

Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 1 2014

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

| | |
|--|----|
| <i>Думанська Г.В., Рихальський О.В., Веселовський М.С.</i> Характеристики квантового вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus | 3 |
| <i>Носенко Н.Д., Жолобак Н.М., Полякова Л.І., Сініцин П.В., Лимарева А.А., Щербаков О.Б., Співак М.Я., Резніков О.Г.</i> Морфофункціональний стан репродуктивної системи щурів у період старіння за умов застосування наноцерію . | 11 |
| <i>Панасюк О.С., Шиш А.М., Мойбенко О.О.</i> Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця | 18 |
| <i>Тихомиров А.О., Жерносєков Д.Д., Рока-Мойя Я.М., Діордієва С.І., Гриненко Т.В.</i> Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів | 25 |
| <i>Хома О.М., Заводовський Д.А., Ноздренко Д.Н., Долгополов О.В., Мірошниченко М.С., Мотузюк О.П.</i> Динаміка скорочення ішемізованого камбалоподібного м'яза щура | 34 |
| <i>Лещенко І.В., Шевчук В.Г., Савченко О.А., Фалалєєва Т.М., Суходоля С.А., Берегова Т.В.</i> Ендокринна функція підшлункової залози у щурів за умов експериментального ожиріння | 41 |
| <i>Савчук О.І., Мельник В.С., Гончаров С.В., Шандюк В.Ю., Строй Д.О., Досенко В.Є., Соколова Л.І., Скибо Г.Г.</i> Частота алейного поліморфізму генів субодиниць конституційної та імунної протеасом у хворих на ішемічний інсульт . . | 49 |
| <i>Донської Б.В., Чернишов В.П., Сіренко В.Ю., Стрелко Г.В., Осипчук Д.В.</i> Вплив акцентованої гіпо- та гіперактивності НК-лімфоцитів на імплантацію ембріонів | 56 |
| <i>Бондаренко О.І.</i> Дослідження кальцієвих каналів мітохондріальної мембрани ендотеліальних клітин | 64 |

| | |
|--|-----|
| <i>Варивончик Д.В., Риков С.О., Салюков А.О., Мішенін А.Б., Пишинов Г.Ю., Моїсеєнко Є.В.</i> Морфологічно-функціональні зміни органа зору у зимівників української антарктичної станції “Академік Вернадський” | 70 |
| <i>Шандра О.О.</i> Вплив дельтарану та мелатоніну на стан імунної системи щурів за умов експериментального контактного дерматиту | 78 |
| <i>Могильницька Л.А.</i> Вміст ендотеліального моноцитарного пептиду II у сироватці крові при цукровому діабеті 2-го типу | 84 |
| ОГЛЯДИ | |
| <i>Богуцька К.І., Прилуцький Ю.І., Ноздренко Д.М.</i> Використання алюмінію та його сполук у біомедичних дослідженнях | 91 |
| <i>Романюк Т.В., Дзюбановський І.Я., Кузів О.В.</i> Патологічні механізми формування синдрому портальної гіпертензії | 98 |
| ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ | |
| Ігор Сильвестрович Магура (до 85-річчя з дня народження) | 104 |

Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

Характеристики квантового вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах між кокультивованими гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus

Були досліджені особливості вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах кокультивованих гангліозних клітин сітківки (ГКС) і нейронів superior colliculus (SC) за допомогою методу парної patch-clamp-реєстрації. Використовуючи незалежні методи базового квантового аналізу були визначені квантові параметри вивільнення медіаторів та доведено, що розподіл кількості вивільнених квантів обох медіаторів відповідає біноміальному закону. Показано, що постсинаптичні струми (ПСС), які реєстрували в нейронах SC у відповідь на генерацію потенціалу дії в сомі ГКС, були опосередковані одночасним вивільненням щонайменше 2–14 квантів глутамату та 2 квантів ГАМК, що гарантує високу надійність передачі аферентних сигналів. Припускається, що багатоквантовий характер вивільнення медіаторів може бути пов'язаний зі збудженням декількох терміналей пресинаптичного аксона з однією активною зоною або однієї терміналі з декількома.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, нейрони superior colliculus, синаптична передача, протий біноміальний розподіл, квантовий аналіз.

ВСТУП

Аксоны гангліозних клітин сітківки (ГКС) формують зоровий тракт і забезпечують передачу інтегрованого в ній сигналу в субкортикальні зорові центри. Проекції ГКС до superior colliculus (SC) відповідають першому рівню передачі та обробки аферентних сигналів. Синаптична передача на цьому рівні є ключовим елементом в інтеграції та модуляції сенсорної інформації [4, 12, 16]. Однією з властивостей нейропередачі є флуктуація амплітуд постсинаптичних відповідей одного синаптичного входу, яка відображає квантовий характер вивільнення відповідного нейротрансмітера. Попередні дослідження характеристик квантового вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах між ГКС і нейронами SC проводилися *in vitro* на парасагітальних зрізах SC [5, 8, 15, 19]. При цьому викликані постсинаптичні струми (ПСС)

реєструвалися в “наосліп” вибраних клітинах у відповідь на електричну стимуляцію stratum opticum, оптичного пласту SC, який складається в основному з аксонів зорового тракту. Однак у зв'язку з необхідністю отримати детальніші дані щодо функціональних характеристик специфічних синаптичних контактів між ГКС і нейронами SC виникло питання розробки зручнішого об'єкту досліджень. У цій роботі ми використовували кокультуру дисоційованих клітин сітківки та нейронів SC, як адекватну *in vitro* модель для вивчення синаптичної передачі сигналів зорового тракту в підкірковий зоровий центр [1]. Клітини вищезгаданих популяцій були просторово розділені завдяки їх вихідному розміщенню в суміжних компартментах культуральної камери. В процесі кокультування аксоны ГКС вільно утворювали синаптичні контакти з нейронами SC долаючи межу

© Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С.Веселовський

розподілу. В такій системі значно полегшується ідентифікація клітин та стає можливим простежування проєкції ГКС на нейрони SC.

Метою нашої роботи було охарактеризувати особливості квантового вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах кокультурованих ГКС і нейронів SC.

МЕТОДИКА

Приготування кокультури та розчини. Кокультування дисоційованих клітин сітківки та нейронів SC проводили згідно з розробленою нами методикою, яка була описана раніше [1]. Однодобових шурів лінії Вістар (обох статей) декапітували і виділяли та дисоціювали сітківку та верхні пласти SC (stratum griseum superficiale та stratum opticum). Суспензії нейронів обох типів, щільністю близько 10^4 клітин/см², кокультували на покривному скельці в чашці Петрі в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю ($5 \pm 0,5$ % CO₂) при температурі $37 \pm 0,5$ °C та вологості не менше ніж 80 %.

В експеримент відбирали пари синаптичних зв'язаних ГКС і нейронів SC, які візуально ідентифікували за морфологічними особливостями цих популяцій клітин. Покривне скельце з кокультурованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10 (всі реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7,4. Неможливим виявилось з використанням стандартного розчину з зовнішньоклітинною концентрацією Mg²⁺ 2 ммоль/л виявити ПСС, опосередкований активацією тільки НМДА-рецепторів при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Цей ефект пояснюється потенціалзалежним блокуванням НМДА-рецептор-каналних комплексів Mg²⁺ [10]. НМДА-рецепторопосередковані викликані та спонтанні збуджувальні ПСС реєстрували в безмагнієвому зовнішньоклітинному середовищі при -70 мВ. Мініатюрні

ПСС різної ергічності реєстрували в нейронах SC в зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л Ca²⁺, 0 ммоль/л Mg²⁺ та 1 мкмоль/л тетродотоксина, при наявності блокаторів НМДА- чи не-НМДА-ергічної нейротрансмісії D_L-APV (20 мкмоль/л) або DNQX (20 мкмоль/л) відповідно.

Patch-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовленні з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин мав такий склад (ммоль/л): глюконат калію – 155, EGTA – 0,5, MgCl₂ – 1, HEPES – 20 (всі реактиви фірми “Sigma”, США), pH 7,4. Заповненні цим розчином піпетки мали опір 4–7 МОм.

В усіх експериментах концентрації іонів хлору для зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів становили 151–144 та 2 ммоль/л відповідно. За цих концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні постсинаптичні струми через канали ГАМК_A-рецепторів мали вихідний напрямок та гіперполяризували мембрану нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів – вхідний напрямок і депольаризували. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим візуально розрізняти збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми, що значно полегшувало аналіз експериментальних результатів.

Реєстрація та аналіз результатів. Відводили трансмембранні струми та потенціали у парах ГКС і нейронів SC методом patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації напруги/струму одночасно на прета постсинаптичній клітині. Пресинаптичну клітину – ГКС – утримували в режимі фіксації струму. ПД викликали депольаризувальними поштовхами струму тривалістю 5 мс, амплітудою 100–300 пА з частотою 0,5 Гц. Постсинаптичний нейрон SC утримували в режимі фіксації потенціалу на рівні -70 мВ та реєстрували викликані ПСС у відповідь на кожний пресинаптичний ПД. Метод парного patch-clamp дає змогу одночасно контролювати виникнення ПД на сомі ГКС і реєструвати

ПСС на сомі нейрона SC. Контроль якості фіксації потенціалу протягом експерименту здійснювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витoku ($I_{\text{вит}}$) та сталої часу ємнісного струму ($\tau_{\text{емн}}$) у відповідь на короткий (10 мс) гіперполяризувальний прямокутний стимул невеликої амплітуди (-10 мВ). Отримані результати аналізували лише в тому разі, якщо варіації значень $\tau_{\text{емн}}$ та $I_{\text{вит}}$ не перевищували 20 %. Експерименти проводили при 19–24 °С.

Викликані ПСС мали синаптичну затримку в діапазоні 2,1–5,1 мс. Такі значення синаптичної затримки та температурний режим протягом експерименту дали змогу визначити викликані ПСС як моносинаптичні [7, 14]. Автоматичний пошук спонтанних і мініатюрних ПСС, вимірювання амплітуди, часу наростання та постійної часу спаду моноекспоненційної апроксимації проводили за допомогою програмного пакету Clamfit 9.0 (“Axon Instruments”, США). Час наростання та постійна часу спаду струмів були розраховані в проміжку від 10 до 90 % висхідної та спадаючої частини кривої струму відповідно. Гістограми розподілів та їх апроксимацію будували за допомогою автоматичних функцій програмного пакету Origin 8.5 Pro (“OriginLab Corporation”, США).

