.

Цель настоящей работы – изучить, влияет ли модуляция содержания эндогенных ДАГ в изолированных гепатоцитах на краткосрочное действие LT_4 .

МЕТОДИКА

Исследования проводили на молодых (3-месячных) и старых (24-месячных) крысах-самцах линии Вистар. Гепатоциты выделяли по методу Петренко и соавт. [7]. Нативность гепатоцитов оценивали с помощью трипанового синего. Выживаемость клеток составила 90 – 96 %. Для изучения содержания вновь синтезированных ДАГ в гепатоцитах молодых и старых крыс клетки ресуспендировали в среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия), содержащей 10%-ю эмбриональную сыворотку (ООО «БиолоТ», Россия), 20 ммоль/л Нерес, пенициллин (61 мг/л), стрептомицин (100 мг/л), до $4 \cdot 10^7$ клеток/мл и инкубировали 3 ч при 37°C в присутствии [^{14}C]пальмитиновой кислоты (0,037 МБк/мл) (2,07 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания). Кусочки печени молодых и старых крыс инкубировали в бикорбонатном буфере Кребса—Рингера, рН 7,4 3 ч при 37°C в присутствии [^{14}C]пальмитиновой кислоты (0,037 МБк/мл) (2,07 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания). После инкубации гепатоциты и кусочки печени отмывали буфером Кребса-Хенселейта с 0,1% BSA («Sigma», США) и использовали для экстракции липидов и разделения ДАГ, как описано ниже. Для увеличения содержания эндогенных ДАГ в гепатоцитах молодых крыс клетки печени

преинкубировали 6 и 24 ч в присутствии 0,75 ммоль/л пальмитиновой кислоты и содержание ДАГ определяли, как описано ранее [6]. С целью его снижения в гепатоцитах преинкубированных с пальмитиновой кислотой в среду инкубации добавляли активатор ДАГ-киназы α -токоферол ацетат (100 мкг/мл). Для изучения краткосрочного действия LT_4 на активность фосфолипазы Д гепатоциты предварительно меченые в течение 24 ч [^{14}C]олеиновой кислотой (0,037 МБк/мл, 2,14 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания) инкубировали 2 и 5 мин в присутствии LT_4 (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль). Для изучения влияния длительного воздействия LT_4 на содержание ДАГ в гепатоцитах и краткосрочную активацию фосфолипазы Д LT_4 клетки печени, меченые [^{14}C]олеиновой кислотой (0,037 МБк/мл, 2,14 ГБк/ммоль, Amersham, GE Health Care, Великобритания) предварительно подвергали воздействию LT_4 (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль) в течение 24 ч. Далее гепатоциты отмывали буфером Кребса-Хенселейта с 0,1%-м альбумином сыворотки быка («Sigma», США) и инкубировали 2 и 5 мин в присутствии LT_4 (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль). Об активации фосфолипазы Д судили по содержанию субстрата фермента [^{14}C]фосфатидилхолина или [^{14}C]фосфатидилэтанола, фосфолипида, который образуется исключительно фосфолипазой Д через трансфосфатидилирование в присутствии этанола [1, 2, 5]. Экстракцию липидов проводили по методу Bligh, Dyer [8], разделение ДАГ – методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия) в системе растворителей – гексан:диэтиловый эфир:ледяная CH_3COOH (73:25:2). Для разделения фосфатидилхолина использовали $CH_3CH_2OCH_2CH_3$ (система 1) и $CHCl_3:CH_3OH:H_2O$ (40:10:1) (система 2). Пятна липидов проявляли в парах йода, идентифицировали, сравнивая со стандартами, и радиоактивность меченых [^{14}C]-

ДАГ, [^{14}C]фосфатидилхолина и [^{14}C]фосфатидилэтанола определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Результаты представлены в виде: среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Для сравнения двух групп использовали критерий t Стьюдента, для сравнения данных полученных в результате множественного воздействия использовали многофакторный дисперсионный анализ. Статистический анализ проводили с помощью StatSoft Statistica v6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активация самых различных метаболических путей может приводить к аккумуляции ДАГ в клетках и тканях [9]. В дополнение к синтезу ДАГ *de novo* в клетках существуют три альтернативных пути их образования: сфингомиелинсинтаза-, фосфолипаза С- и фосфолипаза Д-опосредованных. Следует отметить, что активация сфингомиелинсинтаз и фосфолипаз происходит преимущественно в стимулированных клетках и образующийся при этом ДАГ не используется в метаболических целях, а, взаимодействуя с белками-эффекторами, участвует в процессах сигнальной трансдукции [10, 11]. Несмотря на то, что в клетках поддерживается постоянное, адекватное ее функциональному состоянию, содержание ДАГ, при хроническом действии на клетку различных стрессорных факторов может происходить накопление данного липида как в липидных каплях, так и в мембранах. Установлено, что у старых крыс значительно усиливается синтез ДАГ в присутствии [^{14}C]линоленовой, [^3H]арахидоновой жирных кислот и [^{14}C]CH₃COOH в печени, изолированных гепатоцитах и плазматических мембранах клеток по сравнению с молодыми крысами [6, 12]. Показано, что в печени и изолированных гепатоцитах старых крыс, по сравнению с молодыми животными, двукратно усиливается синтез ДАГ в присутствии [^{14}C]пальмитиновой кислоты, что свидетельствует о том, что в старости

усиливается синтез ДАГ *de novo* (рис. 1).

При длительном культивировании гепатоцитов молодых крыс в присутствии пальмитиновой кислоты также накапливается ДАГ в клетках (рис. 2,а). Учитывая эти результаты можно полагать, что пальмитат имитирует возрастные изменения синтеза ДАГ в клетках печени, что согласуется с ранее проведенными исследованиями. Длительное содержание молодых животных на пищевом рационе, обогащенном насыщенными жирами, приводит к накоплению ДАГ в печени, мышечной ткани и неокортексе [13].

Тиреоидные гормоны, также как и жиры пищевого рациона, являются важными регуляторами липогенеза в печени [14]. Под их контролем находятся ключевые ферменты синтеза липидов: синтаза жирных кислот, ацетил-СоА-карбоксилаза и многие другие. Возрастные или индуцированные лекарственными препаратами нарушения функции щитовидной железы изменяют обмен различных пулов ДАГ в клетках печени [6].

Снижение содержания тиреоидных гормонов, циркулирующих в организме 24- или 3-месячных животных, получавших тиреостатик мерказолил, сопровождается накоплением ДАГ в печени, изолированных клетках и плазматических мембранах гепатоцитов преимущественно за счет усиления их синтеза. Однократная инъекция LT₄ этим животным существенно снижает синтез и массу ДАГ в печени и мембранах клеток. Большая часть эффектов тиреоидных гормонов на гомеостаз липидов связана с ядерными рецепторами и проявляется через длительный период времени с момента действия гормонов на клетки-мишени. Однако, известно, что тиреоидные гормоны могут быстро негеномно в течение секунд и минут модулировать важные сигнальные пути в клетках [15, 16]. Мишенями тиреоидных гормонов являются цитозольные белки (фосфатидилинозитол-3-киназа, протеинкиназы Akt и C, митоген-активируемые киназы. В течение первых

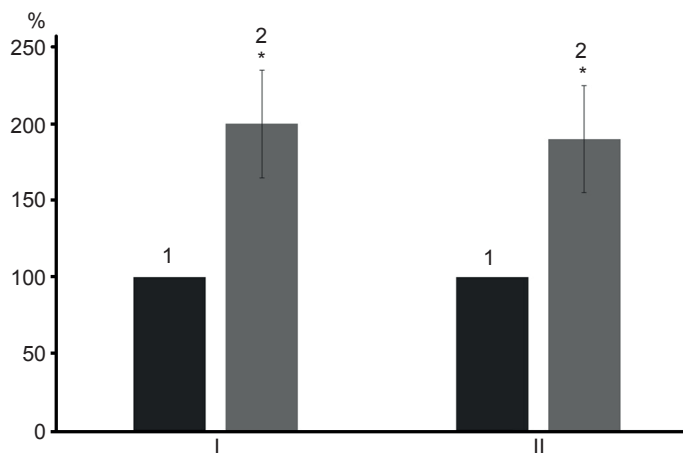


Рис. 1. Содержание вновь синтезированного диацилглицерина в печени (I) и изолированных гепатоцитах (II) 3- (1) и 24-месячных (2) крыс. * $P < 0,05$ относительно 3-месячных крыс

секунд действия LT_4 на гепатоциты происходит активация фосфолипазы С, деградация фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата и кратковременное накопление ДАГ и инозитол-1,4,5-трисфосфата [5, 17]. Образовавшийся под действием LT_4 инозитол-1,4,5-трисфосфат в последующем вызывает мобилизацию ионов кальция из внутриклеточного депо и совместно с ДАГ – активацию и транслокацию в мембраны протеинкиназы С. Последняя в свою очередь приводит к активации фосфатидилхолинспецифичной фосфолипазы Д, гидролазы фосфатидной кислоты и второму более продолжительному пику

ДАГ в гепатоцитах. ДАГ, образующийся в ходе активации фосфолипазы Д и гидролазы фосфатидной кислоты, может усиливать действие тиреоидных гормонов на протеинкиназу С и протеинкиназа С-зависимую активацию данных ферментов и их экспрессию.

Установлено, что несмотря на то, что в гепатоцитах старых крыс, по сравнению с молодыми животными, увеличивается базальное содержание ДАГ, LT_4 не вызывает быструю активацию фосфолипазы Д (рис. 3).

Подобные результаты получены не только при измерении содержания субстрата

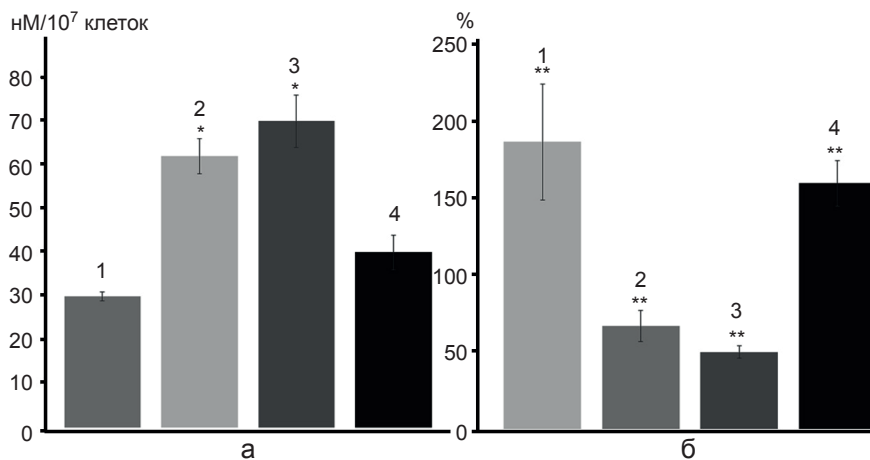


Рис. 2. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание диацилглицерина (а) и краткосрочную активацию тироксином фосфолипазы Д (б) в гепатоцитах 3-месячных крыс. 1 – контроль, 2 – инкубация с пальмитиновой кислотой в течение 6 ч, 3 – в течение 24 часов, 4 – инкубация с пальмитиновой кислотой и α -токоферол ацетатом в течение 24 ч. * $P < 0,05$ относительно контрольных клеток; ** $P < 0,05$ относительно клеток, инкубированных с NaOH

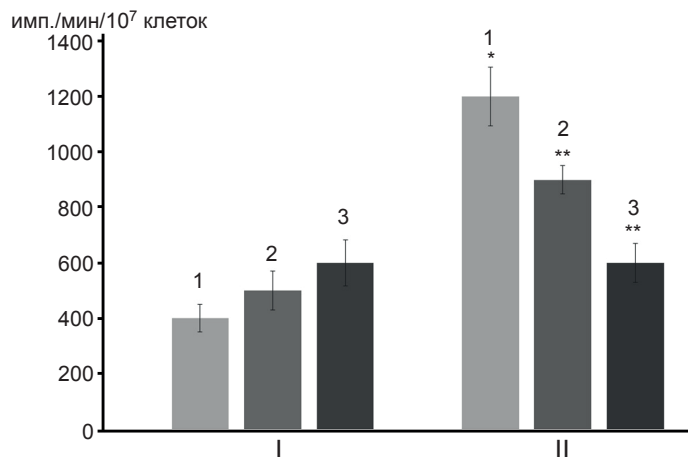


Рис. 3. Влияние длительного воздействия L-тироксина (LT₄) на краткосрочную активацию гормоном фосфолипазы Д в гепатоцитах 24-месячных крыс. I – клетки преинкубированные 24 ч с NaOH. II – с LT₄. 1 – контроль (NaOH), 2 – LT₄ 2 мин, 3 – LT₄ 5 мин. * P<0,05 относительно базального содержания [¹⁴C]фосфатидилхолина; ** P<0,05 различия относительно контроля

фермента [¹⁴C]фосфатидилхолин (рис. 3), но и продукта фосфолипазной реакции [¹⁴C]фосфатидилэтанола. Так, его содержание в контроле, через 2 и 5 мин воздействия LT₄ составляло 1600±170, 1510±160, 1690±195 имп./мин на 10⁸ клеток соответственно. Однако длительное культивирование старых клеток в присутствии LT₄ существенно снижает базальное содержание ДАГ (170±10 и 98,9±7,6 нмоль/10⁷ клеток в контроле и опыте соответственно, P<0,05), повышает базальное содержание субстрата фосфолипазы Д фосфатидилхолина и восстанавливает ответ клеток на краткосрочное действие гормона (рис 3). Снижение базального содержания ДАГ в клетках, предварительно культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты в результате активации ДАГ-киназы с помощью α-токоферол ацетата (рис. 2,а), также восстанавливает способность гепатоцитов отвечать на кратковременное действие гормона (рис. 2,б).

Таким образом, накопление ДАГ в клетках печени старых крыс и индуцированное пальмитиновой кислотой в гепатоцитах молодых животных происходит за счет усиления их синтеза. Однако тот факт, что активация метаболизма липидов приводит к снижению содержания вновь синтези-

рованного ДАГ в гепатоцитах, может свидетельствовать о вкладе ДАГ-киназы в этот процесс. В то же время, коррекция содержания ДАГ в старых клетках с помощью их длительного культивирования в присутствии LT₄ может происходить не путём подавления липогенеза *de novo*, а за счет усиления использования предшественников в синтезе фосфатидилхолина. Снижение содержания ДАГ в старых клетках и молодых гепатоцитах, культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты, с помощью активации ДАГ-киназы или длительного воздействия LT₄ сопровождается восстановлением способности клеток адекватно отвечать на краткосрочное действие гормона. Эти результаты свидетельствуют о важной роли ДАГ в нарушении активации LT₄ фосфолипазы Д и о существовании взаимодействия долго- и краткосрочных путей регуляции обмена липидов в печени.

Л. Х. М Хассунех

НАКОПИЧЕННЯ ДІАЦИЛГЛІЦЕРИНУ ПОРУШУЄ КОРОТКОСТРОКОВУ АКТИВАЦІЮ ТИРОКСИНОМ ФОСФОЛІПАЗИ Д У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ

Вивчали чи впливає модулювання вмісту діацилглицерину (ДАГ) у гепатоцитах на короткострокову дію LT₄.

Для цього експерименти проводили на мічених [^{14}C] пальмітиною чи [^{14}C]олеїною кислотами гепатоцитах 3- та 24-місячних шурів. Для визначення короткострокової дії L-T_4 на клітини вивчали активацію фосфоліпази Д через 2 і 5 хвилин дії гормону. Встановлено накопичення вмісту ДАГ у гепатоцитах старих шурів та молодих клітинах, які інкубували у присутності пальмітинової кислоти. Зниження вмісту ДАГ в клітинах за допомогою активації ДАГ-кінази у присутності альфа-токоферолу ацетату або довгострокової дії LT_4 поліпшувало чутливість клітин до дії гормону. Таким чином, встановлена важлива роль ДАГ у порушенні активації LT_4 фосфоліпази Д у старих шурів та взаємодія між довго- та короткостроковими шляхами регуляції LT_4 метаболізму ліпідів у клітинах печінки. Ключові слова: старіння, гепатоцити, пальмітинова кислота, диацилглицерин, тироксин, фосфоліпаза Д.

Loay Kh.M. Hassouneh

DIACYLGLYCEROL ACCUMULATION IMPAIRS SHORT-TERM ACTIVATION OF PHOSPHOLIPASE D BY THYROXINE IN THE LIVER CELLS.

Thyroid hormones (TG) are known modulators of signal transduction. Phospholipase D (PLD) is one of the targets of TG in the stimulated cells. Response of cells to the short-term TG action significantly reduces at old age. Taking into account that diacylglycerol (DAG) accumulation induces the resistance of cells to some of regulatory factors in the target cells the aim of the present study was to determine if DAG content increase in hepatocytes impairs the L-thyroxine (L-T_4) short-term action. The experiments were performed in either the [^{14}C]palmitic acid- labeled hepatocytes or [^{14}C]oleic acid-pre-labeled liver cells of 3- and 24-month-old rats. To study the short-term L-T_4 action on cells the PLD activation was determined. The DAG production and content in hepatocytes significantly increased at old age and in the young cells pre-treated with palmitic acid. The reduction of DAG level in cells by means of DAG-kinase activator, alfa-tocopherol acetate, or long-term L-T_4 treatment improved the short-term hormone action. The above data have indicated that DAG play important role in the L-T_4 PLD regulation. The cross-talk between classic and non-genomic pathways of TG regulation of lipid metabolism has been determined.

Key words: aging, hepatocytes, palmitic acid, diacylglycerol, thyroxine, phospholipase D.

Faculty of Pharmacy, Al-Isra University, P.O. Box 22, Amman, 11622, Jordan;

Department of Physiology of Ontogenesis, Institute of Biology, Kharkov Karazin National University, 4 Svobody pl., 61022, Kharkov, Ukraine; E-mail: loay.hassouneh@iu.edu.jo

REFERENCES

1. Gustavsson L, Moehern G, Torres-Marquez ME, Benistant C, Rubin R, Hock JB. The role of cytosolic Ca^{2+} , protein kinase C and protein kinase A in hormonal stimulation of phospholipase D in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269:849-859.
2. Pettitt TR, Martin A, Horton T, Liossis C, Lord JM, Wakeham MJO. Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipase C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and function. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activated protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997; 15(5):574-84.
3. Jornayvaz FR, Shulman GI. Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* 2012; 15(5):574-584.
4. Erion DM, Shulman GI. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 2010; 16(4):400-402.
5. Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol [Internet].* 2001 Apr. 2(5). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/2/5>.
6. Krasilnikova OA, Kavok NS, Babenko NA. Drug-induced and postnatal hypothyroidism impairs the accumulation of diacylglycerol in liver and liver cell plasma membranes. *BMC Physiol [Internet].* 2002 Aug. 2(12). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6793/2/12>.
7. Petrenko AIu, Sukach AN, Rosliakov AD. Isolation of rat hepatocytes by a nonenzymatic method: detoxifying and respiratory activity. *Biokhimiia.* 1991; 56(9):1647-51 (Russian).
8. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8):911-917.
9. Carrasco S, Merida I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(1):27-36.
10. Yang C, Kazanietz MG. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24(11):602-608.
11. Brose N, Betz A, Wegmeyer H. Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14(3):328-340.
12. Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Increase in diacylglycerol production by liver and liver cell nuclei at old age. *Exp Gerontol.* 2003; 38:441-447.
13. Babenko NA. Effects of short- and long-term saturated fat-enriched diet on the ceramide and neutral lipids accumulation in the insulin responsive tissues of rats. In: Langella JP, editor. *Saturated fats: Metabolism, Disease Risks and Public Awareness.* New York: Nova Science Publishers; 2012. 71-97.
14. Girard J, Perdureau D, Fougelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by

- nutrients and hormones. FASEB J. 1994; 8(1):36-42.
15. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Front Neuroendocrinol. 2008; 29:211-218.
16. Cordeiro A, Souza LL, Einicker-Lamas M, Pazos-Moura CC. Non-classic thyroid hormone signalling involved in hepatic lipid metabolism. J Endocrinol. 2013 Feb 25; 216(3):R47 - R57.
17. Krasilnikova OA, Kavok NS, Babenko NA. Role of calcium ions in rapid effects of L-thyroxine on phosphoinositide metabolism in rat liver cells. Biochemistry (Moscow). 2003; 68(7):776-782.

*Материал поступил в
редакцию 14.03.2014*

Т. В. Мамонтова, Л. Е. Весніна, М. В. Микитюк, Н. О. Боброва, Л. О. Куценко,
І. Л. Гординська, І. П. Кайдашев

Фулерен C_{60} послаблює вільнорадикальні і деструктивні процеси в сполучній тканині при ад'ювантному артриті у щурів

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики, Українська медична стоматологічна академія, Полтава;
E-mail: tamontova-tv@rambler.ru

Вивчено вплив фулерену C_{60} (FC_{60}) на рівень вільнорадикальних і деструктивних процесів у сполучній тканині суглобів при експериментальному ад'ювантному артриті (АА) у щурів. Продемонстровано антиоксидантний ефект FC_{60} при АА, який проявляється зниженням приросту концентрації малонового діальдегіду в печінці ($13,44 \pm 0,83$ %) і нирках ($18,86 \pm 1,36$ %); і підвищенням активності антиоксидантних ферментів, супероксиддисмутази в печінці ($15,96 \pm 0,38$ мкмоль/кг·с) і нирках ($5,36 \pm 0,27$ мкмоль/кг·с), а також каталази в нирках ($9,56 \pm 0,78$ мкмоль/кг·с) і серці ($2,26 \pm 0,41$ мкмоль/кг·с) у порівнянні з показниками контрольної групи ($43,83 \pm 5,69$ %; $54,55 \pm 6,18$ %; $11,68 \pm 0,52$ мкмоль/кг·с; $3,43 \pm 0,47$ мкмоль/кг·с; $4,77 \pm 0,5$ мкмоль/кг·с; $0,98 \pm 0,12$ мкмоль/кг·с відповідно). Показано протективний ефект FC_{60} при АА, спрямований на пригнічення деструктивних процесів у сполучній тканині, що виражалось зниженням рівня загальної колагенолітичної активності в хрящовій ($10,05 \pm 0,06$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹) і кістковій ($11,21 \pm 0,04$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹) тканинах, вмісту вільного оксипроліну ($1,54 \pm 0,04$ мкг/мл) і активності лужної фосфатази ($1,24 \pm 0,14$ мкмоль/л·с) у порівнянні з показниками контрольної групи ($11,91 \pm 0,49$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹; $13,19 \pm 0,15$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹; $2,25 \pm 0,07$ мкг/мл; $2,19 \pm 0,24$ мкмоль/л·с відповідно). Отримані дані визначають перспективу подальших досліджень дії FC_{60} при ревматоїдному артриті як можливого терапевтичного агента.