Квантовий аналіз ПСС. Основними параметрами базової квантової теорії вивільнення нейромедіатора [6, 9, 13] є: q – значення ПСС, що еквівалентне одиничній квантовій події (вивільненню одного кванта медіатора); m – середній квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняються у відповідь на поодинокий пресинаптичний імпульс). Ми застосували два незалежних методи базового квантового аналізу: метод “мініатюр” і гістограмний [17]. Перший метод, який часто називають “прямим”, базується на припущенні про те, що амплітуда мініатюрного спонтанного ПСС ідентична постсинаптичній відповіді на одиничну квантову подію: $A_{\text{мін}} \equiv q$. Середній квантовий вміст розраховується за формулою: $m = \frac{I_{\text{сеп}}}{q}$,

де $I_{\text{сеп}}$ – середня амплітуда викликаних ПСС. Гістограмний метод базується на припущенні про те, що амплітуда ПСС квантована, тобто пропорційна кількості квантів вивільненого нейромедіатора. За умов суттєвої кількості реєстрацій, гістограми амплітудного розподілу мають полімодальний вид з чітко вираженими рівновіддаленими піками. Середній інтервал між ними приймали тотожним постсинаптичній відповіді на одиничну квантову подію. У синапсах ЦНС імовірність вивільнення медіатора досить висока, тому для адекватного квантового аналізу ми використовували просту біноміальну статистику. Ймовірність спостереження певної кількості квантовий одиниць (x) в одній реєстрації ПСС є постійною:

$$P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{n-x},$$

де n – загальна кількість квантів, що можуть вивільнитися на пресинаптичній ПД, p – ймовірність вивільнення окремих квантів. Згідно з простою біноміальною моделлю середній квантовий вміст розраховується за формулою: $m = n \cdot p$.

Критерієм придатності біноміальної статистики для аналізу експериментальних результатів є відповідність значень квантового вмісту, розрахованих за допомогою першого та другого методів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було досліджено 33 синаптичнозв'язані пари ГКС і нейронів SC в інтервалі від 10 до 28 діб кокультування. Збуджувальна синаптична передача була опосередкована пресинаптичним вивільненням глутамату з наступною активацією тільки НМДА-рецепторів (13 пар нейронів) і неНМДА-рецепторів (14 пар нейронів) на постсинаптичній мембрані. Гальмівна синаптична передача була асоційована з пресинаптичним вивільненням ГАМК та активацією постсинаптичних ГАМК_A-рецепторів (6 пар нейронів). Кінетичні характеристики та фармакологічні власти-

вості викликаних ПСС між ГКС і нейронами SC були описані нами раніше [1]. Критерієм відбору НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-рецепторопосередкованих ПСС для подальшого квантового аналізу була ідентичність кінетичних характеристик наростання та спаду даним, наведеним у попередній публікації.

Квантові характеристики збуджувальних і гальмівних ПСС. Розподіли амплітуд НМДА-рецепторопосередкованих мініатюрних ПСС були унімодальними, добре описувалися кривою розподілу Гауса з модою в $A_{\min} = -7,6 \pm 1,8$ пА (n=4; рис. 1,а). Це значення середньої амплітуди мініатюрних ПСС відображає постсинаптичний ефект на вивільнення одного кванта глутамату. Гістограми амплітудних розподілів НМДА-рецепторопосередкованих спонтанних ПСС були полімодальними та характеризувалися наявністю 2–5 піків, кожний з яких добре апроксимувався кривою розподілу Гауса (див. рис. 1,б). Відстань

між модами відображає амплітуду реакції постсинаптичних НМДА-рецепторів на вивільнення одного кванта глутамату. В усіх отриманих розподілах відстань між модами була $-9,9 \pm 1,3$ пА (n=5). Амплітуди НМДА-рецепторопосередкованих викликаних ПСС, які були відведені від нейронів SC у відповідь на генерацію ПД у ГКС, варіювали від -14 до -70 пА. Гістограми розподілу амплітуд цих викликаних ПСС були полімодальними з чітко вираженими рівновіддаленими піками і добре апроксимувалися суперпозицією кривих розподілу Гауса відносно кожного піку (див. рис. 1,в). Кількість явних мод у полімодальних розподілах варіювалася від 2 до 5 для різних нейронів SC. Відстань між модами в середньому становила $-9,6 \pm 1,0$ пА (n=12) при -70 мВ.

Аналогічний аналіз неНМДА-рецепторопосередкованих ПСС дав такі результати: середня амплітуда мініатюрного ПСС стано-

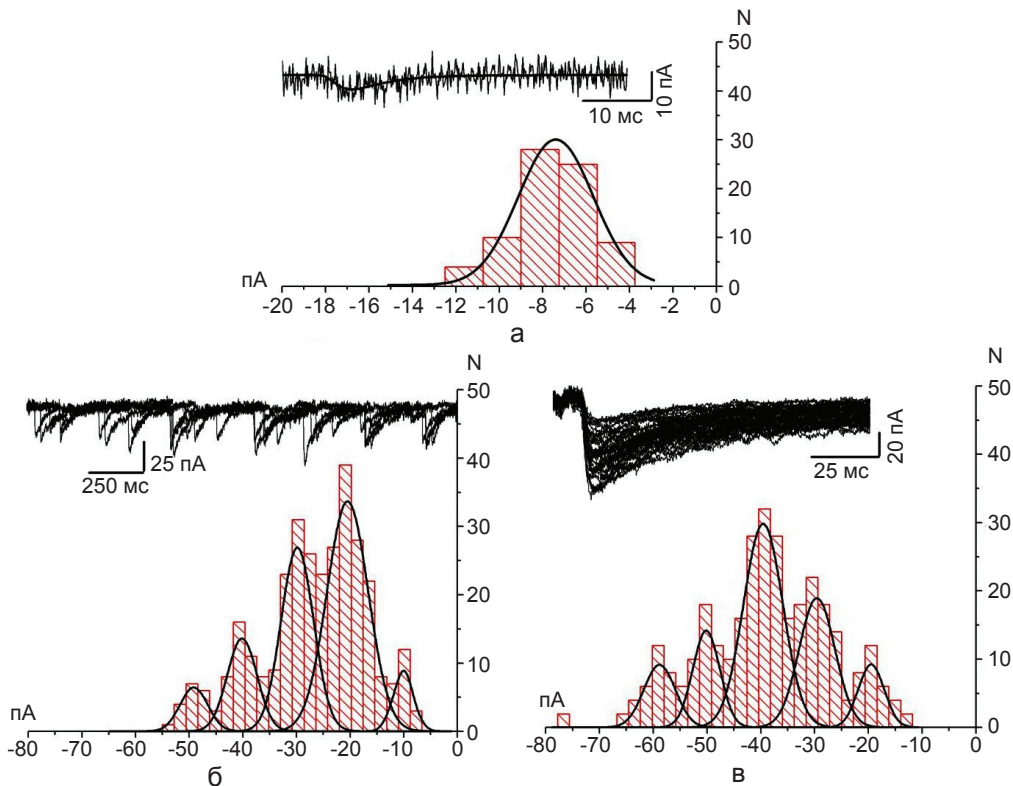


Рис. 1. Амплітудний розподіл НМДА-рецепторопосередкованих збуджувальних постсинаптичних струмів (ПСС): а, б, в – гістограми розподілу амплітуд мініатюрних, спонтанних та викликаних ПСС відповідно, які апроксимовані різною кількістю кривих розподілу Гауса. Зверху наведені записи реєстрацій відповідних струмів

вила $A_{\min} = -9,5 \pm 1,7$ пА ($n=4$; рис. 2,а), а відстань між модами в амплітудних розподілах спонтанних і викликаних ПСС була $-10,2 \pm 1,1$ пА ($n=4$) та $-10,2 \pm 1,8$ пА ($n=13$) відповідно (див. рис. 2,б,в).

Аналіз ГАМК_A-рецепторопосередкованих ПСС показав, що середня амплітуда мініатюрного ПСС становила $A_{\min} = 11,7 \pm 1,7$ пА ($n=3$; рис. 3,а), а відстань між модами в амплітудних розподілах спонтанних і викликаних ПСС була $12,0 \pm 2,4$ пА ($n=4$) та $12,0 \pm 1,7$ пА ($n=6$) відповідно (див. рис. 3,б,в).

Використовуючи Т-тест рівності (нерівності) середніх у разі нерівних дисперсій, ми виявили, що середні значення НМДА-, неНМДА-, ГАМК_A-рецепторопосередкованих ПСС на вивільнення одного кванта відповідного медіатора, розраховані за допомогою двох незалежних методів, при $P = 0,05$ достовірно не відрізнялися.

Квантовий аналіз збуджувальних і гальмівних ПСС. Значення кожної окремої кван-

тової події були описані розподілом Гауса. Кількість синаптичних подій, що відповідає вивільненню будь-якої певної кількості квантів, визначали як кількість подій у діапазоні амплітуд, охоплених описаною кривою розподілу Гауса. Зіставлення експериментально визначених кількостей синаптичних подій з величинами, отриманими при описанні результатів (див. рис. 1,в, 2,в, 3,в) простим біноміальним законом представлено на рис 4,а,І; а,ІІ; а,ІІІ відповідно. Слід звернути увагу на те, що в умовах пресинаптичної генерації ПД не спостерігалось вивільнення одного кванта нейромедіатора. Таким чином, можна припустити, що амплітуда викликаних ПСС у збуджувальних і гальмівних синапсах нейронів SC зумовлюється вивільненням, як мінімум, одночасно від 2 до 14 квантів нейромедіатора у всіх загалом активних зонах (АЗ) однієї чи декількох пресинаптичних терміналей ГКС. Результати деяких досліджень показали, що

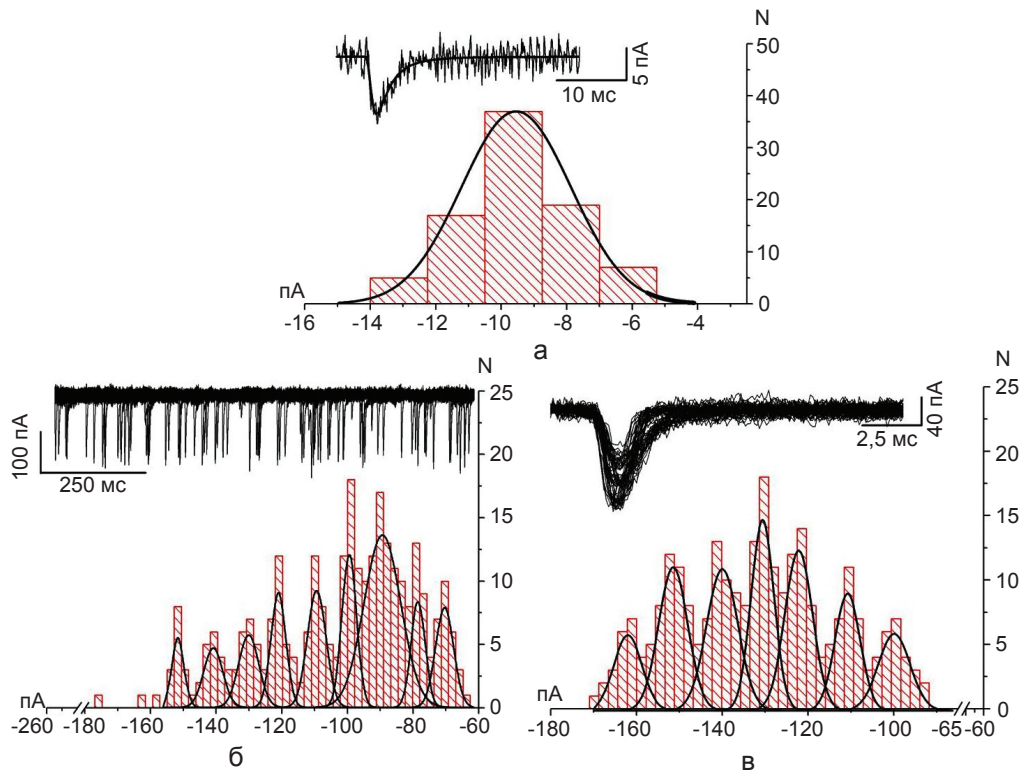


Рис. 2. Амплітудний розподіл неНМДА-рецепторопосередкованих збуджувальних постсинаптичних струмів (ПСС): а, б, в – гістограми розподілу амплітуд мініатюрних, спонтанних та викликаних ПСС відповідно, які апроксимовані різною кількістю кривих розподілу Гауса. Зверху наведені записи реєстрацій відповідних струмів

одиначна синаптична терміналь не завжди має тільки одну АЗ в окремій терміналі [2]. Також іншими авторами була проведена статистична оцінка кількості АЗ за даними електронної мікроскопії, яка підтверджує наявність декількох сайтів вивільнення нейромедіатора в синапсах [3]. Не виключено, що в нашому випадку, могли брати участь декілька, близько розташованих, терміналей з однією АЗ у кожній чи одна терміналь з декількома. Обидва припущення підтверджуються ультраструктурними даними про наявність двох типів синаптичних терміналей між ГКС і нейронами SC [11, 18]. Терміналі першого типу або “синаптичні острівки” являють собою згрупованість великої кількості малих за розмірами синапсів і спостерігаються в верхніх пластах stratum griseum superficiale та stratum opticum SC. Терміналі другого типу характеризуються значними розмірами та наявністю декількох активних зон і спосте-

рігаються в нижніх пластах stratum griseum superficiale та stratum opticum SC.

Квантовий вміст для досліджуваних пар ГКС і нейронів SC був розрахований незалежно за допомогою методу “мініатюр” та гістограмного, які були описані вище. Графічно представлена залежність отриманих значень для НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-рецептор-опосередкованих ПСС добре апроксимувалася лінійною функцією з нахилом 45° та коефіцієнтом кореляції 0,99, 0,99 і 0,98 відповідно (див. рис. 4,б,І; б,ІІ; б,ІІІ). Висока ступінь кореляції підтверджує придатність початкового припущення про значення квантової події та біноміального закону розподілу для опису експериментальних результатів.

Таким чином, за допомогою методу парної patch-clamp-реєстрації, нами були досліджені особливості вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах кокультивованих ГКС і нейронів SC. Використовуючи незалежні методи

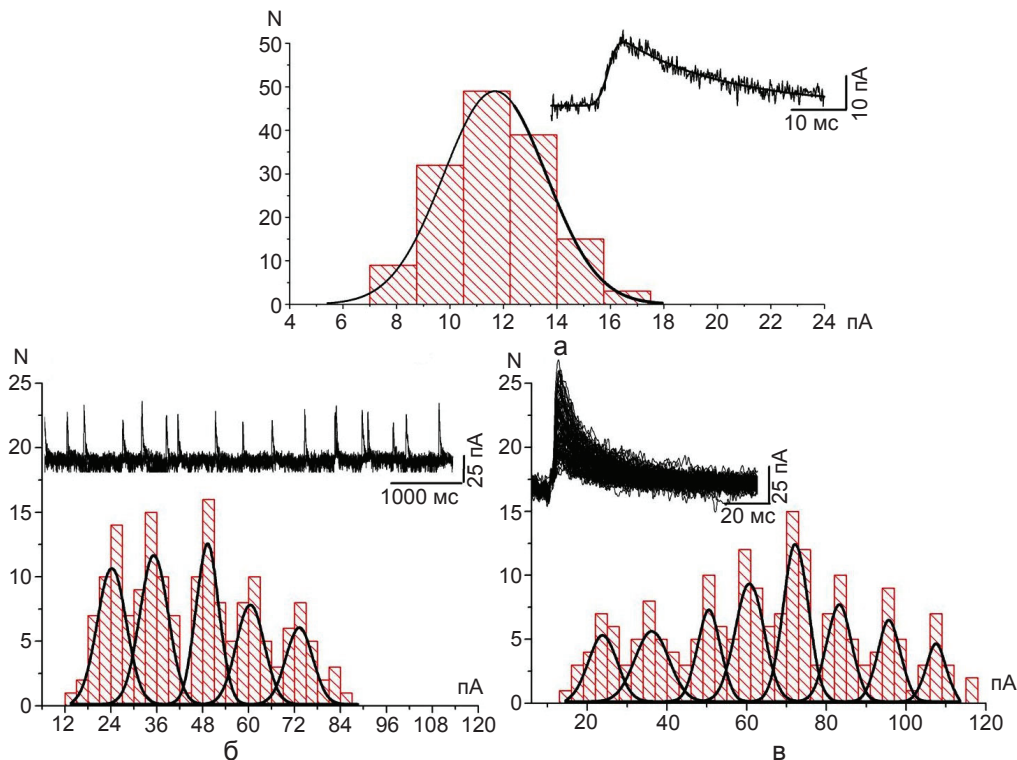


Рис. 3. Амплітудний розподіл ГАМК_A-рецепторопосередкованих гальмівних постсинаптичних струмів (ПСС): а, б, в – гістограми розподілу амплітуд ПСС мініатюрних, спонтанних та викликаних ПСС відповідно, які апроксимовані різною кількістю кривих розподілу Гауса. Зверху наведені записи реєстрацій відповідних струмів

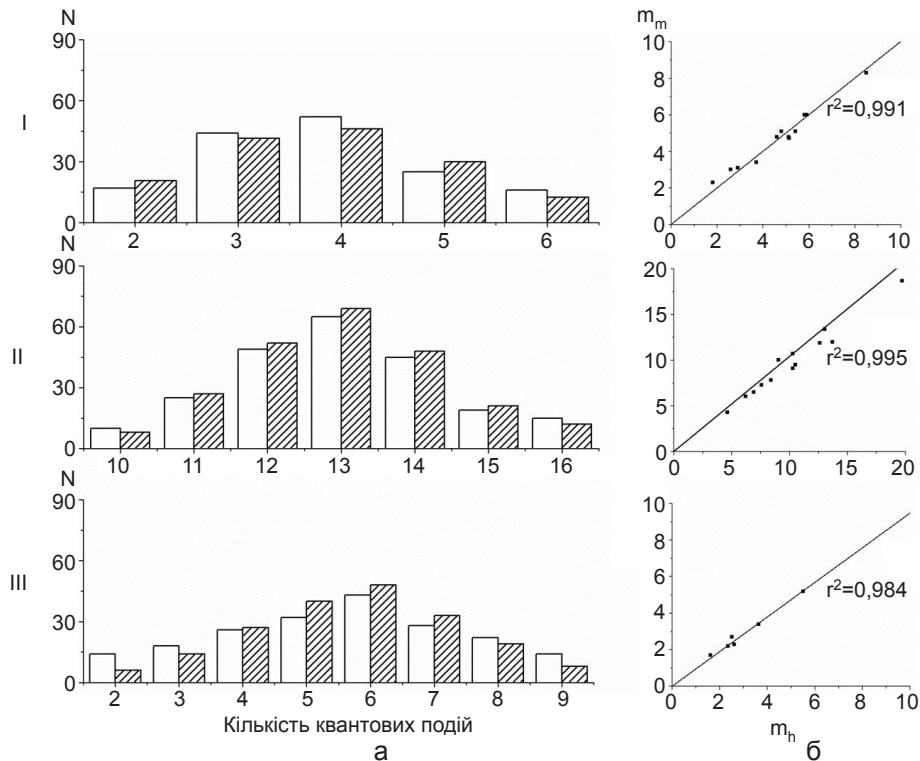


Рис. 4. Застосування простої біноміальної статистики для описання та перевірки ймовірності вивільнення глутамату та ГАМК у синапсах кокультивованих ГКС і нейронів SC. а – розподіли кількості синаптичних подій, які відповідають вивільненню різного числа квантів: I, II, III – розподіли, побудовані на основі гістограм, представлених на рис. 1,в; 2,в; 3,в відповідно. Білі стовпчики відповідають експериментальним результатам, заштриховані – значенням, отриманим при їх описанні біноміальним розподілом. б: 1, 2, 3 – графіки лінійної кореляції, які відображають відповідність значень квантового вмісту m_m та m_h для НМДА ($n=12$), неНМДА ($n=13$) та ГАМК_A- ($n=6$) рецепторопосередкованої синаптичної передачі відповідно, де m_m – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою методу “мініатюр”, m_h – середній квантовий вміст, розрахований за допомогою гістограмного методу

базового квантового аналізу були визначені квантові параметри вивільнення медіаторів та доведено, що розподіл кількості вивільнених квантів обох медіаторів відповідає біноміальному закону. Показано, що ПСС, які виникали в нейронів SC у відповідь на генерацію ПД у сомі ГКС, були опосередковані одночасним вивільненням щонайменше 2-14 квантів глутамату та 2 квантів ГАМК, що гарантує високу надійність передачі аферентних сигналів. Припускається, що багатоквантовий характер вивільнення медіаторів може бути пов'язаний зі збудженням декількох терміналей пресинаптичного аксона з однією активною зоною або однієї терміналі з декількома. Обидва припущення підтверджуються ультраструктурними результатами про наявність двох

типів синаптичних терміналей між ГКС і нейронами SC.

**А.В. Думанская, О.В. Рихальский,
Н.С.Веселовский**

ХАРАКТЕРИСТИКИ КВАНТОВОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГЛУТАМАТА И ГАМК В СИНАПСАХ МЕЖДУ КОКУЛЬТИВИРОВАННЫМИ ГАНГЛИОЗНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕТЧАТКИ И НЕЙРОНАМИ SUPERIOR COLLICULUS

Нами были исследованы особенности квантового высвобождения глутамата и ГАМК в синапсах культивируемых ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и нейронов superior colliculus (SC) с помощью метода парной patch-clamp-регистрации. С использованием независимых методов базового квантового анализа доказано, что распределение количества высвобождаемых квантов обоих медиаторов

соответствует биномиальному закону. Показано, что постсинаптические токи (ПСТ), возникающие в нейронах SC в ответ на генерацию потенциала действия в соме ГКС были опосредованы одновременным выбросом как минимум от 2 до 14 квантов глутамата и 2 квантов ГАМК, что гарантирует высокую надежность передачи афферентных сигналов. Предполагается, что многоквантовый характер высвобождения медиаторов может быть связан с одновременным возбуждением нескольких терминалей пресинаптического аксона с одной активной зоной или одной терминали с несколькими.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, нейроны superior colliculus, синаптическая передача, простое биномиальное распределение, квантовый анализ.