Ключові слова: експериментальний ад'ювантний артрит; фулерен C_{60} ; активність антиоксидантних ферментів, загальна колагенолітична активність

ВСТУП

Ревматоїдний артрит (РА) – одне з найбільш поширених системних аутоімунних захворювань. Експериментальною його моделлю є ад'ювантний артрит (АА), який відноситься до категорії прогресуючих хронічних запальних деструктивних артропатій, зумовлених гіперплазією синовіоцитів у поєднанні з посиленою васкуляризацією і інфільтрацією клітинами зони запалення, руйнуванням хрящової і кісткової тканин, проявами системних пошкоджень у різних життєво важливих органах (печінка, нирки, селезінка, серце

тощо) [1]. При АА у тварин спостерігається вивільнення ферментів (еластаз, колагеназ і протеаз) і активація вільнорадикального окиснення (ВРО) під дією реакційноздатних метаболітів кисню, що, безумовно, є однією з ключових причин розвитку запалення, остеокластогенезу і пошкодження суглобів [2]. Тому особливо актуальним стає пошук нових біомедичних засобів, які матимуть цільовий (таргетний) вектор дії при терапії аутоімунних захворювань.

Одним із перспективних шляхів у розробці такої терапії може бути застосування наночасток, які створені на основі фулере-

© Т. В. Мамонтова, Л. Е. Весніна, М. В. Микитюк, Н. О. Боброва, Л. О. Куценко, І. Л. Гординська, І. П. Кайдашев

ну C_{60} (FC_{60}) [3]. FC_{60} - це нова алотропна форма вуглецю, в якій 60 атомів утворюють сферичну молекулу з високою стабільністю, біосумісністю, унікальними фізико-хімічними і біологічними властивостями, які дають змогу активно приєднувати різні радикали, миттєво проходити крізь мембрану клітини без прояву цитотоксичного ефекту [4]. Водна дисперсія FC_{60} впливає на неоднакові типи клітин, проявляючи протизапальну [5], противірусну [6], антипроліферативну [7], антибактеріальну [8], імуномодулюючу [9, 10], хондрогенну [11], про- і антиоксидантну дії [12], що в подальшому може знайти застосування для досягнення протективного і імуномодулюючого ефектів при лікуванні низки патологічних станів з переважним порушенням імунних механізмів. Разом з цим, весь спектр дії FC_{60} на імунні, запальні і антиоксидантні процеси при АА залишається повністю не вивченим.

Мета нашої роботи – дослідити вплив FC_{60} на рівень вільнорадикальних і деструктивних процесів у сполучній тканині суглобів при АА у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 40 самцях щурів лінії Вістар масою 250-280 г, які знаходились у стандартних умовах віварію, відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм, вимог та дозволу комісії з біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Тварини були розділені порівну на 5 груп. До I контрольної групи увійшли інтактні тварини, до II контрольної – тварини, яким вводили стерильний фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, рН 7,2) по 100 мкл в праву задню кінцівку (однократно, субплантарно). Тваринам III, IV і V груп моделювали розвиток експериментального АА введенням 0,1 мл стерильного повного ад'юванту Фрейнда в праву задню кінцівку (однократно, субплантарно) [13]. Через 14 діб після індукції АА тваринам III групи вводили стерильний ФСБ

по 100 мкл у праву задню кінцівку (1 раз на добу, впродовж 15 днів, субплантарно), щурам IV групи вводили препарат порівняння метотрексат (МТХ) («LaChema», Чехія) у дозі 0,6 мг/кг (1 раз на тиждень, впродовж 15 днів, внутрішньом'язово); V - водну дисперсію FC_{60} у дозі 50 нг в 100 мкл стерильного ФСБ (1 раз на добу, впродовж 15 днів, інтраперитонеально) [14]. Водну дисперсію FC_{60} («Sigma», США) отримували перемішуванням у стерильній деіонізованій воді в асептичних умовах на магнітній мішалці впродовж 2 міс [15]. Евтаназію тварин проводили під тіопенталовим наркозом на 30 добу експерименту, кров забирали у стерильні шприци з правого передсердя щурів.

Показники перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантного захисту (АОЗ) визначали в гомогенатах тканин печінки, нирок і серця. Для цього оцінювали приріст малонового діальдегіду (МДА) під час 1,5-годинної інкубації в прооксидантному буфері [13]. Стан АОЗ вивчали за зміною активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) і каталази (КФ 1.11.1.6). Активність СОД оцінювали за зміною швидкості пригнічення продукції радикала супероксид-аніона в реакції автоокиснення адреналіну, каталази - за кількістю пероксиду водню, що розщеплюється під дією ферменту [13].

Загальну колагенолітичну активність (КЛА) визначали в гомогенатах хрящової і кісткової тканини колінного суглоба щурів. За одиницю активності брали ту кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкмоль лейцину внаслідок гідролізу колагену впродовж 5 год у стандартних умовах [13].

У сироватці крові колориметричним методом визначали концентрацію вільного оксипроліну та активність лужної фосфатази (ЛФ; КФ.3.1.3.1). У разі оксипроліну метод його ґрунтувався на реакції його окиснення з парадиметиламінобензальдегідом з утворенням кінцевого продукту пірол-2-карбонової кислоти [13]. А ЛФ - на врахуванні кілько-

сті утвореного внаслідок ферментативного розщеплення р-нітрофенілфосфату продукту р-нітрофенолу, що дає в лужному середовищі жовте забарвлення [13].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft, США) з обчисленням середнього (М) і стандартної помилки середнього (m). Вірогідність визначали за допомогою критерію t Стюдента та U-тесту Манна-Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Значення приросту концентрації МДА, активності СОД та каталази в гомогенатах тканин печінки, нирок і серця щурів представлені у табл. 1. Виявлено відсутність вірогідної різниці між усіма досліджувани-

ми показниками тварин II контрольної та I інтактної груп. Зареєстровано підвищення приросту концентрації МДА в гомогенатах печінки, нирок і серця (в 1,9; 3,2 і 1,25 раза відповідно; $P < 0,05$) у тварин III групи у порівнянні зі значеннями I інтактної групи. Відмічено зниження активності СОД та каталази у тварин III групи у порівнянні з I інтактною групою. При цьому виражене зниження активності каталази відмічене в тканинах печінки, нирок і серця (в 1,4; 2,5 і 2,25 раза відповідно; $P < 0,05$).

При введенні FC₆₀ тваринам (V група) вірогідно знижувався приріст концентрації МДА тільки в печінці і нирках у порівнянні з показниками тварин з АА (III група). Введення FC₆₀ щурам (V група) призвело до підвищення активності СОД в тканинах печінки і нирок та каталази в тканинах нирок і серця у порівнянні з показниками щурів з АА (III

Таблиця 1. Вплив фулерену C₆₀ (FC₆₀) на показники перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантного захисту в органах щурів при розвитку ад'ювантного артриту

Показник	Тварини контрольних груп		Групи тварини з ад'ювантним артритом		
	Інтактні	Введення фосфатно-сольового буферу	Введення фосфатно-сольового буферу	Введення метотрексату	Введення FC ₆₀
Приріст концентрації малонового діальдегіду, %					
Печінка	22,49±1,95	22,57±1,51	43,83±5,69*	4,44±0,93**	13,44±0,83**
Нирки	16,58±1,67	18,22±2,12	54,55±6,18*	16,17±1,76**	18,86±1,36**
Серце	13,98±0,96	14,67±0,81	17,53±1,0*	13,78±1,25**	15,63±1,08
Активність супероксиддисмутази, мкмоль/кг·с					
Печінка	15,94±0,76	17,27±0,51	11,68±0,52*	15,32±0,43**	15,96±0,38**
Нирки	8,42±0,18	7,36±0,76	3,43±0,47*	5,78±0,44**	5,36±0,27**
Серце	2,23±0,3	2,08±0,11	1,27±0,04*	1,27±0,09	1,56±0,02
Активність каталази, мкмоль/кг·с					
Печінка	17,86±0,31	15,17±1,4	12,74±0,6*	17,74±1,8*	15,13±1,08
Нирки	12,16±1,41	12,86±0,44	4,77±0,5*	8,87±1,2**	9,56±0,78**
Серце	2,2±0,09	1,83±0,16	0,98±0,12*	2,74±0,58**	2,26±0,41**

Примітка: тут і в табл. 2: * $P < 0,05$ у порівнянні з показниками інтактних тварин; ** $P < 0,05$ у порівнянні з показниками тварин, які отримували фосфатно-сольовий буфер під час розвитку ад'ювантного артриту

група; $P < 0,05$). Введення препарату порівняння МТХ тваринам (IV група) викликало вірогідне зниження приросту концентрації МДА в гомогенатах усіх досліджуваних органів, та навпаки, - підвищення активності СОД в тканинах печінки і нирок та каталази в гомогенатах усіх досліджуваних органів на відміну від показників щурів з АА (III група).

Дослідження загальної КЛА гомогенатів хрящової і кісткової тканин не виявило вірогідних відмін у тварин II контрольної групи у порівнянні з I інтактною групою (табл. 2). Виявлено підвищення загальної КЛА в досліджуваних тканинах у тварин III групи у порівнянні з показниками тварин I інтактною групи ($P < 0,05$). Введення FC_{60} (V група) і МТХ (IV група) шурам сприяло зменшенню загальної КЛА в хрящовій і кістковій тканинах у порівнянні з показниками тварин з АА (III група).

Отримані результати показали (див табл. 2), що концентрація вільного оксипроліну та активність ЛФ у сироватці крові тварин II контрольної групи вірогідно не відрізняється від показників I інтактною групи. Відмічено підвищення показників даних ферментів у

тварин III групи у порівнянні з показниками I інтактною групи ($P < 0,05$). Введення FC_{60} тваринам (V група) призвело до односпрямованого вірогідного зниження концентрації вільного оксипроліну та активності ЛФ на відміну від тварин з АА (III група). Тоді як при введенні препарату порівняння МТХ тваринам (IV група) відмічено лише пригнічення концентрації вільного оксипроліну ($P < 0,05$).

Раніше нами встановлено, що при розвитку АА у щурів спостерігалися характерні клінічні ознаки хронічного запалення з явищами відповідних структурно-метаболических порушень. Введення FC_{60} тваринам на фоні розвитку АА сприяло зменшенню набряку і діаметра запаленої кінцівки, стабілізації температури і маси тіла, що оцінено нами як протизапальна дія [10].

Отримані дані свідчили про стимуляцію ПОЛ і пригнічення активності антиоксидантних ферментів при АА, що відмічалось за підвищенням приросту концентрації МДА і зниженням активності СОД і каталази в тканинах печінки, нирок і серця. Ці дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів, які вказують на порушення рівноваги в системі ПОЛ - АОЗ

Таблиця 2. Вплив фулерену C_{60} (FC_{60}) на показники деструкції сполучної тканини при розвитку ад'ювантного артриту у щурів

Показник	Тварини контрольних груп		Групи тварини з ад'ювантним артритом		
	Інтактні	Введення фосфатно-сольового буферу	Введення фосфатно-сольового буферу	Введення метотрексату	Введення FC_{60}
Загальна колагенолітична активність, $мкмоль \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$					
хрящова тканина	$10,23 \pm 0,15$	$10,47 \pm 0,16$	$11,91 \pm 0,49^*$	$10,53 \pm 0,21^{**}$	$10,05 \pm 0,06^{**}$
кісткова тканина	$9,92 \pm 0,32$	$9,376 \pm 0,32$	$13,19 \pm 0,15^*$	$11,1 \pm 0,15^{**}$	$11,21 \pm 0,04^{**}$
Концентрація вільного оксипроліну в сироватці крові, $мкг/мл$					
	$1,63 \pm 0,08$	$1,62 \pm 0,09$	$2,25 \pm 0,07^*$	$1,63 \pm 0,06^{**}$	$1,54 \pm 0,04^{**}$
Активність лужної фосфатази в сироватці крові, $мкмоль/л \cdot с$					
	$0,94 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,13$	$2,19 \pm 0,24^*$	$1,56 \pm 0,15$	$1,24 \pm 0,14^{**}$

при АА зі зсувом в бік активації ВРО [2]. Причиною активації ПОЛ в органах і тканинах при АА може бути утворення фагоцитами АФК і недостатня ефективність основних антиоксидантів [16]. Нині є відомості про те, що при АА з одного боку утворення АФК відіграє бактерицидну роль, а з іншого – пошкоджує тканини суглобів [16, 17]. Ключові ферменти антиоксидантного комплексу - СОД і каталаза. Субстратом СОД є супероксид-аніон, який під дією ферменту перетворюється в менше сильний окисник – перекис водню; субстратом каталази є пероксид водню, який в свою чергу відновлюється ферментом до води. Відповідно, за участю цих ферментів АОЗ відбувається пряме знешкодження АФК, що запобігає пошкодженню тканин організму.

З отриманих результатів випливає, що введення FC₆₀ тваринам з АА відновлює баланс у системі ПОЛ – АОЗ і здійснює антиоксидантний ефект. Це відмічалось за зниженням приросту концентрації МДА і підвищенням активності антиоксидантних ферментів, СОД і каталази. В дослідженнях низки авторів було показано, що FC₆₀ і його водна дисперсія можуть здійснювати виражені антиоксидантні властивості в організмі переважно за рахунок нейтралізації і/або приєднання АФК і вільних радикалів [12]. Аналогічний прояв антиоксидантного ефекту виявлений при дії водорозчинної форми FC₆₀ на тварин з АА [18]. Це, ймовірно, в цілому свідчить про здатність фулеренів проявляти властивості потужних антиоксидантів також пригніченням активації сигнального шляху ядерного фактора NF-κB на етапі остеокластогенезу [19].

Препарат порівняння МТХ здійснював спрямований вплив на усунення активації процесів ПОЛ і захист тканин організму від пошкоджуючої дії АФК, знижуючи приріст концентрації МДА і підвищуючи активність СОД і каталази в тканинах печінки і нирок при АА, що узгоджується з літературними даними [20]. Авторами показано, що МТХ проявляє при АА не тільки антиоксидантний,

але і гепатопротекторний ефект.

У дослідженні отримані результати, які відображають процеси дезорганізації в сполучній і кістковій тканинах при АА, що проявлялось високим рівнем загальної КЛА в хрящовій і кістковій тканинах, вільного оксипроліну і активності ЛФ у крові щурів. Сьогодні доведено, що активовані клітини у вогнищі запалення секретують цілий комплекс ферментів (фосфатази, глікозидази, катепсин D, колагенази, еластази, активатор плазміногену), які перешкоджають нормальним процесам обміну і посилюють деструкцію сполучної тканини [21]. Тому виявлене нами підвищення рівня загальної КЛА і вмісту оксипроліну свідчить про переважання процесу розпаду колагену над його синтезом в сполучній тканині при розвитку АА [22]. Виявлене нами підвищення активності ЛФ при АА може відображати порушення мінералізації і резорбції кісток [23].

У нашій роботі встановлено, що введення FC₆₀ тваринам з АА попереджує активацію деструктивних процесів, знижуючи рівень загальної КЛА в хрящовій і кістковій тканинах, вмісту вільного оксипроліну і активності ЛФ в крові. Tsuchiya та співавт. показали стимулюючу дію FC₆₀ на хондрогенез у щурів, що може бути зумовлено активацією синтезу різних протеогліканів [11]. Слід відзначити, що вплив FC₆₀ на репаративні процеси в сполучній тканині при АА залишається ще не вивченим і визначає необхідність подальших досліджень.

Введення препарату порівняння МТХ тваринам з АА сприяло подібному блокуючому впливу на порушення обміну сполучної тканини. За даними опублікованого дослідження, при АА введення МТХ сприяє стабілізації обмінних процесів в сполучній тканинах і попередженню зниження мінеральної щільності кісток [24].

На основі проведених експериментів можна дійти висновку, що в імунопатогенезі АА суттєву роль відіграє активація ПОЛ і деструкція сполучної тканини, які призводять до утворення «замкнутого кола» в осередках

запалення. FC_{60} при АА здійснює протекторний ефект, спрямований на послаблення ПОЛ, пригнічення процесів деструкції сполучної тканини суглобів і розвиток запалення. Отримані результати підкреслюють перспективу подальших досліджень дії FC_{60} при РА як можливого терапевтичного агента.

Це дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи, що фінансується Міністерством охорони здоров'я України № 0109U001628 «Розробка методів імуномодуляції з використанням наночасточок».

Т.В. Мамонтова, Л.Э. Веснина, М.В. Микитюк, Н.А. Боброва, Л.А. Куценко, И.Л. Гординская, И. П. Кайдашев

ФУЛЛЕРЕН C_{60} ОСЛАБЛЯЕТ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ И ДЕСТРУКТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ АДЬЮВАНТНОМ АРТРИТЕ У КРЫС

Изучено влияние фуллерена C_{60} (FC_{60}) на уровень свободнорадикальных и деструктивных процессов в соединительной ткани суставов при экспериментальном адьювантном артрите (АА) у крыс. Продемонстрирован антиоксидантный эффект FC_{60} при АА, проявляющийся достоверным снижением прироста концентрации малонового диальдегида в печени ($13,44 \pm 0,83$ %) и почках ($18,86 \pm 1,36$ %); повышением активности антиоксидантных ферментов, супероксиддисмутазы в печени ($15,96 \pm 0,38$ мкмоль/кг·с) и почках ($5,36 \pm 0,27$ мкмоль/кг·с), а также каталазы в почках ($9,56 \pm 0,78$ мкмоль/кг·с) и сердце ($2,26 \pm 0,41$ мкмоль/кг·с) в сравнении с показателями контрольной группы ($43,83 \pm 5,69$ %; $54,55 \pm 6,18$ %; $11,68 \pm 0,52$ мкмоль/кг·с; $3,43 \pm 0,47$ мкмоль/кг·с; $0,98 \pm 0,12$ мкмоль/кг·с соответственно). Показан протективный эффект FC_{60} при АА, направленный на угнетение деструктивных процессов в соединительной ткани, что выражалось снижением уровня общей коллагенолитической активности в хрящевой ($10,05 \pm 0,06$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹) и костной ($11,21 \pm 0,04$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹) тканях, содержания свободного оксипролина ($1,54 \pm 0,04$ мкг/мл) и активности щелочной фосфатазы ($1,24 \pm 0,14$ мкмоль/л·с) в сравнении с показателями контрольной группы ($11,91 \pm 0,49$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹; $13,19 \pm 0,15$ мкмоль·г⁻¹·хв⁻¹; $2,25 \pm 0,07$ мкг/мл; $2,19 \pm 0,24$ мкмоль/л·с соответственно). Полученные результаты определяют перспективу дальнейших исследований действия FC_{60} при ревматоидном артрите как возможного терапевтического агента.

Ключевые слова: адьювантный артрит; фуллерен C_{60} ; активность антиоксидантных ферментов; общая коллагенолитическая активность.

T. V. Mamontova, L. E. Vesnina, M. V. Mikityuk, N. A. Bobrova, L. A. Kutsenko, I. L. Gordinskaya, I. P. Kaidashev

FULLERENE C_{60} INHIBITED FREE RADICAL AND DESTRUCTIVE PROCESSES IN CONNECTIVE TISSUE DURING ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS

The effects of fullerene C_{60} (FC_{60}) on the level of free radical and destruction processes were studied in rats with experimental adjuvant arthritis (AA). It was shown the protective effect of FC_{60} during AA. The effect was accompanied by an increase of the antioxidant enzymes activity, superoxidedismutase in the liver ($15,96 \pm 0,38$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$) and in the kidneys ($5,36 \pm 0,27$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$) and catalase in the kidneys ($9,56 \pm 0,78$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$) and in the heart ($2,26 \pm 0,41$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$) in comparison to control group ($43,83 \pm 5,69$ %; $54,55 \pm 6,18$ %; $11,68 \pm 0,52$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$; $3,43 \pm 0,47$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$; $0,98 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{s}$ accordingly). It was shown a protective effect of FC_{60} during AA directed on the depression of the destructive processes in connective tissue that was expressed through the reduction of the total collagenolytic activity level in cartilage ($10,05 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$) and bone ($11,21 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$) tissues, free hydroxyproline contents ($1,54 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$) and alkaline phosphatase activity ($1,24 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/l}\cdot\text{sec}$) in comparison to control group ($11,91 \pm 0,49$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$; $13,19 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$; $2,25 \pm 0,07$ $\mu\text{g/ml}$; $2,19 \pm 0,24$ $\mu\text{mol/l}\cdot\text{sec}$ accordingly). Taken together, these results accentuate the perspective of future investigations of action FC_{60} during rheumatoid arthritis as a feasible therapeutic agent.

Key words: experimental adjuvant arthritis; fullerene C_{60} ; antioxidant enzymes activity; total collagenolytic activity.

*Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Patology and Pharmacogenetic;
Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava*

REFERENCES

1. Bendele A M. Animal models of rheumatoid arthritis. J Musculoskel Neuron Interact. 2001 1; 4: 377-85.
2. Vasiliauskas A, Leonaviciene L, Vaitkiene D, Bradunaite R, Luksiene A. Anti-inflammatory effect of Aesculus hippocastanum L. tincture and pro-/antioxidant bodily state of rats with adjuvant arthritis. Acta Medica Lituan. 2010 17; 3: 123-32.
3. Ma H L, Liang H J. Fullerenes as unique nanopharmaceuticals for disease treatment. Sci China Chem. 2010 53; 11: 2233-40.
4. Kraszewski S, Tarek M, Ramseyer C. Uptake and translocation mechanisms of cationic amino derivatives functionalized on pristine C_{60} by lipid membranes: a molecular dynamics simulation study. ACS Nano. 2011 5; 11: 8571-8.
5. Kutsenko N L, Mikityuk M V, Bobrova N A, Kaïdashev

- I P. Effect of fullerenes on the allergic inflammation development in experiment. *Med Ecol Probl.* 2009 13; 5-6: 7-12. [Ukrainian].
6. Ji H, Yang Z, Jiang W, Geng C, Gong M, Xiao H, et al. Antiviral activity of nanocarbon fullerene liposome against influenza virus in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008 28; 3: 243-6.
7. Zogovic N S, Nikolic N S, Vranjes-Djuric S D, Harhaji L M, Vucicevic L M, Janjetovic K D, et al. Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C₆₀) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immunosuppression in the cancer-promoting activity of C₆₀. *Biomater.* 2009 30; 36: 6940-6.
8. Lyon D Y, Adams L K, Falkner J C, Alvarez P J J. Antibacterial activity of fullerene C₆₀ water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol.* 2006 40; 14: 4360-6.
9. Vesnina L E, Mamontova T V, Mikitiuk M V, Bobrova N A, Kaidashev I P. Stimulatory effect of fullerene C₆₀ on production of hemagglutinins and hemolysins, level activity of complement during the primary immune response in Balb/c mice. *Allergol Immunol.* 2011 12; 4: 342-6. [Russian].
10. Vesnina L E, Mamontova T V, Mikitiuk M V, Bobrova N A, Kutsenko L A, Iaroshenko G A, Kaïdashev I P. Fullerene C₆₀ exhibits immunomodulatory activity during adjuvant-induced arthritis in rats. *Eksp Klin Farmakol.* 2012 75; 8:15-20. [Russian].
11. Tsuchiya T, Yamakoshi Y N, Miyata N A. A novel promoting action of fullerene C₆₀ on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 206: 885-94.
12. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F, et al. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005 5; 12: 2578-85.
13. Berkalo L V, Bobovich O V, Bobrova N A, et al Kaïdashev I P, editor. *Methods of clinical and experimental investigations in medicine.* Poltava: Polimet, 2003. Ukrainian.
14. Rayan J J, Bateman H R, Stover A, Gomez G, Norton S K, Zhao W, et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol.* 2007 179: 665-72.
15. Dhawan A, Taurozzi J S, Pandey A K, Shan W, Miller S M, Hashsham S A, et al. Stable colloidal dispersion of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol.* 2006 40: 7394-401.
16. Tsuji G, Koshiha M, Nakamura H, Kosaka H, Hatachi S, Kurimoto C, et al. Thioredoxin protects against joint destruction in a murine arthritis model. *Free Radic Biol Med.* 2006 40; 10: 1721-31.
17. Ozkan Y, Yardim-Akaydyn S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2007 26; 1: 64-8.
18. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T. Water-soluble fullerene (C₆₀) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *Int J Nanomed.* 2009 4: 233-9.
19. Romas E, Gillespie M T, Martin T J. Involvement of receptor activator of NFκappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone.* 2002 30; 2: 340-6.
20. Leonaviciene L, Bernotiene E, Bradunaite R, Vaitkienė, Redaitienė E, Astrauskas V. Antiarthritic and hepatoprotective effect of derinat on adjuvant arthritis in rats. *Acta Medica Lituan.* 2006 13; 4: 236-44.
21. Trnavska Z, Grimova J, Trnavsky K. Collagene metabolism in adjuvant-induced arthritis in the rat. *Ann Rheum Dis.* 1972 31: 334-8.
22. Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of hydroxyproline: an overview. *Clin Med J.* 2004 117; 2: 291-5.
23. Borashan F A, Ilkhanipoor M, Farrokhi M H F. Investigation the effects of Curcumin on serum hepatic enzymes activity in a rheumatoid arthritis model. *Electronic J Biol.* 2009 4; 4: 129-33.
24. Morgan S L, Chen D-T, Carlee J, Baggott J E. Effect of methotrexate therapy on bone mineral density and body composition in rat adjuvant arthritis. *J Rheumatol.* 2004 31; 9: 1693-7.

Матеріал надійшов до
редакції 04.05.2013

М.С. Погоріла

Вплив екстракту з ембріональних тканин курей на вміст цитокінів і С-реактивного білка в сироватці крові мишей після дії γ -випромінювання

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», Харків.
E-mail: marionimtin@gmail.com

Досліджували *in vivo* динаміку вмісту інтерлейкінів: 1β (ІЛ- 1β), 6 (ІЛ-6), 4 (ІЛ-4) та С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові мишей при застосуванні екстракту з ембріональних тканин курчат самцями білих безпородних мишей перед зовнішнім одноразовим тотальним γ -випромінюванням у дозі 5 Гр. Впродовж першої доби після дії γ -випромінювання суттєво збільшується вміст ІЛ- 1β вже на 3-тю годину – $306,0 \pm 32,1$ пг/мл у порівнянні з інтактними тваринами ($2,1 \pm 0,06$ пг/мл), однак швидке зниження вмісту свідчить про порушення в системі його продукції – $80,3 \pm 7,9$ пг/мл на 12-ту годину. Подібні зміни були характерними і для ІЛ-6. Вміст ІЛ-4 в усіх досліджуваних часових точках був достовірно вищий ніж у інтактних тварин, однак не мав динаміки протягом першої доби після опромінення. На 6-ту годину реєстрували підвищення значень СРБ ($2,0 \pm 0,08$ мг/л), із подальшим ростом у динаміці на 12-ту годину ($65,0 \pm 0,7$ мг/л). Застосування препарату з ембріональних тканин птахів викликало підвищення вмісту ІЛ- 1β в 1,6 раза і ІЛ-6 в 38 разів уже через 3 год після радіаційної дії, причому ця тенденція певною мірою зберігається і на 12-ту годину спостереження, що свідчить про збільшення інтенсивності реакції організму на вказаний вплив. На тлі застосування препарату на 6-ту годину реєструвалося зниження значень СРБ у 2,7 раза в порівнянні з тваринами, котрі його не отримували. Також відмічено стимуляцію синтезу ІЛ-4, вміст якого збільшувався у динаміці та на 12-ту годину був в 2,5 раза вищим, ніж в контролі – $250,0 \pm 24,9$ щодо $100,0 \pm 18,7$ пг/мл. Здатність до підвищення вмісту цитокінів, зокрема, ІЛ- 1β та ІЛ-6, що мають вплив на гемостаз та мієлопоез, та сприяння зниженню концентрації СРБ, дають основу розглядати досліджуваний препарат як імуномодулятор при імуносупресивних патологічних станах.

Ключові слова: препарат з ембріональних тканин птахів; інтерлейкін- 1β ; інтерлейкін-6; інтерлейкін-4; С-реактивний білок; γ -випромінювання.

ВСТУП

Іонізуюче випромінювання спричиняє низку порушень у системах, функціонування яких реалізується через гомеостатичні регуляторні механізми, зокрема, імунну та кровотворну системи й скеровано на підтримку стабільної структурно-функціональної «досконалості» організму. Іонізуюче випромінювання є одним з найпоширеніших етіологічних чинників розвитку вторинного імунодефіциту (ВІД). Численні радіаційно-індуковані кіль-

кісні та функціональні зміни в системі імунітету (СІ) є підґрунтям для стійкого зниження опірності організму, що відображається на сам перед на підвищенні вразливості до інших етіологічних чинників ВІД.

Відомо, що регуляція активації та взаємодії усіх ланок СІ, а також її зв'язок з іншими системами значною мірою забезпечується цитокіновою мережею. Миттєвий синтез цитокінів, що відбувається внаслідок впливу індуктора, є однією з найбільш швидких реакцій організму, спрямованих на активіза-

цію системи імунітету [1]. Дія інтерлейкінів (ІЛ) ІЛ-1 β і ІЛ-6 в організмі спрямована на стимуляцію проліферації, диференціації та функціональну активацію клітин, що беруть участь в імунній відповіді [2]. Надзвичайно важливими є їх регуляторні властивості при гемопоезі, що забезпечує виживаність тварин після дії сублетальних доз радіоактивного випромінювання [3]. Так, посилення синтезу деяких цитокінів, зокрема ІЛ-1 β і ІЛ-6, є одним з найважливіших «компонентів» протирадіаційного захисту організму.

За більшості патологічних станів активація цитокінової мережі може бути як адекватною, так і супроводжуватися кількісними порушенням синтезу елементів СІ і призводити до виснаження компенсаторних можливостей. У цих умовах завжди неминучий короточасний або тривалий дефіцит продукції окремих регуляторних цитокінів. γ -Випромінювання є прикладом зовнішнього впливу, що призводить до виникнення порушень у збалансованому за кількісним критерієм синтезі цитокінів, що регулюють запалення. Багато авторів констатують, що порушення нормальних пропорцій синтезу про- та антизапальних цитокінів здатне спричиняти порушення регуляції та розвитку життєво важливих імунних реакцій і, в першу чергу, реакцій запалення [4-6].

Ще одним з найважливіших компонентів запальної реакції є С-реактивний білок (СРБ), синтез котрого включається і регулюється цілою низкою медіаторів, серед яких цитокіни, анафілотоксини та глюкокортикоїди. Зокрема, промотор гена СРБ містить регуляторні послідовності, що взаємодіють з ІЛ-1 та ІЛ-6. Концентрація СРБ високо корелює з тяжкістю і динамікою клінічних проявів запальної реакції. Відомо, що різні причини запальних процесів по-різному підвищують вміст цього білка [7,8].

З огляду на актуальність пошуку нових засобів, що спрямовані на попередження виникнення та корекцію порушень у роботі неспецифічних гуморальних факторів при-

родного імунітету, завдячуючи низькому рівню токсичності, алергенності та широкому спектру дії увага вчених була привернута до субстанцій, що мають природне походження. Зокрема, препарати тканинних екстрактів здійснюють нормалізуючий вплив на білковий та ліпідний обміни, перекисне окиснення ліпідів, на активність лужної фосфатази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, а також на неспецифічну резистентність організму і таким чином становлять інтерес як активатори інтегральних адаптаційно-метаболических механізмів [9-14]. У контексті пошуку речовин з імуноотропними властивостями було проведено низку досліджень з моделювання різних експериментальних патологій з їх подальшою корекцією препаратом з ембріональних тканин птахів, результати яких продемонстрували його здатність до скорочення часу загоєння термічно ураженої шкіри, антиоксидантні та хелатуючі його властивості [12, 15]. Дослідження цього препарату показало вміст в ньому незамінних амінокислот у значущих концентраціях, серед яких переважають глутамінова і аспарагінова кислоти та серин і лейцин, також жирних кислот, серед яких у найбільших концентраціях зареєстровано олеїнову, пальмітинову, лінолеву та стеаринову кислоти, що є, зокрема, найважливішими структурними та функціональними компонентами клітинних біомембран [16].

Метою нашого дослідження було вивчити вплив серії внутрішньом'язових введення препарату з ембріональних тканин птахів на вміст про- і антизапальних цитокінів: ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-4 і СРБ сироватки крові в першу добу після дії загального одноразового γ -випромінювання в дозі 5 Гр.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були самиці білих безпородних мишей масою $22 \pm 1,0$ г, віком 2 міс. Тварин утримували на стандартному харчуванні за стандартних регламентованих

умов у віварії ДУ «ІМІ НАМН». У роботі було використано екстракт з ембріональних тканин курчат, які готували за розробленою Харківською зооветеринарною академією методикою [17]. Введення ембріонального препарату тваринам здійснювалося внутрішньом'язово, з проміжком в 1 добу упродовж 10 діб, у дозі 0,1 мг/кг. Серія ін'єкцій була проведена перед впливом γ -випромінювання. Тотальне одноразове опромінення тварин здійснювалося на установці РУМ-17 у дозі 5 Гр протягом 12 хв 30 с при шкірно-фокусній відстані 40 см, силі струму 10 мА, напрузі 180 кВ, фільтр 0,5 Cu + 1Al на базі ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва» НАМН України.

Тварин було розподілено на 4 групи, по 11 тварин у кожній: I група - інтактні тварини; II - тварини, яким з проміжком в 1 добу упродовж 10 діб вводили внутрішньом'язово ембріональний препарат в дозі 0,1 мг/кг; III - тварини, які були піддані одноразовому, загальному γ -випромінюванню в дозі 5 Гр; IV - тварини, яких опромінювали у вказаній дозі та за вказаною схемою вводили їм препарат упродовж 10 діб.

У сироватці крові тварин усіх дослідних груп через 3, 6 та 12 год після опромінення визначали вміст ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-4 і СРБ методом імуноферментного аналізу з використанням діагностичних тест-систем фірми «Bender MedSystems» (Австрія) і тест-системи «hsCRP ELISA», «Biomerica, Inc», (США) для визначення вмісту СРБ, на аналізаторі «Stat-Fax» (США). Забір крові здійснювали з хвостової вени під ефірним наркозом. Робота з тваринами проводили згідно з принципами Гельсінської декларації, прийнятою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964 – 2000 рр.), з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей» [18]. При проведенні статистичного аналізу результатів застосовували критерій t Стьюдента з урахуванням поправки Бонфер-

роні за допомогою програм Origin (перевірка на нормальність розподілу) і Microsoft Office Excel 2003 [19]. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного (М) зі стандартним відхиленням (σ).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При застосуванні ембріонального препарату у здорових мишей (II група) відмічено зростання вмісту ІЛ-1 β на 3-тю годину. До 6-ї і 12-ї години значення цього показника порівняно з інтактними тваринами були все ще підвищеними, але вірогідно знижувалися в динаміці. Отже, на тлі застосування препарату у здорових мишей спостерігається тимчасова стимуляція синтезу ІЛ-1 β , тобто підвищення його вмісту мало транзиторний характер.

Загальне одноразове опромінення в дозі 5 Гр (III група) призвело до сильного підвищення порівняно з інтактними тваринами вмісту ІЛ-1 β через 3 год після дії ($306,0 \pm 32,1$ пг/мл). На 6-ту і 12-ту годину цей показник був все ще вищий, проте з часом стрімко знижувався (табл.1). Помітно, що при опроміненні відбувається підвищення синтезу прозапального цитокіну як реакція на зовнішній вплив, що підтверджується швидким зниженням вмісту ІЛ-1 β у найближчі години після опромінення і свідчить про порушення в системі його продукції.

При застосуванні ембріонального препарату підвищувався вміст ІЛ-1 β в тричі до 6-ї години після дії іонізуючого випромінювання порівняно з групою, що не отримувала препарат. Через 12 год все ще реєструвалося підвищене значення цього показника. Таким чином, на тлі опромінення препарат здійснює стимулювальний вплив на продукцію ІЛ-1 β та достовірно підвищує його вміст у сироватці крові, посилюючи цим відповідь СІ на радіаційну дію.

Прозапальний цитокін ІЛ-6 в сироватці крові інтактних тварин не виявлявся, можливо його значення знаходились у субпоро-

Таблиця 1. Вміст інтерлейкіну-1 β (пг/мл) у різні строки забору крові у мишей під впливом γ -випромінювання та введення екстракту з курячих ембріонів ($M \pm \sigma$, $n=11$)

Групи тварин	3-тя година	6-та година	12-та година
Інтактні тварини (I група)	2,1 \pm 0,06	2,03 \pm 0,04	2,08 \pm 0,07
Тварини, яким вводили екстракт (II група)	83,03 \pm 3,1*	32,0 \pm 2,8*	29,3 \pm 2,4*
Опромінені тварини (III група)	306,0 \pm 32,1*	100,0 \pm 9,4*	80,3 \pm 7,9*
Опромінені тварини на фоні введення екстракту (IV група)	417,0 \pm 31,0*,**	325,0 \pm 26,3*,**	234,3 \pm 20,1*,**

Примітка: тут і в табл. 2-4. * $P < 0,01$ відносно значень у I групі тварин; ** $P < 0,01$ відносно значень у III групі тварин.

гових концентраціях (чутливість конкретного набору для визначення вмісту сироваткового ІЛ-6 становить 6,5 пг/мл). Через 3, 6 і 12 год після дії іонізуючого випромінювання (III група) значення ІЛ-6 були такими: 71,0 \pm 12,2, 75,0 \pm 6,3 і 69,0 \pm 2,0 пг/мл відповідно, без видимої зміни з часом. При введенні препарату мишам, що піддавалися опромінюванню, вміст ІЛ-6 підвищився в 38 разів через 3 год, в 20,6 раза через 6 год і все ще був високим через 12 год (табл. 2).

Таким чином, ембріональний препарат посилює реакцію організму стимуляцією продукції прозапального цитокіну ІЛ-6 в сироватці крові мишей впродовж першої доби після одноразового впливу зовнішнього γ -випромінювання.

Введення здоровим мишам ембріонального препарату не призвело до змін вмісту ІЛ-4, і до 12-ї години його значення не були відмінними від таких у інтактних тварин. У групі опро-

міненіх мишей, що не отримували препарат, цей показник в усіх досліджуваних часових точках був достовірно вищий ніж, у контролі. Причому динаміки вмісту ІЛ-4 в першу добу після опромінення не спостерігалось.

Застосування ембріонального препарату перед опроміненням призвело до збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ-4 в сироватці крові мишей і забезпечило наростання його значень упродовж першої (табл. 3). Як відомо, ІЛ-4 обмежує продукцію макрофагами ІЛ-1 β і ІЛ-6 як прозапальних цитокінів в нормі реакції, тому достатній його синтез забезпечує збалансований розвиток і своєчасне обмеження запалення.

На 3-тю годину після опромінення (III група) вміст СРБ достовірно відрізнявся від значень у інтактних тварин, проте знаходився в межах норми. Через 6 год спостерігалось підвищення цього показника. Причому на 12-ту годину простежується подальше його

Таблиця 2. Вміст інтерлейкіну-6 (пг/мл) в різні строки забору крові у мишей під впливом γ -випромінювання та введення екстракту з курячих ембріонів ($M \pm \sigma$, $n=11$)

Групи тварин	3-тя година	6-та година	12-та година
Інтактні тварини (I група)	0	0	0
Тварини, яким вводили екстракт (II група)	8,4 \pm 0,09	8,1 \pm 0,13	8,9 \pm 0,15
Опромінені тварини (III група)	71,0 \pm 12,2*	75,0 \pm 6,3*	69,0 \pm 2,0*
Опромінені тварини на фоні введення екстракту (IV група)	2695,0 \pm 70,1*,**	1548,0 \pm 82,0*,**	171,0 \pm 22*,**

Таблиця 3. Вміст інтерлейкіну-4 (пг/мл) в різні строки забору крові у мишей під впливом γ -випромінювання та введення екстракту з курячих ембріонів ($M \pm \sigma$, $n=11$)

Групи тварин	3-тя година	6-та година	12-та година
Інтактні тварини (I група)	3,8 \pm 0,3	4,0 \pm 0,2	4,1 \pm 0,24
Тварини, яким вводили екстракт (II група)	4,86 \pm 0,6	3,4 \pm 0,4	5,0 \pm 0,7
Опромінені тварини (III група)	76,0 \pm 16,8*	90,0 \pm 17,0*	100,0 \pm 18,7*
Опромінені тварини на фоні введення екстракту (IV група)	102,0 \pm 21,0*.**	150,0 \pm 22,0*.**	250,0 \pm 24,9*.**

збільшення, що говорить про динаміку тяжкості запального процесу. На 6-ту годину після опромінення у тварин, що отримували препарат (IV група) вміст СРБ був не таким високим, як у III групі – 18,0 \pm 0,6 щодо 50 \pm 0,5 мг/л відповідно. На 12-ту годину після опромінення у IV групі тварин цей показник залишався на рівні значень на 6-ту годину, тобто був підвищеним у порівнянні з інтактними тваринами у 8 разів.

Таким чином, на фоні профілактичного застосування ембріонального препарату при опроміненні в сироватці крові реєструється нижчий вміст СРБ у порівнянні з відповідним контролем. При цьому в динаміці у найближчі терміни після опромінення збільшення цього показника на тлі застосування екстракту не відзначалося (табл. 4). Подібні зміни відображають вірогідну здатність ембріонального препарату обмежувати посилення тяжкості запального процесу.

Впродовж першої доби після дії однора-

зового загального зовнішнього γ -випромінювання дещо збільшується вміст прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-6 та протизапального цитокіну ІЛ-4, а також СРБ у мишей.