G. V. Dumanska, O. V. Rikhalsky, N. S. Veselovsky

CHARACTERISTICS OF QUANTAL RELEASE OF GLUTAMATE AND GABA IN SYNAPSES BETWEEN RETINAL GANGLION CELLS AND SUPERIOR COLLICULUS NEURONS IN COCULTURE

We investigated features of quantal release of glutamate and GABA in synapses between retinal ganglion cells (RGC) and superior colliculus (SC) neurons in coculture using dual patch-clamp technique. The main quantal characteristics of neurotransmitters release were defined on the basis of quantal analysis. Number of released quanta distributions for both neurotransmitters were corresponded to the binomial law. It was shown that evoked postsynaptic currents (PSC) in SC neurons as response to generation of action potential (AP) in RGC were mediated by simultaneous release at least from 2 to 14 quanta of glutamate and 2 quanta of GABA. Thereby high efficacy of excitatory and inhibitory signals transmission is guaranteed in retinocollicular projections. It is supposed that multiquantal character of the neurotransmitters release can be related to simultaneous involvement of several closely adjacent excited terminals, each of which possesses one active zone, or by one terminal with several.

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

REFERENCES

1. Dumanska GV, Kosheleva SO, Veselovsky MS. Chemical transmission between cocultivated retinal ganglion cells and superior colliculus neurons. *Neurophysiology* 2011;**43**(4):369-371.
2. Veselovsky NS, Fedulova SA, Kostyuk PG. Biophysics of a single synapse. Kiev: Naukova Dumka; 2004. P. 7-14.
3. Rusakov DA. Statistical estimation of the membrane area

- and numbers of active sites at presynaptic terminals. *Neurophysiology* 1990;**22**(1):29-36.
4. Chandrasekaran HR, Plas DT, Gonzales E, Crair MC. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *J. Neurosci.* 2005;**25**:6929-6938.
5. Chandrasekaran AR, Shah RD, Crair MC. Developmental homeostasis of mouse retinocollicular synapses. *J. of Neurosci.* 2007;**27**(7):1746-1755.
6. Del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol.* 1954;**124**:560-573.
7. Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J. Corelease of two fast neurotransmitters at central synapse. *Science* 1998;**281**(5375):419-424.
8. Jüttner R, Henneberger C, Grantyn R, Rothe T. Early onset of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the visual layers of the rodent superior colliculus. 2001;**19**:255-261.
9. Katz B. Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 1971;**173**:123-126.
10. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 1984;**309**:261-263.
11. Mize RR. Variations in the retinal synapses of the cat superior colliculus revealed using quantitative electron microscope autoradiography. *Brain Research.* 1983;**269**:211-221.
12. Mrcic-Flogel TD, Hofer SB, Creutzfeldt C, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, Bonhoeffer T, Hubener M. Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J. Neurosci* 2005; **25**(29):6921-6928.
13. Redman, S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol. Rev.* 1990;**70**:165-198.
14. Sabatini BL, Regehr WG. Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 1996;**384**(14):170-172.
15. Shah RD, Crair MC. Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. 2008;**28**(1):292-303.
16. Simon DK, O'Leary DD. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J. Neurosci.* 1992;**12**:1212-1232.
17. Voronin LL. Quantal analysis of thippocampal long-term potentiation. *Rev. Neurosci.* 1994;**5**:141-170.
18. Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J. of Neurocytol.* 1991;**20**:940-952.
19. Zhao J-P, Phillis MA, Constantine-Paton M. Long-term potentiation in the juvenile superior colliculus requires simultaneous activation of NMDA receptors and L-type Ca²⁺ channels and reflects addition of newly functional synapses. 2006;**26**(49):12647-12655.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
*E-mail: Doomanya@mail.ru**

Матеріал надійшов до редакції 19.08.2013

Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.І. Полякова, П.В. Сініцин, А.А. Лимарєва,
О.Б. Щербаков, М.Я. Співак, О.Г. Резніков

Морфофункціональний стан репродуктивної системи щурів у період старіння за умов застосування наноцерію

Досліджено вплив 1 або 100 мг/кг нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на морфофункціональний стан органів репродуктивної системи у старіючих самців щурів. Встановлено стимулювальний вплив низької дози НДЦ (1 мг/кг) на гормональну функцію сім'яників і сперматогенез. Показано, що в основі цієї дії НДЦ лежить активація гормонпродукуючих клітин Лейдига сім'яників, а також секреторних і проліферативних процесів у передміхуровій залозі старіючих самців щурів. Застосування НДЦ у дозі 100 мг/кг не спричиняло суттєвого впливу на досліджувані показники морфофункціонального стану репродуктивної системи.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, сім'яники, передміхурова залоза, самці щурів, старіння.

ВСТУП

Нанотехнології відкрили нові і перспективні напрями в сучасній біології та медицині. Базову позицію в них займають нанокристалічні матеріали, до яких відносяться і наноматеріали на основі діоксиду церію (НДЦ). Нині накопичений значний експериментальний матеріал, який свідчить про високу біологічну активність НДЦ і розкриває потенційну можливість його використання для розробки і застосування нанокомпозицій, здатних активувати системи клітинного та гуморального імунного захисту, профілактики і терапії вірусних захворювань, а також для підвищення ефективності лікування злоякісних новоутворень [2, 4, 5]. Показано, що НДЦ має високу антиоксидантну активність, він здійснює нейротрофічну і нейропротекторну дію, підвищує життєздатність клітин головного мозку (астроцити, нейрони, мікрогліальні клітини та олігодендроцити), збільшує тривалість життя мікро- та макроорганізмів [1, 6–9, 11, 12]. Разом з тим свідчення про дію

НДЦ на репродуктивні процеси в період старіння вкрай обмежені. Є повідомлення про його вплив на мейотичне дозрівання ооцитів і фолікулогенез в яєчниках старіючих мишей [13]. У наших попередніх дослідженнях було показано, що введення НДЦ спричиняє деякі зміни функціональної активності репродуктивної системи у старіючих самців щурів [3]. Останні залежать від морфофункціонального стану органів статеві системи, проте такі відомості стосовно НДЦ відсутні. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчити гормональну функцію та проаналізувати особливості морфологічної будови органів статеві системи у старіючих самців щурів за умов застосування високих і низьких доз НДЦ.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 29 щурах Вістар віком 18 міс, масою тіла 380–440 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні та раціоні. Роботу виконано з дотриманням вимог Європейської

© Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.І. Полякова, П.В. Сініцин, А.А. Лимарєва, О.Б. Щербаков, М.Я. Співак, О.Г. Резніков

конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей.

Цитратний золь НДЦ, що містив частинки CeO_2 розміром 2–3 нм, отримували як описано раніше [3]. Золь різної концентрації (1 або 100 ммоль/л) вводили в дозі 1 або 100 мг/кг самцям щурів (по 6 тварин у кожній групі) через металевий зонд у шлунок щодобово впродовж 10 діб. Щурів швидко декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год після останнього введення препарату. Контрольні тварини отримували розчинник препарату ($n=7$).

Для морфологічних досліджень відбирали зразки тканин сім'яників і передміхурової залози, які фіксували в рідині Буена. Зрізи завтовшки 5–6 мкм фарбували гематоксиліном Бемера та еозином. Гістологічні препарати вивчали на світлооптичному мікроскопі Leika DME.

У змивах епідидимісів визначали кількість сперматозоїдів і аналізували їх морфологічну будову. Для оцінки запліднювальної здатності частину старіючих самців контрольної та дослідної груп (по 5 тварин у кожній групі) парували з молодими самицями статевозрілого віку у співвідношенні 1:2. У потомства вивчали показники соматичного розвитку та статевого дозрівання.

Вміст тестостерону в плазмі крові визначали радіоімунологічним методом з використанням набору реагентів "RIA Testosterone direct" ("Immunotech", Франція). Вірогідність різниці розраховували за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що процес старіння організму супроводжується інволюційними змінами органів статевої системи і зниженням їх гормональної активності. З цим узгоджуються результати наших досліджень. Показано, що у старіючих самців щурів контрольної групи вміст тестостерону в плазмі крові відповідав ві-

ковій нормі і становив $2,64 \pm 0,40$ нмоль/л, що приблизно вдвічі менше, ніж у молодих статевозрілих тварин (діапазон коливання вмісту гормону від 5 до 6 нмоль/л). Після 10-добового перорального застосування НДЦ у дозі 1 мг/кг вміст тестостерону в плазмі крові вірогідно підвищувався ($P<0,05$), проте за умов введення більш високої дози НДЦ (100 мг/кг) – суттєво не змінювався порівняно з контролем (рис. 1).

Одним із інформативних показників для морфологічної оцінки гормональної функції репродуктивної системи є активність гормонпродукуючих клітин Лейдига сім'яників. Проведені гістологічні дослідження показали, що морфологічна будова сім'яників старіючих самців контрольної групи відповідала загальній картині їх вікових змін (рис. 2, а). Кількість активованих клітин Лейдига значно зменшувалася, що свідчить про зниження секреторної активності сім'яників. Більшість клітин Лейдига мала середнього об'єму цитоплазму, нерідко густу. Вакуолізованою вона була лише в частині клітин. Ядра клітин Лейдига були овальної форми, дещо гіперхромні.

При введенні низької дози НДЦ (1 мг/кг) характерною була наявність певних змін,

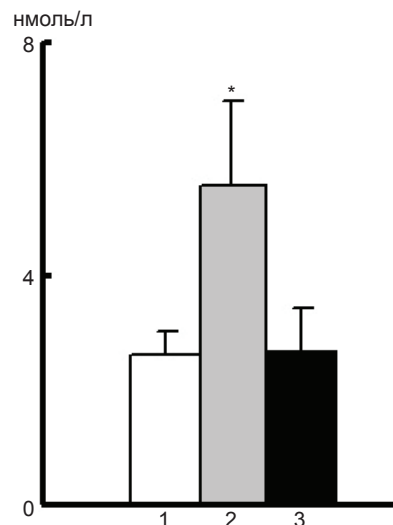
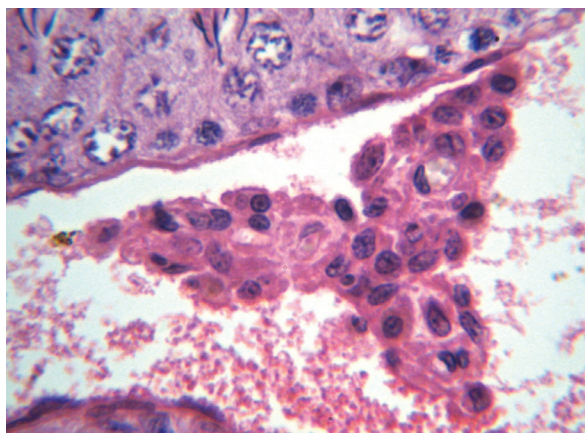
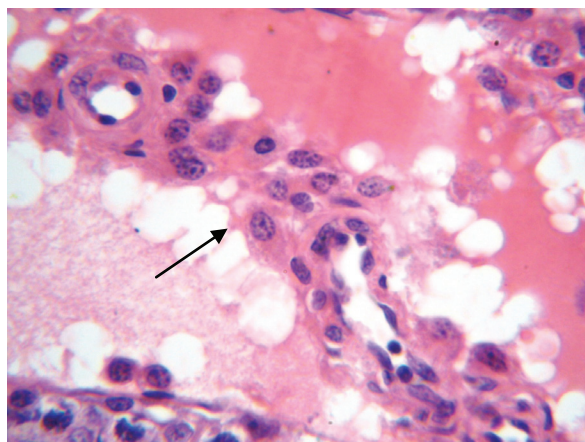


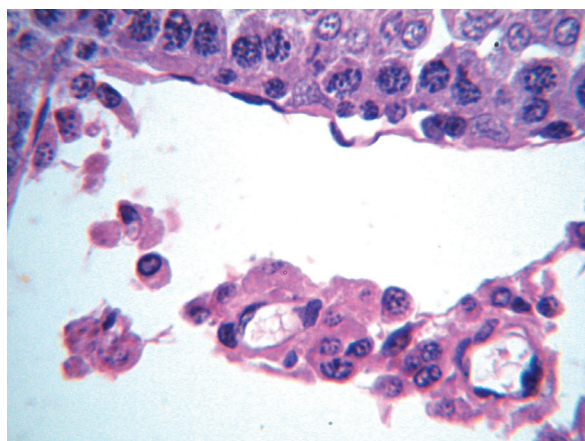
Рис. 1. Вміст тестостерону в плазмі крові старіючих самців: 1 – контроль, 2, 3 – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. * $P<0,05$ порівняно з контролем



а



б



в

Рис. 2. Мікрофотографії острівців клітин Лейдига в інтерстиціальному просторі сім'яників старіючих шурів: а – контроль; б, в – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. Стрілка – клітина Лейдига з масивною цитоплазмою в острівці. Фарбування гематоксилін-еозин. Об. $\times 40$

а саме збільшення кількості активованих гормонпродукуючих клітин Лейдига (див. рис. 2,б). Цілком імовірно, що це є найбільш вірогідною причиною підвищення гормональної активності сім'яників і, як результат, зростання вмісту тестостерону в плазмі крові (див. рис. 1). Про активацію клітин Лейдига свідчить наявність більших за об'ємом нормохромних ядер з чітким ядрцем. Цитоплазма їх також мала більший об'єм, часто була вакуолізованою по периферії.

Слід зазначити, що у разі дії НДЦ в дозі 100 мг/кг, активованих клітин Лейдига було значно менше, а їх дегенеративні зміни більш виражені, ніж у тварин, що отримували низьку дозу НДЦ (див. рис. 2, в). У цілому за умов введення високої дози НДЦ спостерігалися такі самі вікові зміни клітин Лейдига, як і в контролі.

Беручи до уваги тісний функціональний зв'язок між сім'яниками і передміхуровою залозою, ми визнали доцільним дослідити гістологічну будову останньої. У шурів контрольної групи стан вентральної частки передміхурової залози можна охарактеризувати як гіпофункціональний, що відповідає віковій нормі (рис. 3, а, б). У багатьох центрально розташованих ацинусах, які мали підвищено звивисту форму, епітелій був плаский, атрофічний. Частина прошарків сполучної тканини між ацинусами була розширена, мала ознаки набряку строми. В них знаходили активовані тканинні базофіли, лейкоцити та гістіоцитарні клітини.

Під впливом НДЦ у дозі 1 мг/кг у передміхуровій залозі старіючих шурів спостерігалась активація секреторних і проліферативних процесів. Про це свідчить різке зростання базофільної зернистості цитоплазми у перинуклеарній та апікальній частинах епітеліальних клітин і збільшення кількості рибосом і полісом, а також наявність у шарі епітелію клітин на різних стадіях мітотичного поділу (див. рис. 3, в, г). Це цілком узгоджується з даними про вірогідне збільшення відносної маси передміхурової залози (135,6

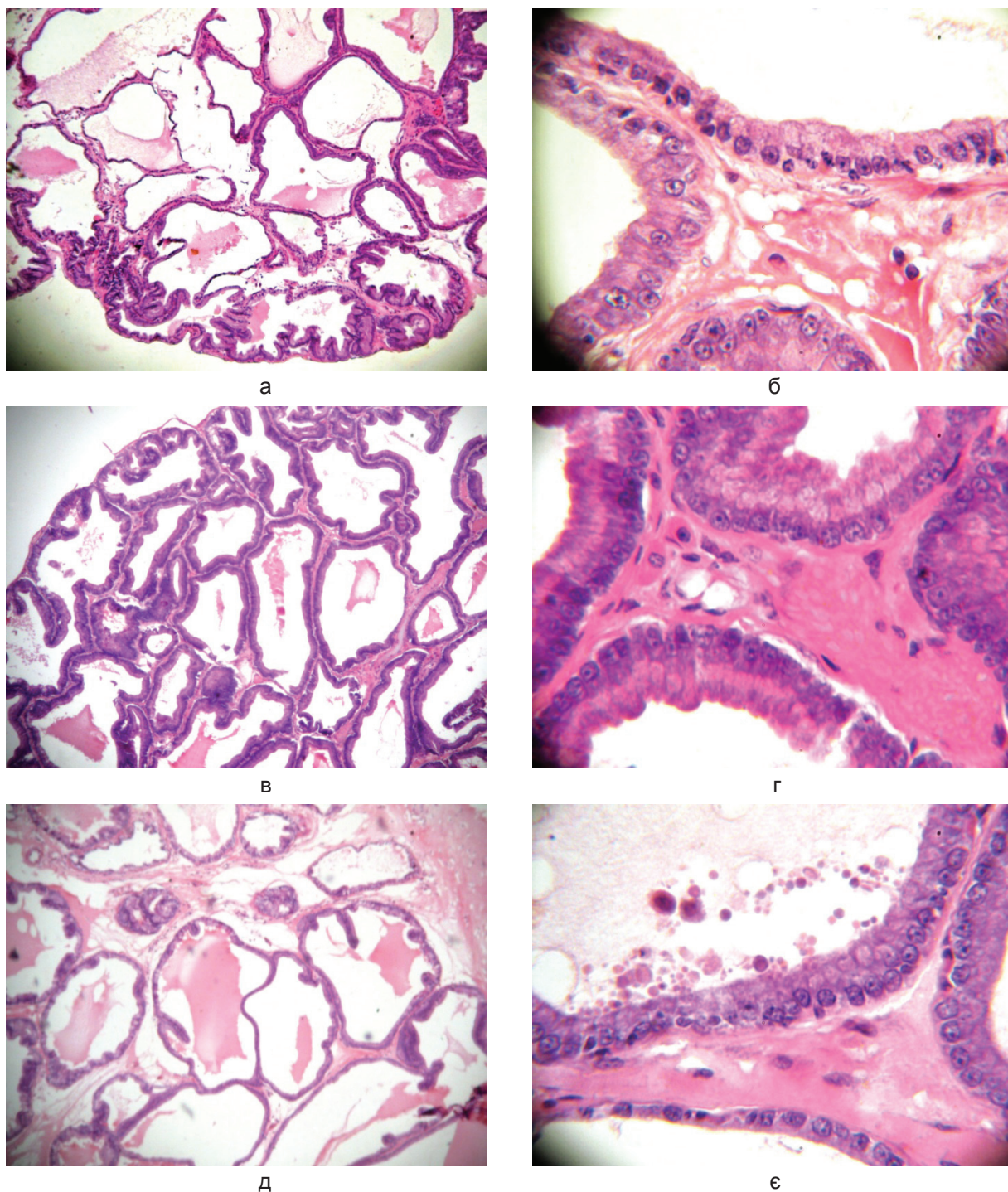


Рис. 3. Мікрофотографії тканин вентральної частки передміхурової залози старіючих шурів: а – контроль (загальний вигляд), б – контроль (гіперхромні ядра в частині епітеліальних клітин та набряк стромы); в – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (загальний вигляд), г – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (високий циліндричний епітелій з великою кількістю базofilної зернистості у перинуклеарній ділянці); д – нанокристалічний діоксид церію в дозі 100 мг/кг (загальний вигляд), е – нанокристалічний діоксид церію в дозі 100 мг/кг (плаский і низький циліндричний епітелій в ацинусах та утворення простатичних конкрементів). Фарбування гематоксилін-еозин. а, в, д – Об. $\times 4$; б, г, е – Об. $\times 40$

$\pm 6,0$ мг/100 г) відносно контролю ($107,2 \pm 10,6$ мг/100 г; $P < 0,05$).

У разі введення високої дози НДЦ зміни у будові передміхурової залози були менш виражені, ніж у дослідних тварин, які отримували низьку дозу. Проте й мали свої особливості, які характеризувались активацією як секреторних, так і атрофічних процесів у епітелії та стромі органа (див. рис. 3, д,є). Це може свідчити як про меншу ефективність застосованої дози препарату, так і про пригнічення функціональної активності передміхурової залози після короткого етапу її активації. В частині залоз епітелій був високий циліндричний, проте його висота, кількість папілярних виростів і їх розміри були менші, ніж у дослідних тварин, що отримували НДЦ в дозі 1 мг/кг. У багатьох ацинусах епітелій був плаский, атрофічний. Зрідка знаходили клітини на різних етапах мітотичного поділу, частина мітозів були патологічними. Частіше виявляли простатичні конкременти в ацинусах та спостерігали їх утворення внаслідок відщеплення фрагментів цитоплазми та десквамації епітеліальних клітин. Набряк стромі та активація тканинних базофілів були виражені сильніше, ніж у контрольних і дослідних тварин за умов введення низької дози НДЦ.

При дослідженні сперматогенної функції сім'яників слід відмітити, що кількість сперматозоїдів у змивах епідидимісів після 10-добового застосування НДЦ у дозі 1 мг/кг вірогідно збільшувалася ($P < 0,05$), а в дозі 100 мг/кг мала тенденцію до підвищення у порівнянні з контролем (рис. 4).

Варто зазначити, що у тварин контрольної групи переважна частина сперматозоїдів (93,9 %) мали нормальну будову, тоді як у дослідних тварин таких було дещо менше (в середньому 87,4 %). Основна частина порушень будови сперматозоїдів у старіючих самців після застосування НДЦ, торкалася підвищеної "м'якості" їх хвостового відділу, що характерно для незрілих сперматозоїдів і може призводити до зниження їх рухливості та порушення процесу запліднення. Поява

незрілих сперматозоїдів у дослідних тварин, цілком імовірно, може бути пов'язана з посиленням гормональної стимуляції сперматогенезу, що призводить до прискорення їх виходу з сім'яника в епідидиміс [10].