Відомо, що ІЛ-1 активує стовбурові клітини, Т- і В-лімфоцити, нейтрофіли, індукує запалення, зокрема синтез білків гострої фази запалення. Завдяки здатності посилювати продукцію низки колонієстимулювальних факторів він впливає на мієлопоез і ранні етапи еритропоезу, діючи на стовбурові кровотворні клітини [1]. ІЛ-6 стимулює дозрівання В-лімфоцитів, Т-клітин, продукцію печінкою СРБ, також посилює утворення супероксид радикалів [7]. Його біологічні ефекти схожі з ефектами ІЛ-1. Проте ІЛ-6 більше впливає на синтез білків гострої фази запалення гепатоцитами. Він бере участь у реалізації запальної реакції та кровотворенні, *in vitro* посилює утворення колоній усіх типів. ІЛ-6 не маючи самостійної радіозахисної дії, підвищує таку дію ІЛ-1. ІЛ-6 сприяє як загостренню хроніч-

Таблиця 4. Вміст С-реактивного білку в різні строки забору крові у мишей під впливом γ -випромінювання та введення екстракту з курячих ембріонів ($M \pm \sigma$, $n=11$)

Групи тварин	3-тя година	6-та година	12-та година
Інтактні тварини (I група)	1,2 \pm 0,05	1,2 \pm 0,02	1,2 \pm 0,03
Тварини, яким вводили екстракт (II група)	1,22 \pm 0,03	1,24 \pm 0,06	1,26 \pm 0,04
Опромінені тварини (III група)	2,0 \pm 0,08*	50,0 \pm 0,5*	65,0 \pm 0,7*
Опромінені тварини на фоні введення екстракту (IV група)	2,15 \pm 0,07*.**	18,0 \pm 0,6*.**	17,0 \pm 0,9*.**

них, так і хронізації гострих запальних процесів. Виділяючись пізніше від ІЛ-1 і деяких інших цитокінів, він пригнічує їх утворення (вони, навпаки, стимулюють його синтез) та завершує розвиток запальної реакції. ІЛ-4 послаблюючи функції макрофагів і секрецію ними ІЛ-1 та 6, чинить протизапальну дію. Стимулює гемопоез, вступаючи в кооперацію з іншими чинниками. Зокрема, сприяє виживаності кровотворних клітин [11].

Порушення продукції прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6) та антизапальних цитокінів (ІЛ-4) з переважанням вмісту перших над другими в динаміці запалення розглядається як провідний чинник, що детермінує хронізацію цього процесу.

Застосування препарату з ембріональних тканин птахів викликає значне підвищення вмісту ІЛ-1 β і ІЛ-6 через 3 і 6 год після дії γ -випромінювання, із стабілізацією на 12-ту годину, збільшуючи цим реакцію на вказану дію. Вміст маркера запалення, СРБ, на тлі застосування препарату перед опроміненням був нижчим, ніж у опромінених тварин. Найбільш значимим ефектом при проведенні серії внутрішньом'язових ін'єкцій досліджуваного препарату опроміненим мишам є стимуляція синтезу ІЛ-4, вміст якого збільшувався в кожній часовій точці дослідження в порівнянні з групою опромінених тварин. Отримані результати свідчать про позитивний вплив ембріонального препарату на синтез про- і антизапальних цитокінів при зовнішній дії γ -випромінювання на організм тварин. Разом з тим така властивість, як здатність до індукції низки цитокінів, зокрема ІЛ-1 β та ІЛ-6, дають основу розглядати цю речовину як імуномодулятор при імуносупресивних патологічних станах. А зниження вмісту сироваткового СРБ може свідчити про регульовальну його дію та здатність полегшувати реакцію запалення при променевого ураженні. При введенні ембріонального препарату неопроміненим тваринам змін в значеннях цитокінів та СРБ не спостерігалось.

М.С. Погорелая

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ КУР НА ДИНАМИКУ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

Исследовали *in vivo* динамику содержания интерлейкинов: 1 β (ИЛ-1 β), 6 (ИЛ-6), 4 (ИЛ-4) и С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови мышей при применении экстракта из эмбриональных тканей цыплят самкам белых беспородных мышей перед внешним однократным тотальным γ -излучением в дозе 5 Гр. Показано, что уже в течение первых суток после воздействия γ -излучения существенно увеличивается содержание интерлейкина (ИЛ) ИЛ-1 β уже к 3-му часу после облучения ($306,0 \pm 32,1$ пг/мл по сравнению с интактными животными $2,1 \pm 0,06$ пг/мл), однако быстрое снижение его содержания свидетельствует о нарушениях в системе его продукции - $80,3 \pm 7,9$ пг/мл к 12-му часу. Подобные изменения были характерны и для ИЛ-6. Содержание ИЛ-4 во всех исследуемых временных точках был достоверно выше, чем у интактных животных, однако не имел динамики на протяжении первых суток после облучения. К 6-му часу регистрировалось повышение содержания СРБ, с последующим ростом в динамике - $2,0 \pm 0,08$ мг/л к 6-му часу и $65,0 \pm 0,7$ мг/л к 12-му часу. Применение экстракта из эмбриональных тканей птиц вызывает повышение содержания ИЛ-1 β в 1,6 раза и ИЛ-6 в 38 раз уже через 3 ч после радиационного воздействия, причем эта тенденция сохраняется и к 12-му часу. На фоне применения препарата к 6-му часу регистрировалось снижение содержания СРБ в 2,7 раза по сравнению с животными, которые не получали препарат. Также отмечалась стимуляция синтеза ИЛ-4, содержание которого увеличивалось в динамике и к 12-му часу было в 2,5 раза выше, чем в контроле - $250,0 \pm 24,9$ пг/мл относительно $100,0 \pm 18,7$ пг/мл. Способность к повышению содержания ряда цитокинов, в частности, ИЛ-1 β и ИЛ-6, которые имеют влияние на гемо- и миелопоэз и содействие снижению СРБ, дают основу рассматривать исследуемый препарат в качестве иммуномодулятора при иммуносупрессивных патологических состояниях.

Ключевые слова: препарат из эмбриональных тканей птиц; интерлейкин-1 β ; интерлейкин-6; интерлейкин-4; С-реактивный белок; γ -излучение.

M.S. Pogorelaya

THE INFLUENCE OF EXTRACT FROM EMBRYONIC CHICKEN TISSUE ON THE DYNAMIC CHANGES OF MICE BLOOD SERUM C-REACTIVE PROTEIN AND CYTOKINES AFTER γ -IRRADIATION

The effect of preparations from embryonic chicken tissue on the dynamic changes in the levels of interleukins: 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6), 4 (IL-4) and C-reactive protein (CRP) were

investigated *in vivo*, in the blood serum of white female laboratory mice exposed to single total γ -irradiation in a dose of 5 Gy. The experiments found that during the first days after the action of γ -radiation the indices of resistance of the organism undergo significant destabilizing changes. These changes are manifested by an increase in IL-1 β pro-inflammatory cytokine in response to external influences. However, the rapid decline in its level during the first days after irradiation reflects alterations in its production. The content of the serum IL-4 in all time points was higher than in the intact group. Moreover, the dynamics of its level during the first days after the irradiation was observed. An increased level of CRP was detected 6 hours after the exposure, indicating the dynamic changes of the severity of the inflammatory process. Administration of preparations from embryonic chicken tissue causes a considerable increase in the content of IL-1 β and IL-6 in 3 and 6 hours after the γ -irradiation, with stabilization after 12 hours. When using the preparations before an irradiation, a significantly lower level of CRP was detected in comparison to animals that did not get the preparations. When using the embryonic preparations, the stimulation of synthesis of IL-4 was observed, whose level increased in every time of taking blood samples. Possibility for induction of row of cytokines, in particular, IL-1 β and IL-6, plays an important role in stimulation of hematopoiesis and provides a basis to consider this substance as an immunomodulator in pathologic immunosuppressive states. The decrease of serum CRP level can indicate the ability to reduce the severity of radiation injury. In the experimental conditions, an embryonic preparation exhibits inertness relative to the healthy organism.

Keywords: preparations from embryonic chicken tissue, interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-4, C-reactive protein, γ -irradiation.

SI "I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology;
NAMS of Ukraine", Kharkov;
Marionimmun@gmail.com

REFERENCES

- Novikov DK, Novikov PD. Clinical immunopathology. Moscow: Medical literature; 2009.
- Yarilin AA. Fundamentals of Immunology. Moscow: Medicine; 1999.
- Andrushchenko VN, Ivanov AA, Maltsev VN. Antirad action of substances of microbial origin. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 1996; 36 (2):195-207. [Russian].
- Andrushchenko VN, Ivanov AA, Maltsev VN. Antirad action of substances of microbial origin. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 1996; 36 (2):195-207. [Russian].
- Boyko VN, Chigareva NG. Study of therapeutic efficacy of immunomodulators as a means of early treatment of acute radiation sickness. Proceedings of All-Union scientific conference; 1991; Moscow, Russian Federation. P. 155-6.
- Nigmatullin I.N. Search for anti-radiation facilities of cytokine induction class [dissertation]. Kazan: Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals; 2007.
- Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. Mol. Immunol. 2001;38(2-3):189-97.
- Verma S, Szmitko PE, Yeh ET. C-reactive protein: structure affects function. Circulation. 2004;109(16):1914-7.
- Vostroilova GA. Experimental and clinical pharmacology of placenta preparations obtained by the method of krio-fractionation [dissertation]. Voronezh All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapeutics; 2007.
- Gizatullin RR. Hygienic justification correction of the natural resistance of calves by the biological stimulant «Biosstim» [dissertation]. Ufa: Bashkir State Agrarian University; 2001.
- Lopina EO. Physiological and biochemical changes of cows by using a biocorrector timogen as a stimulator of reproductive function [dissertation]. Belgorod: Belgorod State Agricultural Academy; 2007.
- Merishnets YuA, Kuznetsova VG, Zhegunov GF. Action of extracts from embryos of hens on process of restoration and maintenance of quantity of leukocytes at rats with experimental burns. International scientific-practical Conference «Recent advances and prospects of agricultural research, education and practice»; 2011; Kharkov, Ukraine. P. 17.
- Palchikov AY. Regulation of adaptation and compensatory reactions at cows at insufficiency of a fetoplacental complex a bionormalizer from a placenta [dissertation]. Belgorod: Belgorod State Agricultural Academy; 2004.
- Pertsukhov SV. Bionormalizing action of preparation PDS at restoration of reproductive function at cows with a sharp postnatal endometritis [dissertation]. Krasnodar: The Kuban State Agrarian University; 2007.
- Timokhina YuA, Kuznetsova VG. Antioxidant characteristics of chick embryo extract. Current Issues Of Veterinary Biology. 2013; 4(20):17. [Russian].
- Kuznetsova VG, Pogorelaya MS, Zhegunov GF. Amino acid and fatty acid composition of the native extract of chick embryos. Proceedings of the III International Scientific Conference of Students and Young Scientists "Fundamental and applied research in biology"; 2014; Donetsk, Ukraine. P.212.
- Zhegunov GF, Kuznetsova VG. Study of immunostimulatory activity of extracts from chicken embryos. Problems of zooengineering and veterinary medicine. 2009; 2(19 Pt 2):116-119. [Russian].
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: Council Treaty Series; 1986. 123 p.
- Lapach SN. Statistical methods in medical-biological studies using Excel. Kyiv: Morion; 2004.

Матеріал надійшов до
редакції 02.06.2014

С. В. Грабовська, Ю.Т. Салига

Вплив хронічної інтоксикації низькими дозами хлорпірифосу на поведінку самиць щурів

Інститут біології тварин НААН, Львів; E-mail: yursalyha@yahoo.com

У роботі досліджували вплив тривалої дії низьких доз хлорпірифосу на поведінку самиць лабораторних щурів. Тваринам щоденно протягом місяця вводили хлорпірифос у дозах 5 та 10 мг/кг і вивчали його вплив на низку важливих поведінкових показників за допомогою тестів: водний лабіринт Морріса, відкрите поле та темно-світла камера. Виявлено, що хлорпірифос у дозі 10 мг/кг погіршує коротко- та довготривалу просторову пам'ять, знижує загальну активність, спричиняє різкі коливання рівня тривожності (вона значно зростала на початку введення ксенобіотика, та з часом нормалізувалася). Аналогічні тенденції, хоча менш виражені, спостерігали в групі, яка одержувала токсичну сполуку в дозі 5 мг/кг. Результати дослідження дають змогу зробити висновок, що тривале (30 діб) надходження в організм самиць щурів малих доз хлорпірифосу негативно впливає на функціональний стан їх нервової системи.

Ключові слова: хлорпірифос; фосфорорганічні сполуки; щури; поведінка; пам'ять; відкрите поле; водний лабіринт Морріса; темно-світла камера.

ВСТУП

Хлорпірифос (ХПФ) ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) – це фосфорорганічна сполука (ФОС), яка є діючою речовиною багатьох поширених пестицидних препаратів. Основний механізм токсичного ефекту ХПФ, як і решти ФОС, полягає в інгібуванні холінергастаз (групи ферментів класу гідролаз карбонових кислот, субстратами яких є складні ефіри холіну з оцтовою, пропіоновою чи масляною кислотами), дія на холінергічні синапси та нейротоксичні ефекти внаслідок цього. Однією з головних причин отруєння ФОС є накопичення негідролізованого ацетилхоліну, що призводить спершу до інтенсифікації проведення нервових імпульсів (збудження), а згодом, навпаки – до блокування їх передачі (гальмування) [1]. Показано, що нейротоксичність ХПФ не обмежується тільки антихолінергастазною дією, а може також реалізовуватись за допомогою інших механізмів, зокрема через

порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу і виникнення оксидативного стресу [2, 3].

Оскільки пестициди на основі ФОС широко використовуються у сільському господарстві, то актуальним стає питання про можливу нейротоксичну дію їх на організм людини. Хронічне введення низьких доз ФОС, які не спричиняють видимих гострих ефектів, може викликати появу розладів роботи ЦНС, погіршення когнітивних функцій, послаблення пам'яті у дітей [4] та навіть ставати причиною розвитку хвороби Паркінсона [5] та аутизму [6]. Можливість негативного впливу ХПФ на функціонування нервової системи показана у дослідях з тваринами різних видів та класів. Субхронічне введення невеликих доз (0,01 та 0,1 мкмоль/л) ХПФ малькам акваріумних риб *Danio rerio* змінює їхню поведінку, що виражається, зокрема, у зниженні швидкості плавання, тигмотаксисі, зростанні тривожності [7]. Показано,

що вплив невеликих доз ХПФ на мишенят протягом неонатального періоду спричиняє порушення розвитку їхнього мозку та посилення статевих відмінностей поведінки [8]. Встановлено довготермінову затримку когнітивного розвитку та підвищення тривожності у мишенят, народжених самицями, які протягом вагітності одержували мікродози ХПФ [9]. Пренатальна дія ХПФ може викликати в поведінці мишей порушення, подібні до тих, які спостерігаються при аутизмі [10]. Введення ХПФ в період раннього неонатального розвитку тварин може призводити до появи симптомів депресії [11]. Встановлено, що у щурів, які одержували ХПФ у дозі 1 мг/кг·на добу у перші чотири доби після народження, по досягненні ними дорослого віку розвивалися депресивні симптоми: ангедонія (зниження чи втрата здатності отримувати задоволення), погіршення пам'яті та інші поведінкові порушення. Такі ефекти автори пов'язують із впливом невеликих (субтоксичних) доз ХПФ на серотонінергічну систему, порушення нормального функціонування якої викликає депресивні прояви [11].

У щурів, яким періодично підшкірно вводили ХПФ у дозах 10 та 18 мг/кг на добу, суттєво порушувалася пам'ять та здатність до просторового навчання у радіальному лабіринті та водному тесті Морріса. У водному тесті не лише збільшувався час, необхідний тваринам для запам'ятовування положення підводної платформи, але й виникали труднощі з виявленням платформи після зміни її положення (зниження гнучкості мислення) [12, 13].

Мета нашої роботи – виявити та дослідити можливий вплив тривалого (щоденно протягом місяця) введення низьких доз ХПФ (5 та 10 мг/кг), які є значно нижчими за гостро токсичні та вважаються умовно безпечними, на поведінку самиць щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 30 молодих статевозрілих самицях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 160–220 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням 12-годинного режиму освітлення (темнота/світло), необмеженим доступом до питної води та корму. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції “Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей” від 18.03.1986 р. [14], Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р. і “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р. (протокол № 42 від 01.11.13 засідання комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН).

Було сформовано три групи тварин (контрольну і дві дослідні, 1-ша та 2-га), по 10 щурів у кожній. Тваринам дослідних груп щоденно протягом місяця за допомогою перорального зонда вводили розчинений в олії ХПФ («Sigma-Aldrich», США) з розрахунку 5 мг/кг (перша) і 10 мг/кг (друга). Інтактним тваринам контрольної групи замість препарату вводили чисту олію в еквівалентному об'ємі.

Для дослідження впливу тривалого введення низьких доз ХПФ на функціональний стан ЦНС самиць щурів їх тестували за наступними поведінковими методиками: водний лабіринт Морріса, відкрите поле та темно-світла камера [15–17]. Для уникнення артефактів за дві години до тестування тварин поміщали у тихе, слабо освітлюване місце. У цей період не проводили перегрупування тварин, не годували їх і не здійснювали жодних інших маніпуляцій. Усі тестування проводили в один і той самий час доби, за однакових умов освітлення і температури, за відсутності сторонніх запахів і шуму.

Для проведення водного тесту Морріса використовували басейн діаметром 1,8 м та глибиною 40 см, з переносною плексигласовою платформою-острівком, встановленою на 1 см нижче рівня води. Воду у басейні робили непрозорою за допомогою сухого молока (для неможливості візуального знаходження платформи), температуру води підтримували на рівні 20-28 °С. Навколо басейну на штативах рівновіддалено були розміщені 4 різні картонні геометричні фігури для полегшення просторової орієнтації тварин. Процедура тестування тварин фіксували відеокамерою для подальшого аналізу і статистичної обробки. Кожній тварині надавали по 2 послідовні спроби, з інтервалом 10-15 хв, для знаходження невидимої у замутненій воді платформи. Фіксували час, витрачений твариною в процесі досягнення цієї мети. У разі, якщо тварина не знаходила платформи протягом 3 хв, тестування зупиняли і спробу зараховували як невдачу.

У тесті відкрите поле використовували експериментальну установку квадратної форми, виготовлену з плексигласу. Вона мала розміри 80х80см, висота бокових стінок становила 40 см. Дно установки було розділене на 16 однакових за площею квадратів – 12 зовнішніх та 4 внутрішні. Тестування кожної тварини проводили протягом 3 хв, під час цього реєстрували горизонтальну рухову активність (кількість перетнутих твариною зовнішніх і внутрішніх квадратів), вертикальну рухову активність (кількість стійок на задніх кінцівках), кількість актів дефекації та грумінгу. Грумінг тварин фіксували за двома категоріями: короткий і довгий. Короткий грумінг характеризувався 1-2 швидкими круговими рухами лап навколо носа і невеликої ділянки біля нього, а довгий – вмиванням ділянки очей, заведенням передніх кінцівок за вуха і переходом на вмивання всієї голови, кінцівок, боків тулуба, аногенітальної ділянки та хвоста.

Темно-світла камера складалася з двох однакових за розмірами кубічних частин –

забарвленої у чорний колір комірки з кришкою і білої без кришки, яку додатково освітлювали лампою денного світла. Комірки були сполучені невеликим отвором-ніркою. Під час тестування тварину спочатку поміщали в освітлену білу частину і фіксували час, через який вона переходила у темну, а також кількість виглядувань з нірки та (якщо спостерігали) кількість і тривалість виходів з неї. Тривалість спроби для кожної тварини становила 3 хв.

Результати обробляли у програмі Statistica 12 за допомогою мультифакторного тесту ANOVA та ANOVA для повторних вимірювань. У всіх випадках достовірними вважали відмінності між групами при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Водний тест (лабіринт) Морріса дає змогу проводити ефективне дослідження просторової пам'яті, орієнтування та здатності до навчання лабораторних гризунів [17]. Одним з показників, які фіксували за допомогою даного тесту, був стан короточасної пам'яті дослідних тварин. Визначали його за різницею часу, затраченого на знаходження твариною острівка-платформи у першій та другій спробах. У тварин, які зазнавали впливу низьких доз ХПФ, виявлена тенденція до погіршення короточасної пам'яті: тривалість виконання тесту у другій спробі не зменшувалась, ефективного навчання не відбувалося. Деякі тварини, навпаки, у другій спробі затрачали більше часу для знаходження платформи, ніж у першій, що свідчить про погіршення короткотривалої пам'яті.

Іншим важливим показником, що досліджувався за допомогою тесту Морріса, був стан довготривалої просторової пам'яті. За нормального функціонування механізмів просторової пам'яті та орієнтації час, необхідний для знаходження платформи, з кожним наступним поміщенням тварини у басейн скорочується, що свідчить про навчання та запам'ятовування місцезнаходження

платформи за розташуванням орієнтирів. При порушеннях механізмів пам'яті (наприклад, за впливу хімічних речовин на гіпокамп чи ураженні його внаслідок травми або хвороби [18-20]) просторова пам'ять порушується, і час, потрібний на знаходження платформи, не зменшується з наступними повторами тестування, чи навіть навпаки – збільшується в міру прогресування ураження пам'яті, а поведінка тварин, їх траєкторія у басейні стає хаотичнішою [21]. За загальним часом, затраченим для знаходження платформи у різних спробах, статистично достовірних відмінностей між групами не виявлено, однак у 2-й групі спостерігали тенденцію до його зростання. При порушеннях функціонування просторової пам'яті часто трапляється, що тварина взагалі не може знайти платформу за 3 хв. Тому ми взяли до уваги такий показник, як відсоток вдалих спроб – відносна частка тварин у кожній групі, які змогли відшукати платформу за відведений час. За цим показником істотне порушення також було виявлене у 2-й групі, де спостерігали статистично вірогідне зниження відсотка вдалих спроб (таблиця).

Отже, тривале введення низьких доз ХПФ чинить негативний вплив на механізми просторової пам'яті та спричиняє порушення як короткочасної, так і довготривалої пам'яті у самих щурів, які одержували ХПФ у дозі 10 мг/кг. Це корелює з літературними даними [4, 11-13], згідно з якими одним з основних негативних наслідків впливу ХПФ на нервову систему є погіршення пам'яті.

Тест темно-світла камера використовується у вивченні впливу різноманітних факторів на функціональний стан нервової системи, зокрема на рівень тривожності та активності дослідницької поведінки, та базується на інстинктивному прагненні гризунів шукати сховок у затемнених закритих місцях, уникаючи відкритих та яскраво освітлених просторів [15, 22, 23]. Тестування тварин у темно-світлій камері протягом дослідного періоду було проведено тричі з інтервалом у 10 діб (для збереження ефекту новизни).

Тривалість перебування тварин у світлій частині до переходу в темну залежала від групи і була найбільшою у контролі та мінімальною у 2-й групі (рис. 1, а). Вона зменшувалася у прямій залежності від дози ХПФ, яку отримували тварини. Кількість виглядувань тварин з нірки також залежала від групи і була мінімальною в контролі та зростала у 1-й і 2-й групах (див. рис. 1, б).

Математичний показник суми тривалості перебування у світлій частині та кількості виглядувань (показник загальної тривожності та дослідницької активності) статистично достовірно залежав від групи. Щодо кількості випадків зворотного переходу тварини у світлу частину камери, то за цим показником відмінностей між групами виявлено не було. Збільшення тривалості перебування у світлій частині, зростання кількості виглядувань та повертань у світлу частину з темної може свідчити про зниження тривожності тварини та зростання потягу до дослідження нових територій (неофілія). Найзначніші зміни

Частка вдалих спроб (випадків знаходження твариною платформи протягом 3 хв тестування) у тесті Морріса

Група тварин	Частка вдалих спроб, %							
	1-ша доба		11-та доба		17-та доба		21-ша доба	
	Перша спроба	Друга спроба	Перша спроба	Друга спроба	Перша спроба	Друга спроба	Перша спроба	Друга спроба
Контроль	80	80	80	80	100	100	100	100
1-ша	100	70	100	100	70	100	100	100
2-га	40*	100	60*	80	80	100	80	80

Вказано доби від початку введення хлорпірифосу. *P<0,05 порівняно з контролем.

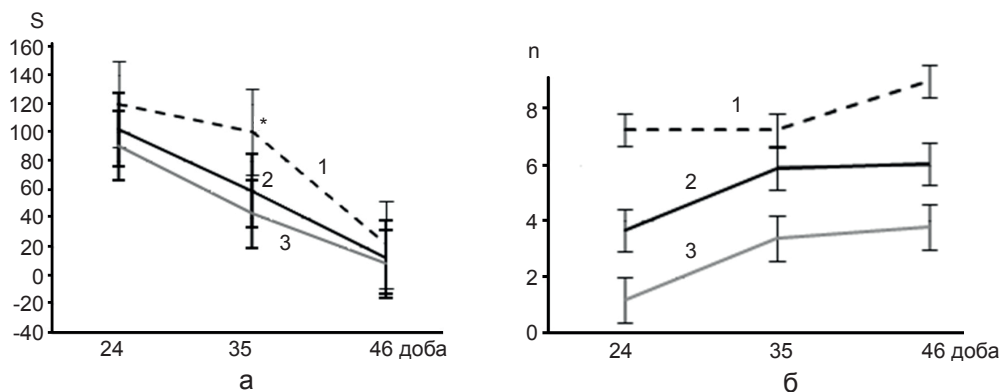


Рис. 1. Результати тестування шурів за методикою темно-світла камера: а – тривалість перебування у світлій частині камери; б – кількість виглядувань з нірки. 1 – контроль, 2 – 1-ша, 3 – 2-га група. Доби вказані від початку введення хлорпірифосу. * $P < 0,05$ порівняно з контролем.

цих показників спостерігали у 2-й групі. Одержані результати доволі важко інтерпретувати однозначно, оскільки залишається дискусійним питання про залежність вказаних поведінкових показників саме від тривожності або від інших факторів, наприклад, від загальної рухової активності тварин.

В основі тесту відкрите поле [16] лежить природний потяг тварин до дослідження нової території та відмінності його інтенсивності у тварин з різним рівнем емоційності [24, 25]. У цьому тесті визначаються показники дослідницької активності (горизонтальна та вертикальна активність) та тривожності (довгий та короткий грумінг, дефекація).

За горизонтальною (зовнішньою та внутрішньою) (рис. 2, а, б) і вертикальною активністю (див. рис. 2, в) статистично достовірних відмінностей між групами виявлено не було.

Кількість актів довгого грумінгу на початку тестування (перша доба після введення токсину) в обох дослідних групах статистично вірогідно була вищою, ніж у контролі (у контрольній групі вона була відносно стабільною протягом усього періоду дослідження), однак з часом показники дослідних і контрольної груп практично зрівнялися (див. рис. 2, г). Ці зміни можна пояснити гострим впливом ХПФ на організм тварин одразу після введення та поступовою адаптацією організму до постійного надходження низьких доз ХПФ.

За кількістю актів короткого грумінгу (див. рис 2, д) спостерігали аналогічну тенденцію у 1-й групі: вона була достовірно вищою у першу добу після початку введення ХПФ та поступово знизилася до рівня контрольної групи. Однак, на відміну від довгого грумінгу, кількість актів короткого у 2-й групі, як і у контролі, залишалася відносно стабільною.

Інтенсивність дефекації (див. рис. 2, е) також відрізнялася за групами: кількість актів дефекації у 1-й групі була вірогідно вищою за контроль у першу добу після початку введення препарату, а згодом спадала; у 2-й групі – навпаки, була мінімальною у першу добу та поступово зростала до рівня контролю. Отже, можна говорити про поступову адаптацію організму шурів до тривалого введення ХПФ. Кількість актів дефекації у всіх трьох групах знизилася на 9-ту добу введення, однак це зниження не було залежним від групи і могло бути зумовлене іншими факторами.

За результатами двох тестів, спрямованих на дослідження емоційності (відкрите поле та темно-світла камера), спостерігалася загальна тенденція до змін показників емоційності та тривожності у шурів, які отримували ХПФ порівняно з контрольною групою; однак вона не була чітко залежною від дози. У тесті відкрите поле тривожність тварин переважно зростала на самому початку введення

препарату, але поступово нормалізувалася. У тесті темно-світла камера показники, які прийнято вважати індикаторами рівня тривожності шурів, знижувалися. Ці результати переగుкуються з низкою літературних даних:

у деяких роботах вплив ХПФ призводив до зниження показників тривожності тварин [8], а в деяких дослідженнях [9], навпаки, тривожність шурів зростала.

Отже, низькі дози ХПФ, які умовно

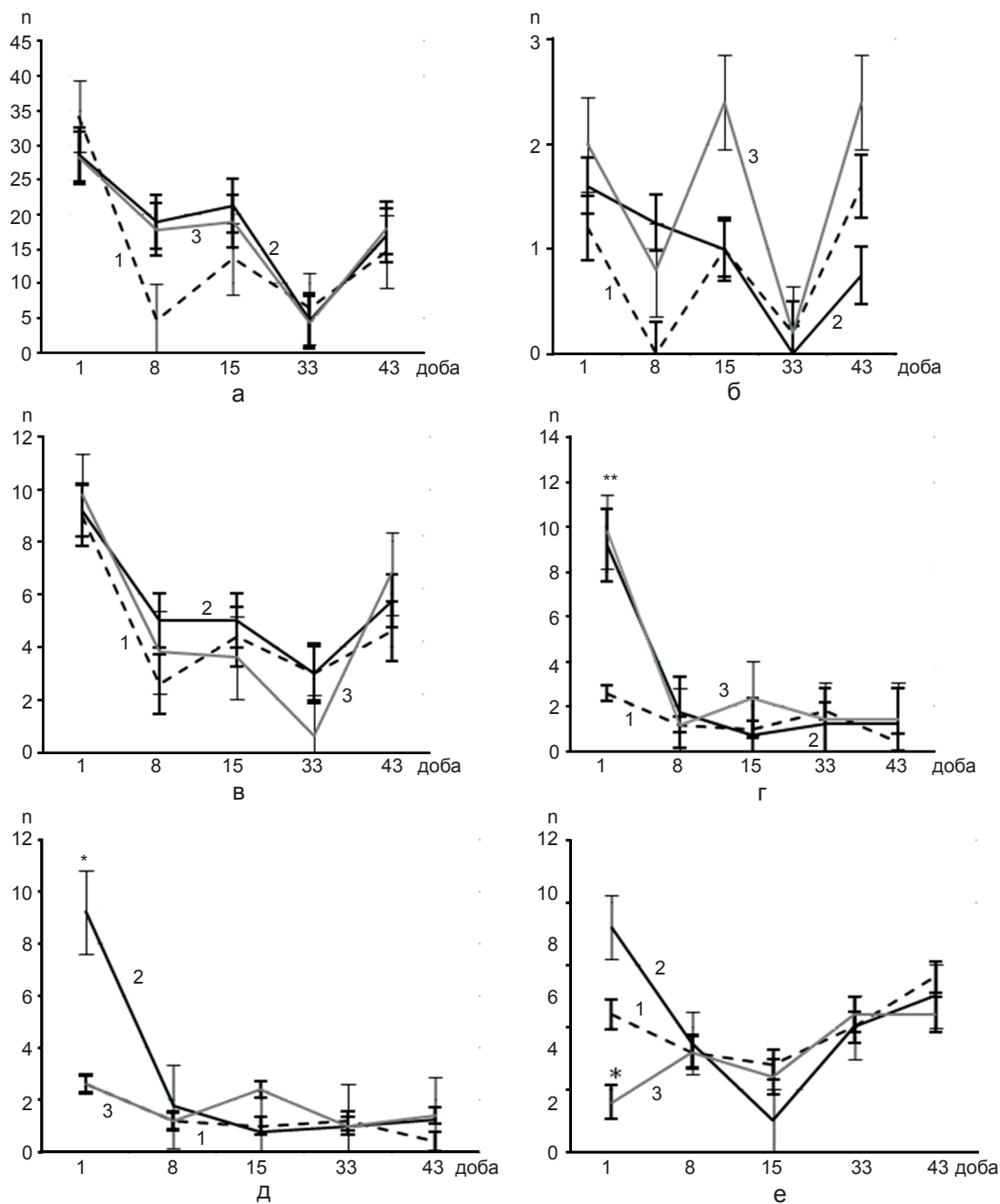


Рис. 2. Результати тестування шурів за методом відкрите поле: а – зовнішня горизонтальна рухова активність; б – внутрішня горизонтальна рухова активність; в – вертикальна рухова активність; г – довгий грумінг; д – короткий грумінг; е – дефекація. 1 – контроль, 2 – 1-ша, 3 – 2-га група. Доби вказані від початку введення хлорпірифосу.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,001$.

вважаються безпечними, при хронічному впливові можуть негативно впливати на функціональний стан ЦНС.

С.В. Грабовская, Ю.Т. Салыга

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НИЗКИМИ ДОЗАМИ ХЛОРПИРИФОСА НА ПОВЕДЕНИЕ САМОК КРЫС

В работе исследовали влияние длительного введения низких доз хлорпирифоса на поведение самок лабораторных крыс. Животным ежедневно в течение месяца вводили хлорпирифос в дозах 5 и 10 мг/кг и изучали его влияние на ряд важных поведенческих показателей с помощью тестов: водный лабиринт Морриса, открытое поле и темно-светлая камера. Было обнаружено, что хлорпирифос в дозе 10 мг/кг ухудшает кратко- и долговременную пространственную память, снижает общую активность, вызывает резкие колебания уровня тревожности (она значительно возросла в начале введения ксенобиотика и со временем нормализовалась). Аналогичные тенденции, но менее выраженные, наблюдали в группе, получавшей токсическое соединение в дозе 5 мг/кг. Результаты исследования позволяют сделать вывод, что длительное (30 сут) поступление в организм самок крыс малых доз хлорпирифоса оказывает негативное влияние на функциональное состояние их нервной системы. Ключевые слова: хлорпирифос; фосфорорганические соединения; крысы; поведение; память; открытое поле; водный лабиринт Морриса; темно-светлая камера.

S.V. Grabovska, Y.T. Salyha

THE EFFECT OF CHRONIC INTOXICATION WITH LOW DOSES OF CHLORPYRIFOS ON THE BEHAVIORAL PARAMETERS OF FEMALE RATS

We explored the effect of chronic chlorpyrifos intake on the behavior of female laboratory rats. The animals were exposed to chlorpyrifos in doses 5 and 10 mg/kg daily for a month long and tested with behavioral tests: Morris water maze, Open field test, and Dark/light box. Everyday chlorpyrifos intake in dose 10 mg/kg was revealed to cause long- and short-term spatial memory lesion, decrease in total activity, sharp changes in the level of anxiety (it significantly increased at the start of xenobiotic intake, and then normalized with time). Similar trends, though less intense, were observed in the group exposed to 5 mg/kg chlorpyrifos. From the survey results it can be concluded that long-term (30 days long) intake of even low doses of chlorpyrifos can cause adverse effects on the functional state of nervous system.

Keywords: chlorpyrifos; organophosphates; rats; behavior; memory; Open field; Morris water maze; Light/Dark box.

Institute of Animal Biology National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Lviv;

REFERENCES

1. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. *Visnyk of Lviv University. Biology series.* 2010; 54:3–14.
2. Salyha Y. Chlorpyrifos leads to oxidative stress-induced death of hippocampal cells in vitro. *Neurophysiology.* 2013; 45(3):193-9.
3. Slotkin TA, Seidler FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull.* 2007; 72(4/6):232-74.
4. Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect.* 2011; 8(119):1196-201.
5. Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and parkinson's disease – is there a link? *Environ Health Perspect.* 2006; 2(114):156–64.
6. Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah IN. Tipping the balance of autism risk: potential mechanisms linking pesticides and autism. *Environ Health Perspect.* 2012; 7(120):944–51.
7. Richendrfer H, Pelkowski SD, Colwill RM, Créton R. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 4(34):458-65.
8. Ricceri L, Venerosi A, Capone F, Cometa MF, Lorenzini P, Fortuna S, Calamandrei G. Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci.* 2006; 1(93):105-13.
9. Braquenier JB, Quertemont E, Tirelli E, Plumier JC. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol.* 2010; 2(32):234-9.
10. Mullen BR, Khialeeva E, Hoffman DB. Decreased reelin expression and organophosphate pesticide exposure alters mouse behavior and brain morphology. *ASN Neuro.* 2013; 5(1):27-42.
11. Aldridge JE, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect.* 2005; 5(113):527-531.
12. Terry AV Jr, Beck W, Warner S, Vandenhuerk L., Callahan PM. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropyl-fluorophosphate. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 1(34):1-8.
13. Yan C, Jiao L, Zhao J, Yang H, Peng S. Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 4(34):442-9.
14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg; 1986.
15. Bourin M., Hascoe M. The mouse light/dark box test. *Eur*

- J Pharmacol. 2003; 463:55-65.
16. Hall CS, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology. 1932; 6:1-12.
17. Morris RGM, Garrud P, Rawlins PNJ, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature. 1982; 297:681-3.
18. Acharjee S, Nayani N, Tsutsui M, Hill MN, Ousman SS, Pittman QJ. Altered cognitive-emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis. Cytokine and hormonal correlates. Brain Behav. Immun. 2013 Oct; 33:164-72.
19. Liu CL, Chen H, Jiang Y, Tu PF, Zhong M, Ma J., Ding H., Zhang WX, Jin XM. Effects of echinacoside on extracellular acetylcholine and choline levels of hippocampus and striatum of cerebral ischemia rats. Yao Xue Xue Bao. 2013; 5(48):790-3.
20. Zheng SQ, An LX, Cheng X, Wang YJ. Sevoflurane causes neuronal apoptosis and adaptability changes of neonatal rats. Acta Anaesthesiol Scand. 2013; 57(9):1167-1174.
21. Davis S, Butcher SP, Morris RG. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J Neurosci. 1992; 1(12):21-34.
22. Chaouloff F, Durand M, Mormède P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. Behav Brain Res. 1997; 1(85):27-35.
23. Heijtz RD., Wangc Sh, Anuard F, Qiana Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberc M L, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Rochellys Diaz Heijtz. 2011; 108(7):3047-52.
24. Kasimova SK. Anxiety-like behavior in rats and its dependency on the lighting mode. Mod probl sci ed. 2006; 2:45-7.
25. Grabovskaya SV, Salyha YT. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? Neurophysiology. 2014; 46 (4):376-80.

Матеріал надійшов до редакції 05.11.2013

П.І. Янчук, С.М. Атамнах, Є.М. Решетнік, Ю.А. Левадянська, Н.О. Нікітіна,
С.П. Весельський

Роль серотоніну в регуляції тканинного дихання і жовчосекреторної функції печінки

Київський університет ім. Тараса Шевченка; E-mail: yanchuk49@ukr.net

У гострих дослідях на лабораторних щурах-самцях показано, що серотонін (10 мкг/кг) при внутрішньопортальному введенні посилює споживання кисню печінкою на 28,8% ($P < 0,001$) та знижує рівень напруження кисню в ній на 19,3% ($P < 0,001$). Дія його на тканинне дихання печінки реалізується через 5-HT₂-рецептори, тому що попередня блокада їх кетансерином (3 мг/кг) призводить як до усунення впливу екзогенного серотоніну, так і до пригнічення дії ендогенного аутокоїда. Серотонін зменшує об'єм секретованої жовчі на 13,5% ($P < 0,05$), а також підвищує концентрацію кон'югованих жовчних кислот і зменшує вміст вільних холатів, що вказує на їх посилену кон'югацію з таурином і гліцином у клітинах печінки. Водночас цей біогенний амін не стимулює синтез первинних жовчних кислот. При його введенні в умовах блокади 5-HT₂-рецепторів кетансерином швидкість секреції жовчі також знижується, але при цьому не проявляється стимулювальний вплив аутокоїда на кон'югацію жовчних кислот з таурином і гліцином та не зменшується вміст у жовчі вільних холатів. Ключові слова: серотонін; 5-HT₂-рецептори; печінка; напруження та споживання кисню; жовч; жовчні кислоти.

ВСТУП

Печінка – найбільша залоза організму, яка бере участь у процесах травлення, обміну речовин, кровообігу, секреції, екскреції, кровотворення, знешкодження отруйних речовин тощо. Висока метаболічна її активність тісно пов'язана з інтенсивністю тканинного дихання в ній. Модулятором його може бути серотонін – біогенний амін, який відіграє важливу роль як нейротрансмітер, гормон і міжклітинний месенджер у регуляції діяльності мозку та вісцеральних систем [1, 2]. Серотонін утворюється в результаті гідроксилування амінокислоти L-триптофану в цитоплазмі нервових закінчень. Він накопичується в синаптичних міхурцях, виділяється під впливом нервових імпульсів і взаємодіє зі специфічними рецепторами. Але переважна більшість його в організмі (до 90%) синтезується ентерохромафіновими клітинами

у шлунково-кишковому тракті, звідки транспортується в різноманітні ділянки тіла і, в першу чергу, по ворітній вені до печінки [3].

Дія серотоніну зумовлюється експресією відповідних рецепторів на всіх типах клітин печінки [4, 5]. Слід відзначити, що із семи родин серотонінових рецепторів у різних клітинних популяціях печінки найбільш інтенсивно експресуються 5-HT₂-рецептори, які опосередковують вплив аутокоїда на метаболічні та регенеративні процеси в тканині цього органа [6–9]. Нині більшість досліджень гепатотропних ефектів серотоніну спрямовані на з'ясування його дії на регенерацію і канцерогенез у печінковій тканині [10]. Однак питання впливу цього біогенного аміну на секрецію жовчі, як одного із показників, що відображає функціональний стан печінки, є недостатньо вивченим. До того ж, аналіз концентрацій таких специфічних компонентів жовчі, як жовчні кислоти

© П.І. Янчук, С.М. Атамнах, Є.М. Решетнік, Ю.А. Левадянська, Н.О. Нікітіна, С.П. Весельський

здійснювався лише у плазмі крові [11, 12]. Секреція – жовчі це складний багатоетапний процес, що відбувається за участі переважно киснезалежних процесів [13], таких, зокрема, як синтез жовчних кислот [14]. Але дія серотоніну в регуляції кисневого гомеостазу печінки залишається нез'ясованою.

Мета нашої роботи – дослідити вплив серотоніну на тканинне дихання печінки, холерез і жовчнокислотний склад жовчі у щурів та з'ясувати ступінь залучення 5-HT₂-рецепторів до реалізації цих ефектів аутокоїда.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 78 білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою 220–280 г, наркотизованих тіопенталом натрію (60мг/кг) або уретаном (1 г/кг), *in vivo* в умовах гострого експерименту.

Тиск крові в сонній артерії та ворітній вені реєстрували електроманометром ЕМТ-31. Напруження кисню (рО₂) в печінці щурів вимірювали полярографом LP-9 у хроноамперометричному режимі при фіксованій напрузі – 0,6 В, використовуючи 2-3 покритих склом платинових (індикаторних) електроди, розташованих у різних ділянках печінки. Як індиферентний використовували стандартний каломельний електрод від рН-метра. Калібрували електроди за методикою Березовського [15]. Всі показники записували на реєстраторі Н071.6М.

Розраховували коефіцієнти споживання печінкою кисню за швидкістю зниження напруження кисню в паренхімі печінки під час півхвилинної оклюзії ворітної вени та печінкової артерії [16].

Забір жовчі здійснювали з канюльованої жовчної протоки. Впродовж перших 30 хв визначали вихідний рівень жовчовиділення за допомогою збору трьох 10-хвилинних порцій жовчі. Розраховували середню об'ємну швидкість секреції жовчі, яку виражали у мікролітрах за хвилину на 1 г печінки (мкл*хв*г⁻¹). Після взяття проби жовчі №1 (за

перші 30 хв досліді – вихідний рівень) у відповідних серіях експериментів щурам внутрішньопортально вводили наступні речовини: фізіологічний розчин із розрахунку 1 мл/кг (контроль), серотонін (10 мкг/кг, «Sigma», США), кетансерин (3 мг/кг, «Sigma», США), кетансерин і через 30 хв – серотонін у зазначених дозах. Тривалість гострого експерименту була 3 год, тому у кожній серії дослідів збиралося 6 півгодинних проб жовчі.