Дослідження запліднювальної здатності показало, що при паруванні старіючих самців, які отримували НДЦ у дозі 1 мг/кг, з інтактними самицями статевозрілого віку, при досить високому рівні осіменіння, індекс вагітності був майже удвічі менший, ніж у контролі (таблиця). Можна припустити, що послаблення запліднювальної здатності старіючих самців дослідної групи зумовлено наявністю незрілих сперматозоїдів.

Слід зазначити, що в разі наявності вагітності у самиць дослідної групи тривалість її була в межах норми і становила 22 доби. Щуренята народжувалися живими, смертність їх у перші 2 тиж була відсутня. Зовнішній огляд не виявив відхилень у соматичному їх розвитку. Цікаво відмітити той факт, що середня кількість щуренят у приплоді в розрахунку на одну самицю була удвічі більшою порівняно з контрольною групою, при цьому серед потомків старіючих самців як контрольної, так і дослідної груп превалювали самці (див. таблицю). Причини

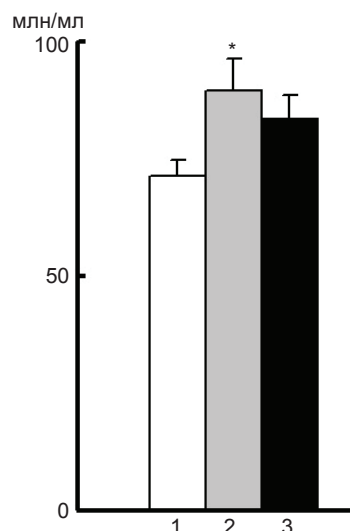


Рис. 4. Вміст сперматозоїдів у епідидимісі старіючих самців: 1 – контроль, 2, 3 – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Показники фертильності та плодючості статевозрілих самиць щурів, парованих з контрольними та дослідними старіючими самцями, що отримували нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (n = 8)

| Група тварин | Кількість запліднених самиць (індекс осіменіння, %) | Кількість вагітних самиць (індекс вагітності, %) | Загальна кількість народжених щуренят | Середня кількість щуренят в одному приплоді | Співвідношення самиць до самців у приплоді |
|--------------|---|--|---------------------------------------|---|--|
| Контроль | 8 (100 %) | 7 (87,5 %) | 38 | 5 | 1,9:1 |
| Дослід | 7 (87,5 %) | 3 (43 %) | 30 | 10 | 1,3:1 |

цього явища потребують спеціального вивчення. Подальші спостереження показали, що у потомків старіючих самців дослідної групи основні параметри статевого розвитку – опускання сім'яників у самців ($34,4 \pm 1,6$ діб) та відкриття піхви у самиць ($43,9 \pm 0,3$ діб) – не відрізнялися від контрольних значень ($35,8 \pm 0,7$ та $42,8 \pm 0,3$ діб відповідно).

Таким чином, отримані результати свідчать про стимулювальний вплив низької дози НДЦ (1 мг/кг) на гормональну функцію та сперматогенез сім'яників старіючих самців щурів. Є підстави вважати, що в основі цієї дії НДЦ лежить активація гормонпродуруючих клітин Лейдига сім'яників, а також секреторних і проліферативних процесів у передміхуровій залозі. Цілком імовірно, що зазначені зміни можуть говорити про певне напруження структурно-функціональних резервів репродуктивної системи старіючих самців під впливом НДЦ і насамперед пов'язані зі стимуляцією біосинтетичних процесів. Проте механізм цього феномену потребує подальшого вивчення.

Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.І. Полякова, П.В. Синицын, А.А. Лимарева, А.Б. Щербак, Н.Я. Спивак, А.Г. Резников

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В ПЕРИОД СТАРЕНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НАНОЦЕРИЯ

Исследовано влияние нанокристаллического диоксида церия (НДЦ, 1 и 100 мг/кг, перорально, ежедневно в течение 10 сут) на морфофункциональное состояние органов половой системы у стареющих самцов крыс. Установлено стимулирующее действие низкой дозы НДЦ (1 мг/кг) на гормональную функцию семенников и сперматогенез.

Показано, что в основе этого действия НДЦ лежит активация гормонпродуцирующих клеток Лейдига семенников, а также секреторных и пролиферативных процессов в предстательной железе стареющих самцов крыс. Введение НДЦ в дозе 100 мг/кг не оказало существенного влияния на исследуемые показатели морфофункционального состояния репродуктивной системы.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, семенники, предстательная железа, самцы крыс, старение.

N.D. Nosenko, N.M. Zholobak, L.I. Polyakova, P.V. Sinitsyn, A.A. Limareva, A.B. Sherbakov, N.Ya. Spivak, A.G. Reznikov

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF REPRODUCTIVE SYSTEM OF AGEING MALE RATS IN CASE OF USE OF NANOCERIUM

The influence of nanocrystalline cerium dioxide (NCD, 1 and 100 mg/kg per os daily for 10 days) on morphofunctional state of reproductive system was investigated in ageing male rats. It has been established that activation of hormone-producing testicular leydig's cells, as well as of secretory and proliferative processes in prostate, underlies the stimulating effect of NCD at a dose 1 mg/kg on hormonal function of testis and spermatogenesis of ageing male rats. NCD used at a dose 100 mg/kg had no significant effect on the assessed indices of morphofunctional state of reproductive system.

Key words: nanocrystalline cerium dioxide, testes, prostate, male rats, ageing.

State Institution "V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv;

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Ivanov VK, Shcherbakov AB, Usatenko AV. [Structure-sensitive properties and biomedical applications of nano-dispersed cerium dioxide]. *Chem Rev.* 2009;**78**(9): 924-41.
2. Zholobak NM, Olevinsky ZM, Spivak NYa, Shcherbakov AB, Ivanov VK, Usatenko AV. [Antiviral effect of cerium dioxide nanoparticles stabilized by low-molecular polyacrylic acid]. *Microbiol Z.* 2010;**72**(3): 42-7.

3. Spivak NYa, Nosenko ND, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Reznikov AG, Ivanova OS, Ivanov VK, Tretyakov YuD. [The nanocrystalline cerium dioxide raises the functional activity on genesial system of ageing males of rats]. *Nanosystems phys chem mathematics*. 2013;**4**(1):72-7.
4. Shcherbakov AB, Ivanov VK, Zholobak NM, Krysanov EYu, Baranchikov AE, Spivak NYa, Tretyakov YuD. [Nanocrystalline ceria based materials – perspectives for biomedical application]. *Biophys*. 2011;**56**(6):995-1015.
5. Shcherbakov AB, Zholobak NM, Ivanov VK, Tretyakov YuD, Spivak NYa. [Nanomaterials based on the nanocrystalline ceria: properties and use perspectives in biology and medicine]. *Biotechnology*. 2011;**4**(1): 9-28.
6. Chigurupati C, Mughal MR, Okun E, Das S, Kumar A, McCaffery M, Seal S, Mattson MP. [Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing]. *Biomaterial*. 2013;**34**(9):2194-201.
7. Cimini A, D'Angelo B, Das S, Gentile R, Benedetti E, Singh V, Monaco AM, Santucci S, Seal S. [Antibody-conjugated PEGylated cerium oxide nanoparticles for specific targeting of A β aggregates modulate neuronal survival pathways]. *Acta Biomater*. 2012;**8**(6):2056-67.
8. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, Ludington JS, Chatani P, Mosenthal WP, Leiter JC, Andreescu S, Erlichman JS. [Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia]. *Free Radic Biol Med*. 2011;**51**(6):1155-63.
9. Hardas SS, Butterfield DA, Sultana R, Tseng MT, Dan M, Florence RL, Unrine JM, Graham UM, Wu P, Grulke EA, Yokel RA. [Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria]. *Toxicol Sci*. 2010;**116**(2):562-76.
10. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. [Hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man]. *Res Progr Horm Res*. 2002;**57**:149-79.
11. Rzigalinski B. [Nanoparticles and cell longevity]. *Technol Cancer Res Treat*. 2005;**4**(6):651-9.
12. Singh N, Cohen CA, Rzigalinski BA. [Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine]. *Ann NY Acad Sci*. 2007;**1122**:219-30.
13. Spivak NYa, Shepel EA, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Antonovich GV, Yanchiy RI, Ivanov VK, Tretyakov YuD. [Ceria nanoparticle boost activity of aged murine oocytes]. *Nano Biomed Eng*. 2012;**4**(4):188-94.

*ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
Ін-т мікробіології та вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ
E-mail:reprod@i.com.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 09.07.2013*

О.С. Панасюк, А.М. Шиш, О.О.Мойбенко

Вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця

Досліджували вплив ω -3 поліненасичених жирних кислот (ω -3 ПНЖК – препарат «Енадол» 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж) на функціонування мітохондрій міокарда щурів при ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда (ізопротеренол у дозі 60 мг/кг вводили двічі підшкірно через добу). Показано, що ізопротереноліндуковане ураження міокарда призводить до порушення дихання ізольованих мітохондрій за умов окиснення сукцинату. Встановлено, що застосування ω -3 ПНЖК вірогідно відновлює дихання мітохондрій: швидкість дихання, стимульована АДФ (V_3) зростає на 70,12 %, швидкість фосфорилування в стані відносного спокою (V_2) – на 39,87 % та дихального контролю на 45,19 % порівняно з експериментальною групою. Також виявлено їх здатність зменшувати набухання мітохондрій (на 60 %) у середовищі без додавання іонів кальцію порівняно зі щурами, яким вводили підшкірно розчин ізопротеренолу. Результати досліджень свідчать, що застосування ω -3 ПНЖК зменшує порушення функції мітохондрій серця при ізопротереноліндукованому його пошкодженні.

Ключові слова: мітохондрії, ω -3 поліненасичені жирні кислоти, ізопротеренол.

ВСТУП

Для дослідження патогенезу інфаркту міокарда (ІМ) досить широко використовується модель ізопротеренолового пошкодження, оскільки патофізіологічні зміни, які відбуваються в серці за цих умов, значною мірою відтворюють процеси, що відбуваються при відповідному захворюванні людини [15].

У механізмі ізопротеренолового пошкодження важливе значення відводиться порушенню функціонування дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів і зниженню концентрації в них макроергічних фосфорних сполук. Найбільш чутливою до пошкоджувальної дії є їх внутрішня мембрана. Залучення мітохондрій кардіоміоцитів у патологічний процес може бути частково зумовлено дією вільних радикалів, які утворюються в результаті процесів перекисного окиснення ліпідів [2, 3].