Розділення фракцій жовчних кислот у зібраних півгодинних пробах жовчі щурів проводили методом тонкошарової хроматографії. Для відділення жовчোকислотної фази до жовчі додавали ацетон-етанольну суміш (3:1), яку центрифугували після витримування в морозильній камері. Висушений екстракт розчиняли у суміші етанол-вода (6:4). Хроматографічну пластинку з пробами поміщали у камеру з системою розчинників: аміловий ефір оцтової кислоти–толуол–бутанол–оцтова кислота–вода (3:1:1:3:1). Кількісне визначення вмісту жовчних кислот і холестерину здійснювали за допомогою денситометра ДО-1 (λ=620нм) після фарбування зразків за калібрувальними кривими [17]. Використаний метод дав змогу визначати у жовчі щурів такі жовчні кислоти: таурохолева, таурохенодезоксихолева і тауродеззоксихолева (у суміші), глікохолева, глікохенодезоксихолева і глікодезоксихолева (у суміші), холева, хенодезоксихолева і деззоксихолева (у суміші). Концентрацію жовчних кислот розраховували у міліграм–відсотках.

Всі проведені експериментальні дослідження відповідають принципам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви ЄЕС №609 (1986) та наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин».

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням пакета

Statistica 7.0 («Stat Soft», США). Перевірку на нормальність проводили за критерієм Шапіро-Вілکا. У разі нормального розподілу (це стосується змін показників кровообігу і кисневого гомеостазу печінки) їх представляли у $M \pm SD$. Результати досліджень жовчосекреторної функції печінки мали розподіл відмінний від нормального. Відмінності між групами контроль і дослід знаходили за критерієм Манна-Уїтні, а між вихідним рівнем і пробами №2-6 – за критерієм Вілкоксона. Статистичні результати при цьому подані у $(Me[Q25;Q75])$. Вірогідними вважалися відмінності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вихідні значення показників кровообігу і кисневого балансу печінки у дослідних щурів становили: системний артеріальний тиск (САТ) – $121,9 \pm 6,9$ мм рт. ст., тиск у ворітній вені (Твв) – $7,7 \pm 0,2$ мм рт. ст., pO_2 – $35,2 \pm 0,9$ мм рт. ст.

Внутрішньопортальне введення серотоніну в дозі 10 мкг/кг викликало вірогідне

підвищення Твв на 35% від вихідного рівня та зниження САТ на 25% і pO_2 в паренхімі печінки на 19,3%. Це свідчить про те, що серотонін у вказаній дозі викликає зростання Твв, ймовірно, всього, за рахунок їхнього звуження, та зниження тиску в артеріях організму, у тому числі й в печінковій артерії, завдяки їх розширенню. Як відомо, значна частка кисню надходить до печінки з оксигенованою кров'ю по печінковій артерії. Тому зниження рівня pO_2 в залозі поряд із зростанням постачання до неї O_2 може свідчити про збільшення споживання кисню печінкою під впливом серотоніну. Подібні зміни досліджуваних показників при дії гуморальних чинників ми спостерігали раніше [18].

Як засвідчили наші подальші дослідження, дійсно, серотонін зумовлює збільшення коефіцієнта споживання кисню печінкою. Вже на 5-й хвилині після введення аутокоїда спостерігалось підвищення цього показника відносно вихідного рівня ($4,5 \pm 0,32$) на 11,1% ($P < 0,05$), а найістотніше його зростання на 28,8% ($P < 0,001$) відбувалося на 20-й хвилині досліді (рис. 1).

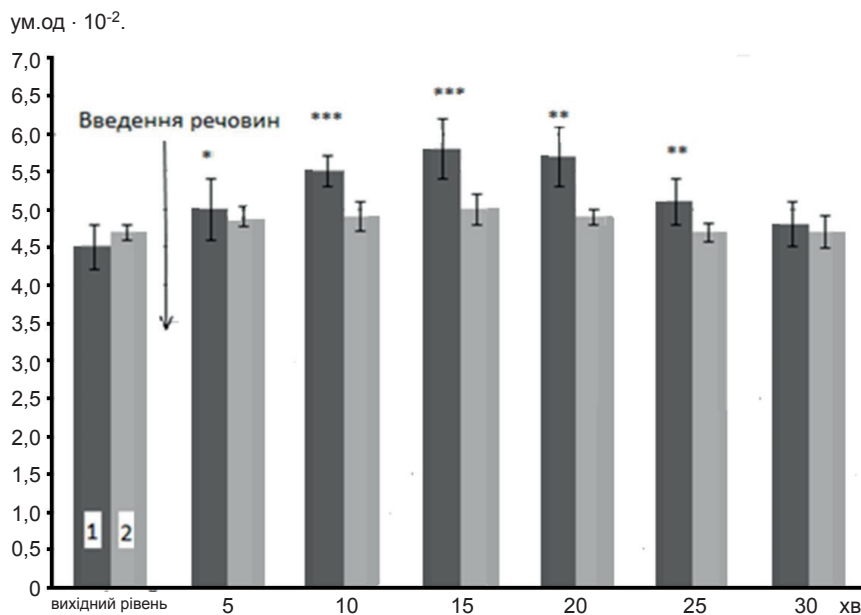


Рис.1. Зміни коефіцієнта споживання кисню печінкою ($M \pm SD$) при внутрішньопортальному введенні серотоніну в дозі 10 мкг/кг до (1) та на фоні дії (2) кетансерину (3 мкг/кг). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ вірогідність змін відносно вихідного рівня

Як зазначалось вище, із семи родин серотонінових рецепторів, виявлених у печінці, найбільш інтенсивно експресуються і, до того ж, опосередковують дію серотоніну на метаболічні процеси в залозі 5-HT₂-рецептори [6, 9]. Тому ми вирішили з'ясувати їхню роль у реалізації стимулювальної дії серотоніну на тканинне дихання печінки.

Проведені нами експерименти показали, що введення блокатора 5-HT₂-рецепторів кетансерину пригнічувало споживання кисню печінкою на 16,7% ($P < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем ($4,8 \pm 0,33$). Це може свідчити про блокування стимулювальної дії ендогенного серотоніну на тканинне дихання в печінці. Разом з тим кетансерин повністю усував зміни коефіцієнта споживання кисню залозою, зумовлені дією серотоніну (див. рис.1).

Отже, результати цієї серії експериментів свідчать про те, що введення серотоніну викликає посилення споживання кисню печінкою. Попередня блокада 5-HT₂-рецепторів за допомогою кетансерину призводить як до пригнічення дії ендогенного серотоніну, так і до усунення впливу екзогенного аутокоїда. Це вказує на те, що стимулювальна дія серотоніну на тканинне дихання печінки реалізується через 5-HT₂-рецептори.

У зв'язку з тим, що серотонін стимулює споживання кисню печінкою, він може виступати як активатор у ній киснезалежних процесів, зокрема секреції жовчі. Остання, як відомо, є результатом інтеграції низки біохімічних реакцій в печінці, належну роль серед яких відіграють метаболічні киснезалежні процеси, пов'язані з переносом електронів у мітохондріальному та мікросомальному (ендоплазматична сітка) ланцюгах окиснення. Інтенсивність секреції жовчі значною мірою може свідчити про функціональний стан печінки, а зміни вмісту в жовчі специфічних органічних компонентів відображають перебіг багатьох обмінних процесів у гепатоцитах [13, 19].

Оскільки серотонін вводили розведеним

у фізіологічному розчині, було проведено серію дослідів з його введенням (1 мл/кг). Виявлено, що у контрольних дослідах об'ємна швидкість секреції жовчі коливалася в межах 1,11 [1,01; 1,70] – 1,37 [0,95; 1,78] мкл/хв•г печінки, але ці зміни були статистично не вірогідні. Серотонін у дозі 10 мкг/кг справляє гіпохолеретичний ефект, викликаючи зменшення об'єму секретованої жовчі на 8–13,5 % відносно вихідного рівня ($P < 0,05$), який виявляється вже в першій півгодинній пробі після введенні аутокоїда і триває впродовж всього експерименту. Максимальне зменшення об'єму секретованої жовчі (на 13,5%; $P < 0,05$) спостерігалось на 70-й хвилині досліді (рис. 2).

Для виявлення можливої участі 5-HT₂-рецепторів в опосередкуванні дії серотоніну на холерез у щурів була проведена серія дослідів з введенням кетансерину. При введенні одного лише блокатора спостерігалось зниження швидкості секреції жовчі протягом всього досліді. Вихідний рівень показника становив 1,04 [0,95; 1,28] мкл/хв•г. У другій півгодинній пробі (після введення кетансерину) холерез знижувався на 27,9 % ($P < 0,01$; рис. 3). У разі введення серотоніну на фоні блокади 5-HT₂-рецепторів

кетансерином максимальне зниження швидкості секреції жовчі на 22,4 % ($P < 0,01$) спостерігалось на 160-й хвилині досліді (рис. 4).

Таким чином, в експериментах з введення серотоніну в умовах блокади 5-HT₂-рецепторів кетансерином спостерігається зниження інтенсивності холерезу подібне до такого при дії одного лише блокатора.

Утворення і секреція жовчі є специфічною функцією печінки, яка залежить від інтенсивності перебігу численних метаболічних реакцій у її клітинах. Однією з рушійних сил секреції жовчі є осмотичнозалежне надходження води у жовчні каналікули внаслідок активного транспорту таких осмотично активних речовин, як жовчні кислоти. Зміни динаміки об'ємної швидкості секреції жовчі

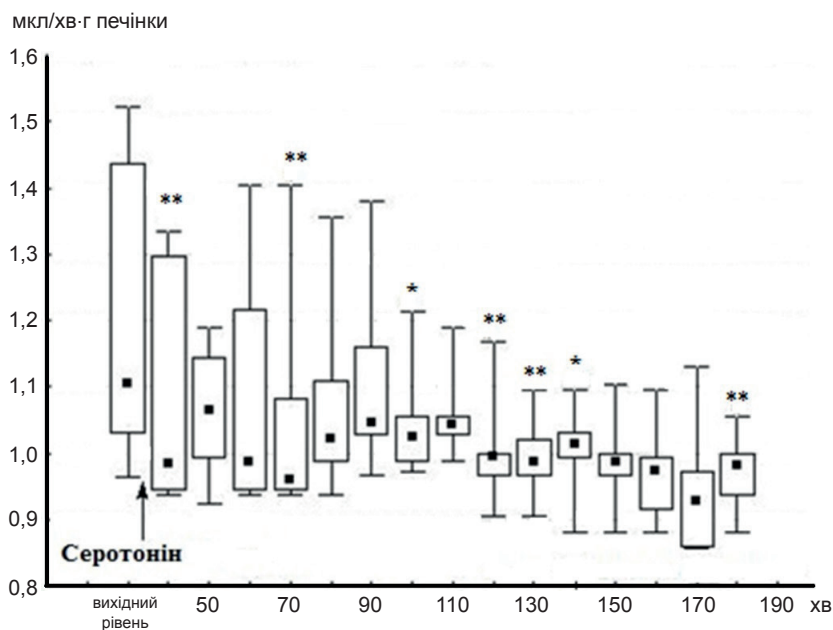


Рис. 2. Зміни швидкості холерезу у щурів при внутрішньопортальному введенні серотоніну (Me[Q25;Q75]; n=7). * P<0,05; ** P<0,01 відносно вихідного рівня показника (середнє значення трьох перших десятихвилинних проб)

під впливом регуляторних сполук переважно пов'язані з їхнім впливом як на інтенсивність вилучення холатів із синусоїдної крові при проходженні ентерогепатичної циркуляції, так і на процеси їх внутрішньоклітинної

біотрансформації, кон'югації з таурином і гліцином, гідроксильовання та на внутрішньоклітинний транспорт із подальшою секрецією через апікальну мембрану до первинних жовчних каналців [13]. Виявлені зміни

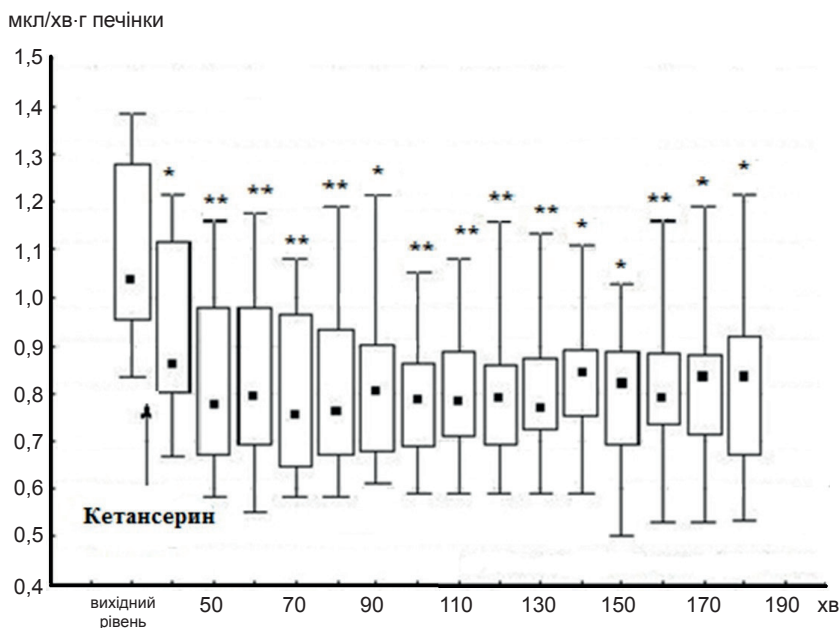


Рис. 3. Швидкість холерезу у щурів при внутрішньопортальному введенні кетансерину (Me[Q25;Q75]; n=13). * P<0,05; ** P<0,01 відносно вихідного рівня показника (середнє значення трьох перших десятихвилинних проб)

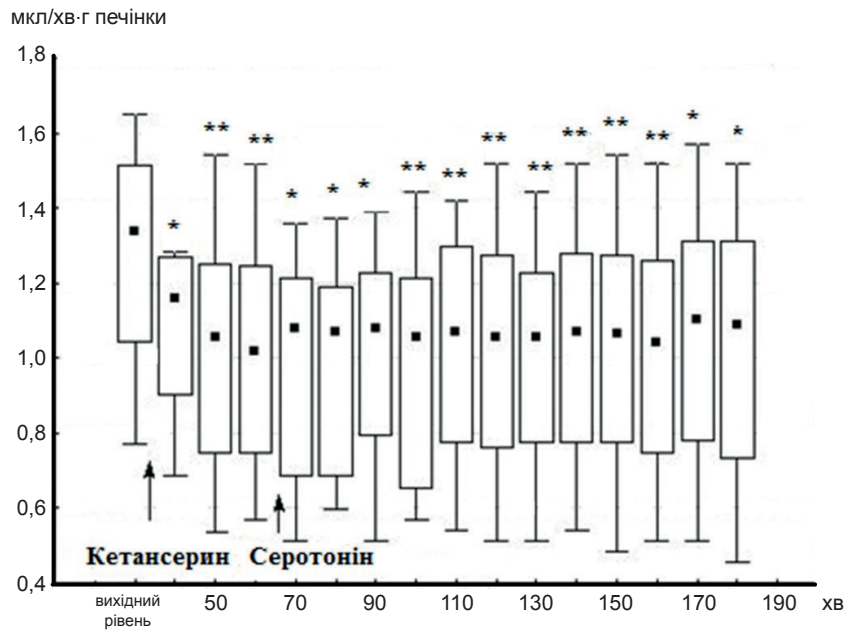


Рис. 4. Зміни швидкості холерезу у щурів при введенні серотоніну на фоні дії кетансерину (Me[Q25;Q75]; n=16). * P<0,05; ** P<0,01 відносно вихідного рівня показника (середні значення трьох перших десятихвилинних проб)

холесекреції під впливом серотоніну та при блокаді 5-НТ₂-рецепторів стали підґрунтям для подальших досліджень жовчиконоскладу жовчі, зібраної впродовж гострих дослідів.

Встановлено, що серотонін викликає статистично значущі зміни концентрацій жовчних кислот усіх визначених фракцій (таблиця). Концентрація таурохолевої кислоти збільшувалася у другій півгодинній пробі жовчі на 8,6% і у четвертій – на 11,2 %. Надалі до кінця дослідів вміст таурохолату набував значень, близьких до вихідного рівня. Також виявлено підвищення концентрації таурохенодезоксихолевої і тауродезоксихолевої кислот на 11,9, 7,3 і 6,7 % в другій, третій і четвертій пробах жовчі відповідно. Вміст глікохолевої кислоти у жовчі отриманий впродовж першого півгодинного проміжку після введення серотоніну був вищим від вихідного рівня на 14,2 %, а у третій і четвертій пробах – на 6,5 і 7,8 % відповідно. Концентрація дигідроксихоланових глікокон'югатів зростала на 13,4 % у другій пробі жовчі та на 9,5 % у третій і четвертій пробах. Під впливом серо-

тоніну концентрація вільних холатів значуще знижувалася порівняно з вихідним рівнем впродовж всього експерименту. Мінімального значення (на 27,6 % менше від вихідного рівня) концентрація холевої кислоти сягала у п'ятій півгодинній пробі. Концентрація хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот виявилася найнижчою відносно вихідного рівня (на 24,8 %) у четвертій півгодинній пробі жовчі. Таким чином, після введення аутокоїда, концентрація в жовчі кон'югованих холатів зростає, а вільних – знижується порівняно з вихідним рівнем. Це може зумовлюватися впливом серотоніну на активність ферментів кон'югації вільних холатів з таурином і гліцином, на транспортні системи апікального домену плазматичних мембран гепатоцитів, а також на здатність активно вилучати жовчні кислоти з крові синусоїдів.

Як і на попередньому етапі досліджень, для виявлення можливої участі 5-НТ₂-рецепторів у механізмі дії серотоніну на зміни концентрацій холатів у жовчі щурів була проведена серія дослідів з введенням блокатора цього типу рецепторів (див.таблицю).

Зміни концентрації кон'югованих і вільних жовчних кислот (мг%) у півгодинних пробах жовчі шурів під впливом серотоніну, при блокаді 5-HT₂ – рецепторів кетансеріном та під впливом серотоніну на фоні дії кетансерину (Me [Q25;Q75]; n=18).

№ проби	Серія дослід	Таурохолева кислота	Тауроходезоксик-холева і тауродезоксикхолева кислоти	Глікохолева кислота	Глікохенодезоксикхолева і глікодезоксикхолева кислоти	Холева кислота	Хенодезоксикхолева і дезоксикхолева кислоти
Вихідний рівень							
1	серотонін	171,8 [159,6; 181,1]	88,0 [83,0; 93,9]	139,3 [131,6; 152,3]	23,2 [19,1; 32,6]	23,2 [20,9; 25,4]	14,5 [12,6; 16,4]
	кетансерин	169,9 [166,8; 184,8]	93,4 [89,4; 103,7]	147,0 [129,9; 162,2]	26,8 [22,7; 29,0]	22,3 [16,4; 27,2]	10,6 [9,5; 11,5]
	кетансерин і серотонін	176,1 [152,3; 191,0]	88,5 [78,6; 101,7]	146,1 [138,9; 155,0]	27,7 [26,3; 31,7]	19,6 [17,3; 27,2]	10,5 [8,8; 12,8]
Введення серотоніну або кетансерину							
2	серотонін	186,6 [176,7; 211,7]*	98,5 [89,4; 109,1]*	159,1 [141,5; 168,6]*	26,3 [22,7; 34,4]*	19,6 [17,3; 21,8]*	12,2 [10,8; 14,2]*
	кетансерин	153,7 [145,1; 171,2]*	82,1 [78,6; 97,5]*	133,9 [119,0; 148,8]*	22,9 [18,2; 24,6]*	23,5 [17,3; 28,6]	10,5 [9,8; 11,9]
	кетансерин і серотонін	156,9 [133,4; 173,0]*	77,6 [66,9; 86,9]*	133,9 [124,4; 139,8]*	22,6 [20,9; 24,5]	23,2 [19,9; 29,0]*	11,3 [9,5; 12,6]
Введення серотоніну в умовах блокади 5-HT ₂ кетансеріном							
3	серотонін	181,1 [164,0; 217,1]	94,4 [85,8; 104,6]*	148,3 [144,2; 164,0]	25,4 [23,4; 36,2]	19,6 [17,3; 21,8]	12,2 [10,8; 14,2]
	кетансерин	159,5 [146,0; 165,9]*	84,4 [80,3; 95,7]*	134,3 [121,7; 155,0]	25,0 [19,1; 27,2]	20,9 [15,5; 27,2]	10,0 [9,6; 10,8]
	кетансерин і серотонін	172,6 [144,2; 188,4]	83,6 [74,0; 89,4]	144,7 [139,4; 151,4]	26,3 [25,2; 29,0]	21,4 [16,8; 26,3]	10,9 [8,8; 11,9]
4	серотонін	191,0 [178,9; 221,6]*	93,9 [90,2; 109,6]*	150,1 [141,5; 168,6]	25,4 [24,1; 40,7]	17,2 [15,5; 19,1]	10,9 [9,2; 11,9]
	кетансерин	165,4 [152,3; 172,1]*	88,9 [81,2; 98,4]*	148,3 [127,1; 156,9]	25,3 [20,5; 30,2]	21,4 [14,6; 25,4]	9,4 [9,2; 10,6]
	кетансерин і серотонін	181,3 [150,6; 195,6]	90,8 [81,2; 105,5]	151,9 [146,0; 163,1]	28,6 [27,2; 29,0]	20,6 [16,2; 23,6]	9,8 [8,6; 10,8]
5	серотонін	178,5 [169,5; 206,3]	88,5 [83,0; 101,9]	137,5 [135,2; 144,2]	23,6 [20,9; 35,3]	16,8 [16,2; 19,8]*	12,0 [9,5; 12,4]*
	кетансерин	162,8 [144,2; 168,6]*	87,6 [83,0; 92,0]*	145,1 [122,6; 147,5]	23,6 [17,3; 27,2]*	20,5 [12,8; 23,4]*	9,4 [8,7; 10,1]*
	кетансерин і серотонін	170,6 [155,0; 188,4]	87,5 [83,0; 95,7]	143,8 [139,8; 151,4]	25,3 [24,5; 26,1]	20,9 [17,3; 25,4]	9,5 [9,2; 10,4]
6	серотонін	165,4 [145,1; 179,4]	83,6 [77,7; 88,5]	128,9 [121,7; 136,1]*	21,8 [19,1; 27,2]	19,1 [18,2; 20,9]*	12,6 [10,4; 12,8]*
	кетансерин	162,2 [139,8; 164,0]*	83,5 [81,2; 89,4]*	139,8 [116,3; 145,1]*	20,5 [15,5; 25,2]*	20,0 [14,2; 24,1]	9,2 [8,6; 9,9]*
	кетансерин і серотонін	160,9 [146,0; 182,0]*	84,5 [77,7; 92,0]	139,8 [132,5; 149,7]	23,9 [22,7; 26,3]*	21,5 [16,8; 26,1]	9,8 [8,7; 10,2]

Примітки: *P<0,05 порівняно з вихідним рівнем.