Нечисленні дослідження свідчать, що за умов ізопротереноліндукованого пошкодження знижується швидкість фосфорилування в стані 3 за Чансом і дихальний контроль [21, 23]. Також знижується активність ферментів циклу Кребса та ферментів дихального ланцюга (НАДН-дегідрогенази та цитохром-с-оксидази), зменшується здатність генерувати мембранний потенціал мітохондрій [23]. Таким чином, оптимізація мітохондріального метаболізму може відігравати значну роль у попередженні ушкодження міокарда.

Результати епідеміологічних і клінічних досліджень свідчать про те, що ω -3 ПНЖК мають бути невід'ємним компонентом лікарської терапії хворих, які перенесли інфаркт міокарда. При їх застосуванні уповільнюється розвиток атеросклерозу, зменшується імовірність розвитку інфаркту міокарда за рахунок гіполіпідемічних, антиоксидантних, антиагрегатних, протизапальних властивостей [4,

7]. Крім того, ω -3 ПНЖК мають гіпотензивну та антиаритмічну дію, знижуючи чутливість до агоністів адренорецепторів [11].

Раніше нами було показано, що ω -3 ПНЖК запобігають кальційіндукованому пошкодженню мітохондрій [1, 18]. Але можлива їхня захисна роль щодо попередження пошкодження мітохондрій (зокрема, порушення окисного фосфорилування і кальційіндукованого набухання) при ізопротереноловому пошкодженні невивчена.

Мета нашої роботи – дослідити механізми захисної дії ω -3 ПНЖК за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 24 самцях щурів масою 300–320 г, віком 5 міс. Використано 3 групи щурів: I – контрольна (n=7), II – щури (n=7), яким вводили підшкірно розчин ізопротеренолу («Sigma», США) в дозі 60 мг/кг двічі з інтервалом 24 год, III – тварини, яким давали препарат епадол у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж, а потім вводили ізопротеренол так як у II групі (n=10). Епадол містить 45 % ω -3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру).

Усіх тварин через добу після останнього введення ізопротеренолу декапітували, швидко вилучали серця, вмішували їх у льодяний 0,9%-й розчин KCl до їх зупинки. Мітохондрії виділяли з серця за методом диференційного центрифугування. Серця подрібнювали в буфері такого складу (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 20, рН 7,2, з додаванням 1 ммоль/л EGTA, 0,5 % BSA. Дихання й окиснювальне фосфорилування в мітохондріях вивчали полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка та оксиграфа («Hansatech», Велика Британія). Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 10, KH_2PO_4 – 10; рН 7,4. Як субстрат окиснення використовували 10 ммоль/л сукцинату Na. Активне дихання ізольова-

них мітохондрій ініціювали додаванням 400 мкмоль/л АДФ.

За отриманими полярограмами обчислювали показники дихання мітохондрій: стан дихання у відносному спокої (V_2), швидкість фосфорилувального (у метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (в метаболічному стані 4, V_4) дихання мітохондрій, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О [5, 6]. Концентрація білка становила 1 мг/мл, яку визначали за методом Бредфорда .

Дослідження набухання мітохондрій проводили методом спектрофотометричної реєстрації. Пошкодження мітохондрій реєстрували як циклоспорин А-чутливе набухання при дії низьких (без EGTA, тобто містить $(1-3) \cdot 10^{-5}$ моль/л вільних іонів кальцію [17]) та високих (кінцева концентрація 10^{-4} моль/л CaCl_2) концентраціях розчину CaCl_2 . Мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм протягом 10 хв. Розчин CaCl_2 додавали на 5-й хвилині інкубації. Концентрація білка становила 0,1 мг/мл.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента, значення $P < 0,05$ розглядали як достовірне.

РЕЗУЛЬТАТИ

У результаті наших досліджень виявлено, що ізопротереноліндуковане ураження міокарда призводить до інгібування функціонування мітохондрій міокарда (таблиця). Так, за умов окиснення сукцинату швидкість дихання, стимульована АДФ (V_3), в групі II знижувалася на 48,56 %, що свідчить про модуляцію роботи дихального ланцюга, оскільки в цьому стані швидкість дихання лімітується саме ним. Дихальний контроль за Чансом знизився на 34,56 % порівняно з контрольною групою, що опосередковано може говорити про процеси роз'єднання дихання та фосфорилування.

Показники дихання мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда за наявності в середовищі інкубації сукцинату в різних функціональних станах

| Показники | Контроль (I група) | Ізопротеренол (II група) | Ізопротеренол та ω -3 ПНЖК (III група) |
|-----------|--------------------|--------------------------|---|
|-----------|--------------------|--------------------------|---|

Швидкість поглинання кисню у

стані дихання,

нмоль $O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка

| | | | |
|---|--------------|-----------------|-----------------|
| відносного спокою (V_2) | 103,85±11,37 | 63±6,28* | 88,12±8,2** |
| фосфорильовального (V_3) | 228,85±19,26 | 117,71 ± 10,63* | 200,25± 26,81** |
| контрольованого (V_4) | 43,14±4,36 | 38,71± 4,47 | 38,71 ±6,98 |
| Дихальний контроль (V_3/V_4) | 5,41±0,32 | 3,54± 0,22* | 5,14 ±0,3** |
| Коефіцієнт ефективності фосфорильовання (АДФ/О) | 1,59 ± 0,04 | 1,39± 0,05* | 1,65± 0,05** |

*P<0,05 порівняно з контролем, **P<0,05 порівняно з групою II.

Відношення АДФ/О достовірно зменшилося на 14,46 %, а швидкість субстратного дихання V_2 – на 39,33 % порівняно з контролем. Швидкість дихання після фосфорильовання АДФ (в стані 4) при ізопротереноловому ураженні достовірно не змінилась.

При попередньому застосуванні ω -3 ПНЖК за умов ізопротереноліндукованого ураження міокарда виявлено відновлення показників дихання мітохондрій (група III): швидкість дихання, стимульована АДФ (V_3) зростає на 70,12 %, дихальний контроль на 45,19 %, АДФ/О на 18,7 %, швидкість фосфорильовання в стані 2 на 39,87 % порівняно з групою II (див. таблицю). Швидкість дихання в стані 4 практично залишається незмінною, як і в групі II.

Для вивчення механізмів протективного ефекту, ми дослідили вплив ω -3 ПНЖК на кальційіндуковане набухання ізольованих мітохондрій серця щурів за умов ізопротеренолового пошкодження міокарда.

Нами показано, що в умовно безкальцієвому розчині в контрольній групі послаблення світлопоглинання на 10-й хвилині становило 0,08±0,01. При ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда в безкальцієвому розчині, послаблення світлопоглинання мітохондрій було достовірно більшим на 275 % порівняно з контрольною групою

(рис.1) та становило 0,30±0,02. Це добре узгоджується з даними літератури, де відмічено, що при ізопротереноловому ураженні також спостерігається значне послаблення світлопоглинання [12]. Додавання кальцію в високих концентраціях (10^{-4} моль/л) до контрольних мітохондрій призводило до збільшення пригнічення світлопоглинання на 387 % порівняно з початковим значенням та було 0,39±0,04. За умов ізопротеренолового пошкодження реакція мітохондрій на додавання кальцію достовірно не змінювалася та становила 0,36±0,03 (див. рис. 1). Збільшення набухання в наших дослідах було чутливе до циклоспорину А як у контрольній, так і в експериментальній II групі (див. рис. 1). Результати цих дослідів дають можливість зробити припущення, що в основі ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда лежить індукція мітохондріальної пори (МП), оскільки ізопротеренол збільшував набухання, як і класичний індуктор МП $CaCl_2$, тоді як циклоспорин А його попереджав.

Нами виявлено, що застосування ω -3 ПНЖК призводить до зменшення набухання мітохондрій у середовищі без додавання іонів кальцію на 60 % порівняно з групою II (див. рис.1, 2). Відновлювалася реакція ізольованих мітохондрій на додавання кальцію – пригнічення світлопоглинання було

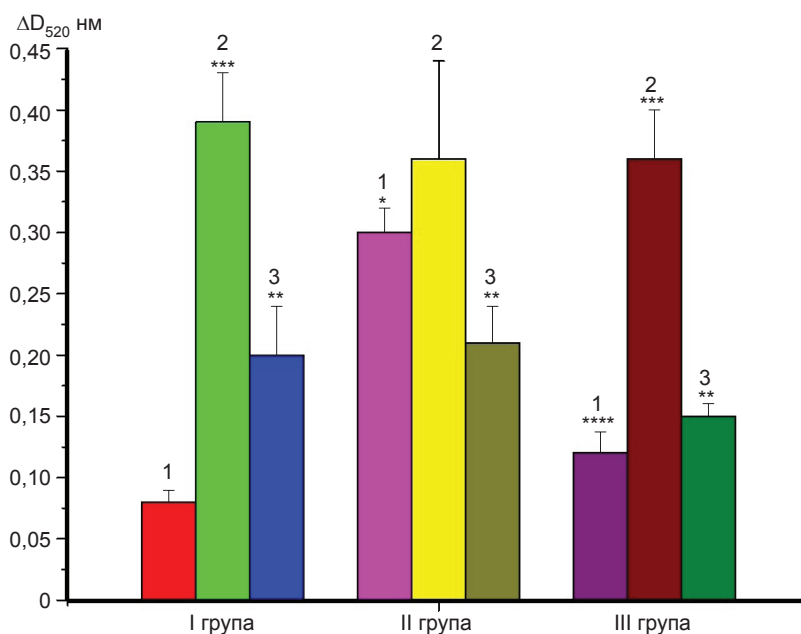


Рис. 1. Вплив ω-3 ПНЖК на зміну світлопоглинання ізольованих мітохондрій серця шурів за умов ізопротеренолового пошкодження міокарда (10-та хвилина запису): 1 – контроль (середовище інкубації з низьким вмістом кальцію); 2 – набухання мітохондрій за наявності високих концентрацій кальцію; 3 – преінкубація мітохондрій перед додаванням кальцію з циклоспорином А. I – контроль; II – шури з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда; III – з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда за впливу ω-3 ПНЖК. * P<0,05 порівняно з контрольною групою; ** – порівняно зі значенням у середовищі з кальцієм; *** – порівняно з умовно безкальцієвим середовищем; **** – порівняно з відповідним значенням II групи

більшим на 200 % порівняно з початковим значенням. Виявлено, що циклоспорин А за цих умов попереджав набухання мітохондрій після додавання кальцію.