Найбільш виражені зміни концентрації більшості кон'югованих холатів спостерігались у першій півгодинній пробі після введення кетансерину. Так, для дигідроксихоланових таурокон'югатів відмічено максимальне зниження їх концентрації (на 12,1 % ($P<0,05$), а для тригідроксихоланових тауро- і глікокон'югатів – на 9,5 і 8,9 % ($P<0,05$) відповідно відносно вихідних рівнів). Концентрації вільних жовчних кислот сягали мінімальних значень тільки наприкінці досліду, так само як і вміст дигідроксихоланових глікокон'югатів. Зокрема, концентрація холевої кислоти була меншою від вихідного рівня на 11,6 % ($P<0,05$) у п'ятій пробі жовчі. Вміст хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот найбільше знижувався на 13,2 % ($P<0,05$) у останній шостій пробі жовчі. Отже, після введення кетансерину зменшувався вміст в жовчі як кон'югованих, так і вільних жовчних кислот.

При введенні серотоніну на фоні попередньої блокади 5-НТ₂-рецепторів кетансерин у третій, четвертій і п'ятій пробах жовчі, тобто впродовж 1,5 год після введення аутокоїда, концентрації всіх жовчних кислот вірогідно не відрізнялися від вихідного рівня (див. таблицю). Лише у останній (шостій) пробі жовчі спостерігалось зниження концентрації таурохолевої кислоти на 8,6 % ($P<0,05$) і глікохенодезоксихолевої та глікодезоксихолевої кислот – на 13,7 % ($P<0,05$) порівняно з вихідним рівнем. Отже, під впливом серотоніну, введенного на фоні блокади 5-НТ₂-рецепторів, не настільки посилювалася кон'югація жовчних кислот із таурином та гліцином, як в умовах дії лише аутокоїда, однак при цьому не виявлялося і значного зниження концентрації вільних і кон'югованих холатів.

Отже, внутрішньопортальне введення серотоніну (10 мкг/кг) посилює киснезалежні синтетичні процеси у печінці, зокрема, пов'язані з мітохондріальними поліферментними системами біосинтезу жовчних кислот, з одночасною активацією в гепато-

цитах тканинного дихання. При цьому рО₂ в залозі знижується. Реалізація цих ефектів аутокоїда відбувається частково за участі 5-НТ₂-рецепторів та, ймовірно, через інший тип серотонінових рецепторів. Поряд з цим кетансерин пригнічує холерез, що, можливо, зумовлено його прямою дією на гепато- та холангіоцити і не пов'язано зі здатністю бути блокатором 5-НТ₂-рецепторів.

**П.І. Янчук, С.М. Атамнах, Е.Н. Решетник,
Ю.А. Левадяньская, Н.А. Никитина,
С.П. Весельский**

РОЛЬ СЕРОТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ И ЖЕЛЧЕСЕКРЕ- ТОРНОЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ

В острых опытах на лабораторных крысах показано, что серотонин (10 мкг/кг) при внутривенном введении вызывает усиление потребления кислорода печенью на 28,8% ($P<0,001$) и понижение уровня напряжения кислорода в ней на 19,3% ($P<0,001$). Действие его на тканевое дыхание печени реализуется через 5-НТ₂-рецепторы, потому что предварительная блокада их кетансерин (3 мг/кг) приводит как к устранению влияния экзогенного серотонина, так и к угнетению действия эндогенного аутокоида. Серотонин уменьшает объем секретированной желчи на 13,5% ($P<0,05$), а также повышает концентрацию конъюгированных желчных кислот и уменьшает содержание свободных холатов, что указывает на их усиленную конъюгацию с таурином и глицерином в клетках печени. Одновременно этот биогенный амин не стимулирует синтез первичных желчных кислот. При введении серотонина в условиях блокады 5-НТ₂-рецепторов кетансерин скорость секреции желчи также понижается, однако при этом не проявляется стимулирующее влияние аутокоида на конъюгацию желчных кислот с таурином и глицерином и не уменьшается содержание в желчи свободных холатов. Ключевые слова: серотонин; 5-НТ₂-рецепторы; печень; напряжение и потребление кислорода; желчь; желчные кислоты.

**P.I. Yanchuk, S.M. Athamnah, E.M. Reshetnik,
J.A. Levadyanska, N.O. Nikitina, S.P. Veselsky**

ROLE OF SEROTONIN IN THE REGULATION OF RESPIRATION AND BILE SECRETORY FUNCTION OF THE LIVER

In acute experiments on laboratory male rats we have shown that serotonin (10 mkg / kg, intraportal) increased the oxygen consumption of by liver on 28.8% ($P < 0.001$) and reduced oxygen tension levels on 19.3% ($P < 0.001$). The action of

serotonin on tissue respiration in liver realized through 5-HT₂ receptors because previous blockade by ketanserin (3 mg/kg) led to remove the effects of exogenous serotonin and inhibition of the action of endogenous autacoid. Serotonin reduced the amount of secreted bile on 13.5% ($P < 0.05$), and increases the concentration of conjugated bile acids and decreases the content of free cholate, indicating enhanced conjugation with taurine and glycine in the liver cells. However, serotonin didn't stimulate synthesis of primary bile acids. Introduction of serotonin in the conditions of 5-HT₂ receptors blockade by ketanserin also led to speed decrease of bile secretion, but in this case stimulating effect of autacoid on bile acid conjugation with taurine and glycine wasn't manifested and content of free cholate wasn't reduced.

Key words: serotonin; 5-HT₂ receptors; liver; oxygen tension and oxygen consumption; bile, bile acids.

Taras Shevchenko National University of Kyiv

REFERENCES

1. Gill R.K., Saksena S., Tyagi S. Serotonin inhibits Na⁺/H exchange activity via 5-HT₄ receptors and activation of PKC in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2005; 28(4): 962–74.
2. Morita H., Mochiki E., Takahashi N., Kawamura K., Watanabe A., Sutou T., Ogawa A., Yanai M., Ogata K., Fujii T., Ohno T., Tsutsumi S., Asao T., Kuwano H. Effects of 5-HT_{2B}, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonists on gastrointestinal motor activity in dogs. *World J. Gastroenterol*. 2013; 19(39): 6604–12.
3. Guanglin C., Helge L.W. Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13(4): 493–6.
4. Nagao Y., Akahoshi T., Kamori M., Uehara H., Hashimoto N., Kinjo N. Liver regeneration is promoted by increasing serotonin content in rat liver with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology Research*. 2011; 41(8): 784–94.
5. de las Casas-Engel M., Domínguez-Soto A., Sierra-Filardi E., Bragado R., Nieto C., Kroger A.P., Samaniego R., Loza M., Corcuera M.T., Gómez-Aguado F., Bustos D.M., Sánchez-Mateos P., Corbí A.L. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR_{2B} and HTR₇. *J Immunol*. 2013; 190(5): 2301–10.
6. Tudhope S.J., Wang C.C., Petrie J.L., Potts L., Malcomson F., Kieswich J., Yaqoob M.M., Arden C., Hampson L.J., Agius L. A novel mechanism for regulating hepatic glycogen synthesis involving serotonin and cyclin-dependent kinase-5. *Diabetes*. 2012; 61(1): 49–60.
7. Sumara G., Sumara O., Kim J.K., Karsenty G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metabolism*. 2012; 16(5): 588–600.
8. López M.L., Kielsing C.O., Uribe Cruz C. Platelet increases survival in a model of 90% hepatectomy in rats. *Liver International*. 2013; 11(10): 123–6.
9. Hampson L.J., Mackin P., Agius L. Stimulation of glycogen synthesis and inactivation of phosphorylase in hepatocytes by serotonergic mechanisms, and counter-regulation by atypical antipsychotic drugs. *Diabetologia*. 2007; 50(8): 1743–51.
10. Papadimasa G.K., Tzirogiannisa K.N., Mykoniatisa M.G., Grypioti A.D., Manta G.A., Panoutsopoulos G.I. The emerging role of serotonin in liver regeneration. *Swiss Med Weekly*. 2012; 142(4): w13548.
11. Watanabe H., Akasaka D., Ogasawara H., Sato K., Miyake M., Saito K., Takahashi Y., Kanaya T., Takakura I., Hondo T., Chao G., Rose M.T., Ohwada S., Watanabe K., Yamaguchi T., Aso H. Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology*. 2010; 151(10): 4776–86.
12. Watanabe H., Saito R., Nakano T., Takahashi H., Takahashi Y., Sumiyoshi K., Sato K., Chen X., Okada N., Iwasaki S., Harjanti D.W., Sekiguchi N., Sano H., Kitazawa H., Rose M.T., Ohwada S., Watanabe K., Aso H. Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88058.
13. Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(37): 5641–49.
14. Dikkers A., Tietge U.F. Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(47): 5936–45.
15. Berezovsky V.A. The oxygen tension in the tissues of animals and humans. – K.: Naukova Dumka, 1975. – 280 c. [Russian]
16. Tsybenko V.O., Egorova L.S., Myhailova N.V. Neurogenic control of oxidative metabolism in the liver. *Physiology J. of USSR*. 1988; 5: 737–45. [Russian]
17. A. 4411066/14 USSR, MBI G 01 N33/50. A method of determining bile acids in biological fluids / S.P. Veselsky, P.S. Liashenko, I.A. Lykianenko (USSR). - № 1624322; Stat. 25.01.1988; publ. 30.01.1991, Bull. №4. [Ukrainian]
18. Yanchuk P., Bondzyk O., Reshetnik Ye., Veselsky S. Effect of L-arginine on oxygen balance of the liver and the bile secretion function. *Fiziol. Zh.* 2013; 59(2): 31–8. [Ukrainian]
19. Boyer J.L. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*. 2013; 3(3): 1035–78.

Матеріал надійшов до редакції 30.01.2015

О.С. Кривопустов, В.Є. Досенко

Алельний поліморфізм гена рецептора прогестерону та його значення при невиношуванні вагітності

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця МОЗ України, Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ. E-mail: kryvopustov@gmail.com

В огляді подано сучасне уявлення про прогестерон і його роль у забезпеченні репродуктивної функції жінки, описано будову та функціональне призначення прогестеронового рецептора. Наголошується значення невиношування вагітності та вже відомі причини виникнення зазначеного стану. Показано вплив алельного поліморфізму гена рецептора прогестерону при невиношуванні вагітності.

Ключові слова: прогестерон; прогестероновий рецептор; поліморфізм; невиношування; самовільний аборт; передчасні пологи.

ВСТУП

Прогестерон відіграє важливу роль у забезпеченні репродуктивної функції жінки, регуляції менструального циклу, імплантації зиготи, розвитку матки, забезпеченні маткового спокою протягом вагітності та попередженні передчасного дозрівання шийки матки [1-4]. Це 21-вуглецевий стероїдний гормон, який виробляється тека-клітинами в лютеїнізованій гранульозі (клітинах жовтого тіла під час лютеїнової фази менструального циклу) та синцитіотрофобласті плаценти під час вагітності. Тека-клітини та жовте тіло продукують менше ніж 1 мг прогестерону за добу [5]. Він транспортується в крові за допомогою транскортину - основного транспортного білка для глюкокортикоїдів і прогестинів у крові, та альбуміну. Це призводить до того, що лише 2 % прогестерону знаходяться у вільній, незв'язаній формі. Як відомо, саме вільна форма біологічно активна, що і забезпечує вплив цього гормону на тканини-мішені [3,6]. Період напіврозпаду прогестерону – 90-105 хв, продуктом його

розпаду є прегнандіол, котрий утворюється в печінці. Концентрація прогестерону в плазмі зазвичай менше 1,5 нг/мл протягом фолікулярної фази менструального циклу, а протягом лютеїнової фази – 12-16 нг/мл [7]. Вміст прогестерону в крові вагітної жінки зростає з розвитком вагітності від 3,0 – 148,0 нг/мл у першому триместрі до 28,0 – 242,6 нг/мл в третьому триместрі.

Прогестерон за своїм фізіологічним впливом індукує овуляцію, сприяє імплантації та підтриманню розвитку вагітності на всіх термінах; в молочній залозі забезпечує лобулярно-альвеолярний розвиток для підготовки до секреції молока [2, 6]; в головному мозку сприяє нейроповедінковому вираженню, пов'язаному з сексуальною чутливістю та гальмуванням ЦНС [8], впливає на кісткову тканину, запобігаючи втраті кісткової маси [9].

Переважаюча частина ефектів прогестерону в організмі опосередковується його рецепторами, саме від їх кількості та афінності залежить дія цього стероїдного гормону [10]. Ці рецептори кодуються геном рецептора

© О.С. Кривопустов, В.Є. Досенко

прогестерону (PGR), який знаходиться на хромосомі 11q22-23 і складається з 8 екзонів [11]. Рецептор прогестерону, також відомий як NR3C3 (ядерний рецептор підтипу 3, групи С, варіант 3) існує в 2 різних ізоформах: PR-A та PR-B. Вони різняться між собою наявністю на N-кінці PR-B фрагмента з 164 амінокислотних залишків, відсутнього в PR-A. Для підготовки до вагітності та її підтримки прогестероном необхідний PR-A, а для розвитку молочної залози – PR-B. [12, 13, 14, 15]

На першому етапі прогестерон взаємодіє зі своїм рецептором, який димеризується та розпізнає в ДНК таку послідовність: 7RGNACANRNTGTNCY+7, що складається з гексамерних половинних сайтів, розділених нуклеотидами NRN [16]. Далі йде активація транскрипції відповідних чутливих генів. У результаті на третьому етапі утворюється mРНК, яка транспортується в цитоплазму до рибосом для продукції специфічних протеїнів. Дослідження показують, що механізми проведення сигналів прогестерону множинні, тканниносpezifічні та включають широкий спектр регуляторних білків і низькомолекулярних посередників [17]. Корегулятори, тобто коактиватори і корепресори ядерних рецепторів, являють собою велику групу білків з різним механізмом впливу [18]. Вважається, що специфічність гормональної дії формується значною мірою саме на рівні корегуляторів [19].

Крім того, прогестерон взаємодіє і з іншими клітинами, наприклад, імунної системи. Відомо, що за наявності достатньої його кількості лімфоцити продукують прогестероніндукований блокувальний фактор (PIBF), а його ефекти залучають як клітинні, так і гуморальні імунні механізми. PIBF є медіаторним білком 34-кДа, який впливає на баланс цитокінів, що виробляються Т-хелперами 1-го і 2-го типу. Відбувається перехід від абортотенного домінування цитокінів, які продукуються Th1 до переважання цитокінів, які продукуються Th2 [20]. Таким чином,

достатня концентрація цього стероїдного гормону перешкоджає відторгненню зародка. PIBF підвищується зі збільшенням терміну гестації та різко знижується після закінчення 40 тиж при нормальному перебігу вагітності, а при загрозі викидня і передчасних пологах відзначається більш низький вміст PIBF. Зараз вивчаються питання патогенетичних механізмів продукції прогестероніндукованого блокувального фактора, генетичної схильності до його експресії.

Крім ефектів прогестерону, які повільно розвиваються, можуть розвиватися і швидкі відповіді клітин. На плазматичній мембрані багатьох типів клітин виявлені білки, які специфічно зв'язують зазначений гормон і можуть бути його рецепторами [21-24]. Нестача секреції прогестерону під час вагітності може спричинити загрозу переривання вагітності, самовільний викидень, загрозу передчасних пологів, передчасні пологи [2, 6].

Невиношування вагітності нині є однією з головних проблем в акушерстві. Цей термін об'єднує велику кількість різних нозологічних форм, починаючи від самовільного переривання вагітності на її початку до передчасних пологів у терміні гестації 36 тиж і 6 діб [25]. За прийнятою в Україні класифікацією, якщо зазначений стан виникає 2 або більше раз, то таке невиношування вважається звичним [26, 27]. Звичне невиношування в усьому світі залишається актуальним, адже зазначена проблема зачіпає 1–3 % пар, які хочуть мати дітей [28].

Відповідно до Міжнародної класифікації хвороб 10-го перегляду, велика нозологічна група невиношування вагітності поділяється на самовільний аборт – переривання вагітності в перші 22 тиж. Виділяють ранній самовільний аборт до 11 тиж та 6 діб та пізній самовільний аборт від 12 до 21 тиж та 6 діб. Після зазначеного терміну переривання вагітності до терміну 36 тиж та 6 діб вважається передчасними пологами.

Відомо, що ця патологія має мультифакторну етіологію [34], тобто зазначе-

ний патологічний стан може виникнути в результаті комплексного впливу різноманітних негативних зовнішніх і внутрішніх факторів [35, 36]. До відомих чинників ризику виникнення невиношування треба віднести генетичні фактори як з боку плоду, так і з материнського боку, нейроендокринні, імунологічні, інфекційні впливи, аномалії розвитку статевих органів і порушення системи згортання крові, стани, пов'язані з різноманітною акушерською патологією [27, 29, 32, 33]. Проте приблизно у 50 % подружніх пар, які страждають від звичного невиношування, жодного з зазначених факторів не вдається знайти, саме таке невиношування називають ідіопатичним [31].

Найважливішими серед усіх чинників є генетична неповноцінність з боку ембріона, адже хромосомні аномалії, наприклад, генні мутації (зміни структури генів внаслідок замін, делецій, інсерцій нуклеотидів у ланцюжку ДНК), хромосомні мутації (порушення структури хромосом внаслідок транслокацій, делецій, дуплікацій, інверсій), геномні мутації (зміни числа хромосом) найчастіше призводять до невиношування вагітності [27, 29]. Саме через відсутність можливості впливати та коригувати ці процеси, відповідно до чинних протоколів в Україні та в світі, збереження вагітності до 8 тиж не рекомендується та відбувається тільки за наполяганням вагітної, адже цілком природнім процесом є відторгнення ембріона з генетичною патологією [30].

Генетичні чинники з боку матері мають менший вплив на виношування вагітності порівняно з факторами з боку плода, але з розвитком фармакогенетики їх вивчення є одним з найперспективніших.

Дослідження поліморфізму генів, що мають вплив на різні соматичні захворювання, протягом останнього десятиріччя значно покращили прогнозування та лікування різноманітної патології. В акушерстві набуло поширення вивчення таких поліморфізмів, як генів 2-ї фази детоксикації (GSTM1,

GSTT1, GSTP1), генів, що відповідають за обмін гомоцистеїну (MTHFR, MTRR), генів головного комплексу гістосумісності (DQA1, DQB1), генів, які регулюють тиск крові (ACE, NOS3) [27, 43-46]. Проте питання дослідження поліморфізму генів, у тому числі гена рецептора прогестерону (PGR) в контексті патології, пов'язаної з вагітністю, залишається недостатньо вивченим.

Як відомо, поліморфізмом називається одночасне існування в популяції декількох алельних варіантів одного гена. Національний центр біотехнологічної інформації (NCBI USA) визначає однонуклеотидний поліморфізм (від англ. single nucleotide polymorphism, SNP) як заміну в послідовності ДНК. Він є одним з найбільш представлених в геномі людини [38]. Однонуклеотидні поліморфізми можуть бути бі-, три-, і тетраалельними. Однак у людини три- і тетраалельні поліморфізми настільки рідкісні, що можна вважати, що взагалі не зустрічаються, тому під однонуклеотидними поліморфізмами часто розуміють бі-алельні [39]. SNP зміна відбувається коли один нуклеотид, такий як А, замінює один з трьох інших С, G, або Т, що приводить до заміни комплементарної основи [40].

Функціональні характеристики білків можуть сильно змінюватися від практично нейтрального ефекту генетичного поліморфізму до повного порушення функції відповідного білкового продукту. На молекулярному рівні функціональні поліморфізми впливають на людський фенотип втручанням на обох рівнях механізму синтезу білка: некодуючі поліморфізми руйнують сайти зв'язування транскрипційних факторів, сайти сплайсингу і інші функціонально важливі сайти на транскрипційному рівні, в той час як кодуючі поліморфізми можуть бути причиною амінокислотної заміни та зміни функціональних або структурних властивостей білка, що транслюється [41].

За даними досліджень геноміки однонуклеотидні заміни в смислових ділянках гена

в більшості випадків впливають на експресію, тим самим змінюючи такі характеристики білка, як третинну структуру, стабільність зв'язування з субстратом і проміжними метаболітами, посттрансляційну модифікацію [42].

Поліморфізм може спричиняти порушення експресії певних генів, змінювати перебіг біохімічних процесів в організмі матері і сприяти патологічному перебігу гестаційного процесу.

За даними Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information) на 2015 р. описано 2191 поліморфізмів PGR у людини, проте за останні роки проведено незначну кількість досліджень, які висвітлюють роль SNPs-гена рецептора прогестерону в формуванні схильності до розвитку різноманітної патології вагітних та ефективності лікування зазначеної патології [47].

Згідно з аналізом світової комплексної бази даних про генетичні асоціації та епідеміологію геному людини HuGE Navigator, проведено 2 повногеномних пошуків асоціацій (GWAS - genome-wide association study), спрямованих на виявлення зв'язів між SNPs і розвитком звичного ідіопатичного невиношування.

В першому дослідженні Li Wang та співавт. [48], визначили генетичні локуси, які можуть бути чутливими до виникнення звичного ідіопатичного невиношування у китайській популяції. У ньому взяли участь 44 пацієнти з цією патологією під час першого триместру вагітності та 44 здорові жінки (контроль). Дослідження проведено за типом «випадок–контроль», повногеномний пошук асоціацій (GWAS) та було проаналізовано 430 поліморфних мікросателітних маркерів. Знайдені 3 локуси, 6q27, 9q33.1, і Xp22.11, які значною мірою пов'язані з досліджуваною патологією.

Другий пошук, опублікований Kolte та співавт. [28], був спрямований на визначення генетичних локусів, чутливих до виникнення

звичного ідіопатичного невиношування у сім'ях, де вже були такі випадки. Дослідження складалося з 2 частин. В епідеміологічній частині представлено інформацію про частоту викиднів серед 268 сибсів 244 пацієток (пробандів, матерів досліджуваних сибсів), які мали ідіопатичне звичне невиношування в анамнезі. Генетична частина представлена даними повногеномного пошуку асоціацій (GWAS) у 38 сибсів, які мали ідіопатичне звичне невиношування. Всі пацієнти-пробанди, включені в обстеження, мали 3 або більше викиднів, а сибси - 2 або більше викиднів. Автори вважають, що сибси хворі на ідіопатичне звичне невиношування проявляють більш високу частоту викиднів, ніж у контрольній групі незалежно від віку на момент вагітності. Вони визначили хромосомні ділянки за допомогою LOD-рахунків (від англ. logarithm of the odds score) в діапазоні між 2,5 і 3,0 в підгрупах постраждалих сибсів. Максимальні LOD-бали були визначені в чотирьох випадках: для rs10514716 (3p14.2) при аналізі тільки сибсів; для rs10511668 (9p22.1) і rs341048 (11q13.4), коли тільки аналізували сім'ї, де пробанди мали 4 або більше викиднів, та rs10485275 (6q16.3) при аналізі тільки одного сибса з кожної родини. Жодних мутацій не було визначено. Отримані результати свідчать, що пацієнти (пробанди), які мали в анамнезі досліджувану патологію та їх сибси мають фактори, які збільшують ризик виникнення викидня. Автори визначили регіони на хромосомах 3, 6, 9 та 11, які впливають на виникнення звичного невиношування.

Отже, в першому та другому GWAS визначили, що певні локуси на 6-й та 9-й хромосомах впливають на виникнення звичного ідіопатичного невиношування. В першому пошуку визначено вплив на розвиток досліджуваної патології локусів 22-ї хромосоми, а в другому – 3-ї та 11-ї.

У мета-аналіз, проведений в 2011 р. Mei-Tsz Su та співавт. [49], залучено 6 досліджень з приводу поліморфізму гена рецептора прогестерону. Сумарно було здійснено

вивчення генетичного матеріалу від 741 жінки в основних групах та у 734 осіб у групах контролю. Визначено зв'язок між поліморфізмом гена рецептора прогестерону та звичним невиношуванням вагітності у 2 дослідженнях, а саме Schweikert [50] та Su MT [51]. Інші 4 дослідження не виявили зв'язку поміж поліморфізмом гена рецептора прогестерону та звичним невиношуванням вагітності [52].

Mei-Tsz Su та співавт. [53] показали зв'язок між поліморфізмом гена рецептора прогестерону та звичним ідіопатичним невиношуванням вагітності. В цьому дослідженні взяли участь 300 жінок, 121 пацієнтка у основній групі та 179 осіб групи контролю. Проведено генотипування 8 SNPs PGR. Усі пройшли комплексне обстеження, яке включало детальний збір анамнезу, клінічне обстеження, трансвагінальне ультразвукове дослідження, гістеросальпінгографію, глюкозотолерантний тест, визначення функції щитоподібної залози (Т3, Т4, ТТГ), факторів тромбофілії (антикардіоліпінові антитіла, вовчаковий антикоагулянт, антитромбін III, протеїн S, протеїн C) та ендокринологічний профіль на 3-ю добу менструального циклу (фолікулостимулювальний гормон, лютеїнізуючий гормон, пролактин і тестостерон). В контрольну групу увійшли жінки, які не мали самовільного абортів в анамнезі та будь-яких інших ускладнень перебігу вагітності. Визначено, що частота поліморфізму PGR rs1042838 достовірно значно вище у жінок з випадками ідіопатичного звичного невиношування порівняно з контрольною групою ($P=0,006$). Гаплотип C-C, який наявний в rs590688C>G та rs11224592T>C, асоціювався зі зменшенням ризику виникнення звичного невиношування вагітності ($P=0,004$).

Nicole та співавт. [54] показали роль поліморфізму гена рецептора прогестерону в визначенні ризику виникнення передчасних пологів. Забір ДНК проводили у матері та/або батька новонародженого. Досліджували

7 SNP PGR у 415 родинах. Оцінено роль генетичної варіації, яку вивчали для відбору жінок з високим та низьким ризиком розвитку передчасних пологів порівняно з популяційним ризиком. Загалом забір генетичного матеріалу був здійснений у 440 передчасно народжених дітей в терміні гестації від 22 до 36 тиж та одного або обох батьків. Усі передчасно новонароджені діти були розподілені за гестаційним віком на 3 підгрупи, 1-шу склали діти в терміні від 22 до 27 тиж, 2-гу від 28 до 33 тиж та в 3-ю увійшли діти в терміні від 34 до 36 тиж. Одноплідна вагітність спостерігалась у 312 жінок з SNPs rs1942836 та rs1893505, які превалювали у 2-й підгрупі ($P<0,01$). Було визначено зв'язок між передчасними пологами та наявністю поліморфізму гена рецептора прогестерону rs653752 ($P=0,007$), rs503362 ($P=0,008$) та rs4754732 ($P=0,03$) в групі з одноплідною вагітністю. SNPs rs653752 ($P=0,04$), rs503362 ($P=0,03$) превалювали у 2-й підгрупі. SNP rs1942836 ($P=0,04$) значно превалював саме у 3-й підгрупі. При аналізі ДНК плодів у групі з одноплідною вагітністю, а саме в 2-й підгрупі переважали SNPs rs1942836 та rs1893505 ($P<0,01$). Лише SNP rs1942836 ($P<0,01$) відзначався у новонароджених при аналізі усіх підгруп разом. В групі вагітних двійнею SNP rs1942836 відзначався у плодів в 2-й підгрупі [54].

Питання використання знань про поліморфізм гена рецептора прогестерону для фармакотерапії є одним з найперспективніших. Трасу та співавт. [55] визначали, чи існують відмінності у результатах застосування 17- α -гідроксипрогестерону капроату для попередження повторних передчасних пологів в залежності від поліморфізму гена рецептора прогестерону. Проведено вторинний порівняльний аналіз між 17- α -гідроксипрогестерону капроатом та плацебо. Досліджували 20 SNPs PGR. Для оцінки зв'язку між поліморфізмом гена рецептора прогестерону та результатами застосування лікарського засобу було використано багато-

вимірний логістичний регресійний аналіз. Обстежено 380 жінок. З них 253 (66,6%) отримували 17- α -гідроксипрогестерону капроат та 127 (33,4%) отримували плацебо. Показано зв'язок між результатами лікування та генотипом жінок афро-американського походження при пологах менше 37 тиж гестації для rs471767 та rs578029, у жінок латиноамериканок та європоїдної раси при пологах менше 37 тиж гестації для rs500760 та при пологах менше 32 тиж для rs578029, rs503362 та rs666553. Зазначено, що ефективність при використанні 17- α -гідроксипрогестерону капроату для попередження повторних передчасних пологів може залежити від поліморфізму гена рецептора прогестерону.

Таким чином, можна виділити такі варіанти алельного поліморфізму гена рецептора прогестерону, пов'язаного зі звичним ідіопатичним невиношуванням, а саме rs1042838, rs10895068, rs590688, rs11224592. Мінімум у двох дослідженнях був підтверджений вплив саме rs1042838 та rs590688 у розвитку звичного невиношування, проте лише rs10895068 знаходиться в кодуючій частині ДНК, інші є інтронного типу.

GWAS-дослідження не виявили поліморфізмів гена рецептора прогестерону, достовірно пов'язаного зі звичним ідіопатичним невиношуванням, але акцентували увагу на 11-й хромосомі, де знаходиться згаданий ген.

При аналізі варіантів алельного поліморфізму, пов'язаного з розвитком передчасних пологів, можна виділити поліморфізми гена рецептора прогестерону rs471767 та rs500760, як такі, чий вплив у розвитку цієї патології був підтверджений у двох або більше дослідженнях. Обидва SNP знаходяться в кодуючих ділянках ДНК. Інші види алельного поліморфізму гена рецептора прогестерона, які, за даними наукових праць, також пов'язані з виникненням передчасних пологів, а саме, rs1942836, rs653752, rs503362, rs4754732, rs653752, rs1893505, rs578029, rs503362, rs666553 знаходяться в

некодуючих ділянках ДНК

Нині, механізми впливу різних за своїм місцезнаходженням в ДНК поліморфізмів гена рецептора прогестерону на розвиток цієї чи іншої патології залишається відкритим через недостатнє вивчення, адже некодуючі функціональні поліморфізми можуть руйнувати сайти зв'язування транскрипційних факторів, сайти сплайсингу, а кодуючі поліморфізми можуть ставати причиною амінокислотної заміни та зміни функціональних або структурних властивостей білка, що транслюється, проте не визначено, яким чином саме той чи інший поліморфізм впливає на рецепторну відповідь до прогестерону.

Таким чином, актуальність висвітленого питання важко переоцінити, адже щорічно у світі народжується близько 13 млн. недоношених дітей, а 60-70 % випадків ранньої неонатальної смертності припадає саме на частку недоношених дітей. Важливим є і те, що мертвонародження при передчасних пологах відбуваються у 8–13 разів частіше [56, 57]. Також проблема ранніх викиднів протягом багатьох років залишається актуальною, оскільки є найбільш частим ускладненням вагітності і не має тенденції до зниження. Відповідно до сучасних уявлень, частота самовільного переривання вагітності становить 20–25 %, причому до 80 % гестаційних втрат припадає на перший триместр [58]. В Україні жінки з діагнозом «загроза самовільного абортів» складають більше ніж 50 % серед усіх пацієнток гінекологічних стаціонарів. Це свідчить про те, що зазначена проблема має велике медико-соціальне значення, адже завершенням загрози самовільного абортів можуть бути не лише перехід до власне викидню, що відноситься до репродуктивних втрат, а й спричинення збільшенню ризику розвитку плацентарної дисфункції, хронічної гіпоксії плоду та неврологічних порушень у новонароджених [59]. Визначено велику кількість причин та запропоновано багато

різноманітних підходів, спрямованих на боротьбу з цим явищем, але остаточне розв'язання проблеми ускладнюється, на нашу думку, через недостатнє використання можливостей сучасної генетики. Особливу важливість набувають розробки нових високотехнологічних діагностичних підходів, одержання генетичних паспортів репродуктивного здоров'я подружніх пар.

Отже, роль поліморфізму гена рецептора прогестерону в розвитку, перебігу та лікуванні невиношування вагітності суттєва. Від наявності того чи іншого поліморфізму може залежити вірогідність виникнення загрози самовільного аборт, переривання вагітності самовільним аборт, наявності у жінки звичного невиношування, виникнення загрози передчасних пологів в різні терміни гестації або ж завершення вагітності передчасними пологами. Саме тому вивчення клінічного значення поліморфізму гена рецептора прогестерону має бути предметом подальшого наукового пошуку.

А.С. Кривопустов, В.Е. Досенко

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ПРОГЕСТЕРОНА И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

В обзоре представлены современные данные о прогестероне и его роли в обеспечении репродуктивной функции женщины, описано строение и функциональное назначение прогестеронового рецептора. Отмечается значение невынашивания беременности и уже известные причины возникновения указанного состояния. Показано влияние аллельного полиморфизма гена рецептора прогестерона при невынашивании беременности.

Ключевые слова: прогестерон; прогестероновый рецептор; полиморфизм; невынашивание; самопроизвольный аборт; преждевременные роды.

Kryvopustov O.S., Dosenko V.E.

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN HUMAN PROGESTERONE RECEPTOR GENE AND ITS VALUE IN MISCARRIAGE OR PRETERM DELIVERY

This article presents the current understanding of progesterone and its role in female reproductive function, described the

structure and functionality of the progesterone receptor. The attention is focused on the meaning of the terms miscarriage and preterm delivery. Was described the today known causes of the miscarriage and preterm delivery, shown the value of single nucleotide polymorphisms of the progesterone receptor in miscarriage and preterm delivery by the analysis of publications in recent years in order to find connections between different polymorphisms of the progesterone receptor gene and a spontaneous abortion, premature labor, recurrent miscarriage and its impact on progesterone therapy.

Key words: progesteron; progesteron receptor polymorphism; miscarriage; spontaneous abortion; premature birth.

O.O.Bogomoletz National Medical University;

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

REFERENCES

1. C. Clark, Sutherland R. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocrine*. 1990;11: 266–301.
2. Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone. *Middle East Fertility Society Journal*. 2007;(12)3: 197–201.
3. Peltier M. Effect of progesterone on proinflammatory cytokine production by monocytes stimulated with pathogens associated with preterm birth. *Am J Reprod Immunol*. 2008;4: 346–53.
4. Manukhin I. *Gynecological endocrinology*. Moscow. GEOTAR Media. 2013: 272 [Russian].
5. Pfeifer S. Progestins In: *Reproductive Endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996: 503.
6. Graham J. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine*. 1997;18: 502–19.
7. Laycock J. *Essential endocrinology*. Oxford: University press. 1996: 524.
8. Genazzani A. Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum Reprod*. 2000;15: 14–27.
9. Balasch J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum reprod*. 2003;9: 207–22.
10. Romano A. The progestins polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol*. 2007;38: 331–50.
11. Guoyang L. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. *Reprod Sci*. 2008;15: 147–55.
12. Flototto T. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;88: 131–42.
13. Petz L. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;88: 113–22.
14. Madsen G. Prostaglandins differentially modulate

- progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89: 1010–13.
15. Cui X. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23: 7721–35.
16. Lieberman B. The constitution of a progesterone response element. *Mol Endocrinol.* 1993;7: 515–27.
17. Smirnov A. Progesterone molecular biology. *Rus. Chemical. J.* 2005;1: 64–74. [Russian]
18. Li X. Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem.* 2003;278: 39261–64.
19. Nordeen S. Extreme position dependence of a canonical hormone response element. 1998;12: 891–98.
20. Raghupathy R. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol.* 2009;80: 91–9.
21. Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction.* 2003;125: 3–15.
22. Shah C. Progesterone receptors on human spermatozoa. *Indian J Exp Biol.* 2003;41:773–80.
23. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 2003;28: 139–68.
24. Sutter-Dub M. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids.* 2002;67: 77–93.
25. Likhachev V. Practical obstetrics with urgent conditions: Handbook for doctors Moscow. MIA. 2010: 720 [Russian].
26. Sidelnikova V. Habitual pregnancy loss. Moscow. Triad-X. 2002; 304 [Russian].
27. Likhachev V. Practical gynecology with urgent conditions: Handbook for doctors. Moscow. MIA. 2013; 840 [Russian].
28. Kolte A. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Molecular Human Reproduction.* 2011;17: 379–85.
29. Baek K. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med.* 2007;13: 310–17.
30. The order of Ministry of Health of Ukraine from 03.11.2008 № 624. Ministry of Health of Ukraine. 2008;30 [Ukrainian].
31. Christiansen O. Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1990;169: 597–601.
32. Coulam C. Immunotherapy for recurrent pregnancy loss: analysis of results from clinical trials. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:352–59.
33. Rey E. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet.* 2003;361: 901–8.
34. Christiansen O. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;66: 257–67.
35. Adamian L. Genetic aspects of gynecological diseases. Moscow. Medicine. 1998; 216 [Russian].
36. Veropotvelyan N. Role of genetic factors in the origin of reproductive disorders undifferentiated origin. First union congress of med. geneticists: abstracts. Alma-Ata. 1990;76 [Russian].
37. Daher N. Shulzhenko, A. Morgun. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2003;58: 69–77.
38. H. Donis-Keller, P. Green, C. Helms. A genetic linkage map of the human genome. *Cell.* 1987;51: 319–37.
39. Brookes A. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234: 177–86.
40. Hall D. A Single Nucleotide Polymorphism is a change of a nucleotide at a single base-pair location on DNA. 2007.
41. Trubnikova E. A single nucleotide polymorphism in the human genome - important to molecular genetic studies in genetics. Proceedings of the IV Conference «Vedaatechnologie: krok do budoucnosti-2008». Praha. Publishing House “Education and Science». 2008;104 [Russian].
42. Vogel F., Motulsky A. Human Genetics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo. 1986; 378.
43. Christiansen O. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens.* 1994;44: 225–33.
44. Christiansen O., Riisom K., Lauritsen J. Association of maternal HLA haplotypes with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 1989;34: 190–99.
45. Kolte A., Steffensen R., Nielsen H. Study of the structure and impact of human leukocyte antigen (HLA)-G-A, HLA-G-B, and HLA-G-DRB1 haplotypes in families with recurrent miscarriage. *Hum Immunol.* 2010;71:482–88.
46. Bepalov O. Genetic risk factors for miscarriage: the dissertation. St. Petersburg. 2009;40 [Russian].
47. National Center for Biotechnology Information [Electronic source]. 2014. Access to the resource: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
48. Wang L., Wang Z., Xie C., Wang L. Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. *Reprod Sci.* 2010;17: 578–84.
49. Su M, Lin S, Chen Y. Su M. Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2011;96: 1435–44.
50. Schweikert A, Rau T, Berkholz A. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113: 67–72.
51. Su M, Lee I, Chen Y. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28: 239–43.
52. Babbage S. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.*

- 2001;51: 21–7.
53. Su M., Lee I., Chen Y. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. J Assist Reprod Genet. 2011;28: 239–43.
54. Ehn N, Cooper M, Orr K. Evaluation of Fetal and Maternal Genetic Variation in the Progesterone Receptor Gene for Contributions to Preterm Birth. Pediatr Res. 2007;62: 630–35.
55. Tracy A, Manuck M, Yinglei L. Progesterone receptor polymorphisms and clinical response to 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. Am J Obstet Gynecol. 2011;205: 135–135.
56. Frolova O. Medical and social aspects of preterm birth. Obstetrics and Gynecology. 2008;3: 48-50 [Russian].
57. Radzinsky V. Prematurity. Obstetrics and Gynecology. 2009;4: 16-19 [Russian].
58. Tetrushvili N. Early pregnancy loss (immunological aspects, ways of prevention and treatment). Author's thesis. Moscow. 2008; 28 [Russian].
59. Amel'hina V. Long threatened miscarriage. Immediate and long-term outcomes of children. Author's thesis. Moscow. 2007;32 [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 06.10.2014*

CONTENTS

A.V. Lehedza, A.V. Gorkovenko, I.V. Vereshchaka, M. Dornowski, A. I. Kostyukov. Comparative analysis of electromyographic muscle activity of the human hand during cyclic turns of isometric effort vector of wrist in opposite directions	3
S.D. Melnytchuk, S.V. Khyzhnyak, V.S. Morozova, L.I. Stepanova, A.A. Umanskaya, V.M. Voitsitsky. The energy function of rat cardiac mitochondria under artificial hypobiosis	15
V.I. Khoryevin. The contribution of GABA-ergic inhibition to the velocity tuning of the superior colliculus neurons	23
N.V. Grigorova. Allocation of zinc, magnesium and copper in granulocytes and serum of rabbits while introduction of substances that change the functional state of adrenal cortex and the autonomic nervous system	34
L.M. Lisukha, V.A. Berezovskiy. Influence of the normobaric hypoxia on visual-motor children's response lived in radioactively contaminated territories	40
D.M. Nozdrenko, K.I. Bogutska, Yu.I. Prylutsky, V.F. Korolovych, M.P. Evstigneev, U. Ritter, P. Scharff. Impact of C ₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in <i>soleus</i> muscle of rat at ischemia-reperfusion injury	48
Nizar Salim Mohsar, Mohsen Ismail. The status of certain physiological adrenergic responses in albino rats during development of experimental hyperthyroidism	60
D.V. Golyshkin, T.M. Falalyeyeva, K.S. Neporada, T.V. Beregova. The influence of melanin on the gastric mucosa and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis under acute stress conditions	65
Loay Kh.M. Hassouneh. Diacylglycerol accumulation impairs short-term activation of phospholipase D by thyroxine in the liver cells.	73
T. V. Mamontova, L. E. Vesnina, M. V. Mikityuk, N. A. Bobrova, L. A. Kutsenko, I. L. Gordinskaya, I. P. Kaidashev. Fullerene C ₆₀ inhibited free radical and destructive processes in connective tissue during adjuvant arthritis in rats	80
M.S. Pogorelaya. The Influence of extract from embryonic chicken tissue on the dynamic changes of mice blood serum C-reactive protein and cytokines after γ -irradiation	87
S.V. Grabovska, Y.T. Salyha. The effect of chronic intoxication with low doses of chlorpyrifos on the behavioral parameters of female rats	94
P.I. Yanchuk, S.M. Athamnah, E.M. Reshetnik, J.A. Levadyanska, N.O. Nikitina, S.P. Veselsky. Role of serotonin in the regulation of respiration and bile secretory function of the liver	102

REVIEWS

O.S. Kryvopustov, V.E. Dosenko. Single nucleotide polymorphisms in human progesterone receptor gene and its value in miscarriage or preterm delivery	111
--	-----