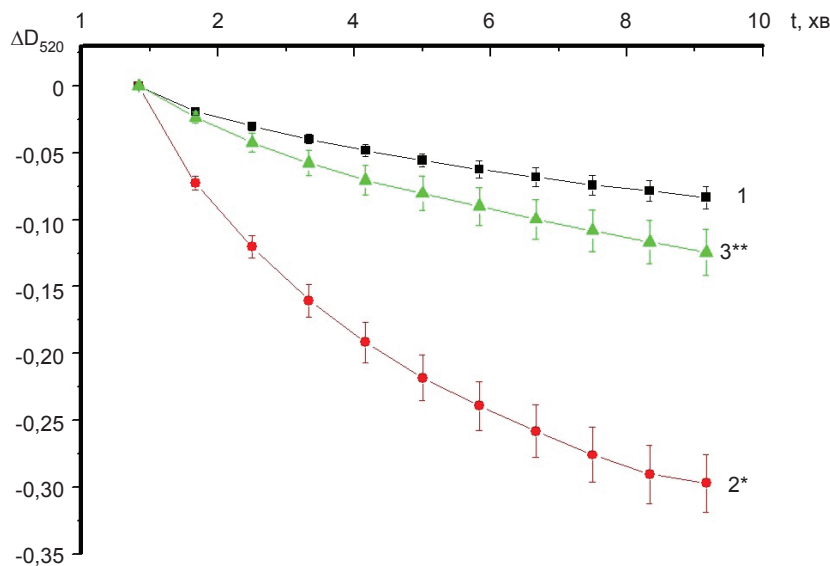


Рис. 2. Часова залежність світлопоглинання суспензії мітохондрій, виділених з сердець тварин: 1 – контроль; 2 – шури з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда; 3 – з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда за впливу ω-3 ПНЖК. *P<0,05 порівняно з контрольною групою, ** – порівняно з II групою

ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що за умов ізопротеренолового пошкодження, погіршуються показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату – знижується швидкість фосфорилування в стані 3 та дихального контролю та, можливо, індукується відкриття МП. Це загалом узгоджується з даними літератури. Було показано, що ін'єкції ізопротеренолу знижують швидкість фосфорилування в стані 3 та дихального контролю [21, 23]. Але як показано Sivakumar та співавт. [21] зміна показників дихання відмічалася при окисненні сукцинату, тоді як у праці Wang та співавт. [24] – тільки при окисненні глутамату та малату.

Новизною цієї роботи є те, що було виявлено захисний вплив ω -3 ПНЖК при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця – при реєстрації дихання встановлено, що швидкість дихання в стані 3, дихальний контроль та ефективність фосфорилування достовірно відновлювались у шурів з ізопротереноловим пошкодженням при застосуванні ω -3 ПНЖК. Підтверджено, що ін'єкції ізопротеренолу змінюють показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату; швидкість дихання в стані 4 в наших дослідках достовірно не змінилася. Також відновлювалася здатність мітохондрій реагувати на додавання іонів кальцію при реєстрації світлопоглинання суспензії у групі з додаванням ω -3 ПНЖК.

Дані літературних джерел свідчать, що порушення мітохондріального метаболізму відіграє важливу роль при серцевій недостатності [21]. Попередження відкриття МП і покращення показників дихання за умов застосування ω -3 ПНЖК запобігає пошкодженню міокарда навіть при підвищенні вмісту катехоламінів.

Відомо що дія ізопротеренолу викликає оксидативний стрес [2, 3], а застосування антиоксидантів попереджає ізопротеренолове пошкодження [24]. Водночас відомо, що вільні радикали полегшують відкриття пори при дії кальцію [16] та, можливо, самі

індукують його [9]. Тобто пошкодження ізопротеренолом може бути зумовлене саме оксидативним стресом. Хоча вважається, що ω -3 ПНЖК чутливі до перекисного окиснення ліпідів [1], споживання їх може обмежувати оксидативний стрес за допомогою посилення антиоксидантного захисту, підвищуючи вміст СОД, зокрема мітохондріальної [10], та гемоксигенази-1 [14]. Також є дані, що ω -3 ПНЖК значно знижують вміст малонового діальдегіду – маркера перекисного окиснення ліпідів [4], наприклад, у тканинах серця [7].

Серед можливих механізмів негативної дії ізопротеренолу на мітохондрії може бути також те, що катехоламіни спричиняють вивільнення вільних жирних кислот, які в свою чергу діють як роз'єднувачі окисного фосфорилування та індукують відкриття пори, знижуючи мембранний потенціал нижче від порогового рівня [8], чи прямо взаємодіючи з компонентами пори, зокрема з аденіннуклеотидтранслоказаю [25]. Водночас ω -3 ПНЖК знижують вміст ЖК [7].

Регуляція функціонування мітохондрій відбувається відповідно до енергетичних потреб клітини через сигнальні шляхи з залученням таких вторинних месенджерів, як цАМФ, кальцій тощо [20]. Показано, що ω -3 ПНЖК знижують також вміст мітохондріального кальцію [19], в той час як ізопротеренол підвищує внутрішньоклітинну його концентрацію [22]. Хоча кальцій за фізіологічних умов бере участь у регуляції мітохондріального метаболізму, зокрема, активує мітохондріальні ферменти (піруват, α -кетоглутарат та ізоцитрат дегідрогенази), високі концентрації кальцію мають негативні наслідки, зокрема, індукують відкриття МП. Наші попередні дослідження [18] та дані інших авторів вказують, що застосування ω -3 ПНЖК зменшує кальційіндуковане відкриття МП [1, 13]. Усе зазначене може свідчити, що така захисна дія ω -3 ПНЖК опосередковується, принаймні частково, через мітохондріальні механізми.

Таким чином, результати роботи поглиблюють знання про механізми порушення

функціонування серця при ізопротереноліндукованому пошкодженні та виявляють порушення дихання ізольованих мітохондрій за умов окиснення сукцинату. Показано, що застосування ω -3 ПНЖК за цих умов підвищує ефективність дихання мітохондрій та запобігає набуханню мітохондрій в серці.

Отже, ω -3 ПНЖК мають значний потенціал у попереджанні розвитку дисфункцій мітохондрій і можуть бути рекомендовані як компонент лікарської терапії хворих, які перенесли інфаркт міокарда.

О.С. Панасюк, А.М. Шиш, А.А. Мойбенко

ВЛИЯНИЕ ω -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА ПРИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЦА

Исследовали влияние ω -3 полиненасыщенных жирных кислот (ω -3 ПНЖК – препарат эпадол 0,1 мг/100 г массы тела в течении 4 нед) на функционирование митохондрий миокарда крыс при изопротеренолиндуцированном повреждении миокарда (изопротеренол в дозе 60 мг/кг вводили дважды подкожно через сутки). Показано, что изопротеренолиндуцированное повреждение миокарда ухудшает показатели дыхания изолированных митохондрий при окислении сукцината. Установлено, что использование ω -3 ПНЖК статистически значимо восстанавливает показатели дыхания митохондрий: скорость дыхания, стимулированная АДФ (V_3) возрастает на 70,12 %, скорость фосфорилирования в состоянии (V_2) – на 39,87 % и дыхательный контроль на 45,19 % в сравнении с экспериментальной группой. Также установлено их способность уменьшать набухание митохондрий (на 60 %) в среде без добавления ионов кальция. Результаты исследования свидетельствуют, что применение ω -3 ПНЖК уменьшает нарушения функции митохондрий сердца при изопротеренолиндуцированном его повреждении. Ключевые слова: митохондрии, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты, изопротеренол.

O.S. Panasiuk, A.M. Shysh, A. A. Moibenko

THE INFLUENCE OF DIETARY OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON FUNCTIONAL PARAMETERS OF MYOCARDIAL MITOCHONDRIA DURING ISOPRETERENOL-INDUCED HEART INJURY

We have studied the functional parameters of mitochondria from hearts after isopreterenol-induced injury (two subcutane-

ous injections of isopreterenol at the dose 60 mg/kg/day). We investigated the influence of dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs) administered to rats (Epadol, 0.1mg/100 gr of weight for 4 weeks) on these parameters. Isopreterenol-induced heart injury leads to a decreased parameters of respiration of isolated mitochondria in the presence of succinate. Administration of ω -3 PUFAs significantly restored the respiration rate of mitochondria: the state 3 respiration was increased by 70,12 %, the state 4 by 39,87 % and the respiratory control ratio by 45,19 % compared to the corresponding parameters of experimental group. Also, it was shown the ability of ω -3 PUFAs to decrease mitochondria swelling (by 60%) in nominally free calcium solution. The results of the study indicate that ω -3 PUFAs improve the altered functions of the heart mitochondria evoked by isopreterenol-induced injury. Key words: mitochondria, ω -3 polyunsaturated fatty acids, isopreterenol.

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

REFERENCES

1. Zhukovska A. S., Shysh A. M., Moibenko A. A. Study the impact of omega-3 PUFA on fatty acid composition of heart, breath and swelling of mitochondria of the heart in experimental diabetes. *Fiziol Zh.* 2012;**58**(2):16-26. [Article in Ukrainian]
2. Andersson D.C., Fauconnier J., Yamada T., Lacampagne A., Zhang S.J., Katz A. Westerblad Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol.* 2011 Apr 1;**589**(Pt 7):1791-801.
3. Bovo E., Lipsius S.L., Zima A.V. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca^{2+} waves during β -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol.* 2012 Jul 15;**590**(Pt 14):3291-304.
4. Bozcali E., Babalik E., Himmetoglu S., Mihmanli I., Toprak S. ω -3 fatty acid treatment in cardiac syndrome X: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical study. *Coron Artery Dis.* 2013 Jun;**24**(4):328-33.
5. Chance B., Williams Gr. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1956;**17**:65-134.
6. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 1967;**10**:41-47.
7. De Caterina R. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2011 Jun 23;**364**(25):2439-50.
8. Di Paola M., Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;**1757**(9-10):1330-7.
9. Galindo M.F., Jordán J., González-García C., Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in

- isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol.* 2003 Jun;139(4):797-804.
10. Garrel C., Alessandri J.M., Guesnet P., Al-Gubory K.H. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jan;44(1):123-31.
 11. Grynberg A., Fournier A., Sergiel J. P., Athias P. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoreceptor responsiveness and mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 Nov;27(11):2507-20.
 12. Izem-Meziane M., Djerdjouri B., Rimbaud S., Caffin F., Fortin D., Garnier A., et al. Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Feb 1;302(3):H665-74.
 13. Khairallah R.J., Kim J., O'Shea K.M., O'Connell K.A., Brown B.H., Galvao T., et al. Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids. *PLoS One.* 2012;7(3):e34402.
 14. Kusunoki C., Yang L., Yoshizaki T., Nakagawa F., Ishikado A., Kondo M., et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jan 4;430(1):225-30.
 15. Osadchii O.E. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev.* 2007 Mar;12(1):66-86.
 16. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007 May;12(5):913-22.
 17. Paltauf-Doburzynska J., Frieden M., Spitaler M., Graier W.F. Histamine-induced Ca²⁺ oscillations in a human endothelial cell line depend on transmembrane ion flux, ryanodine receptors and endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase// *J. Physiol.*- 2000.- **524.** -P.701-13. *J Physiol.* 2000 May 1;524(Pt 3):701-13.
 18. Panasiuk O., Shysh A., Bondarenko A., Moibenko O. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca²⁺-induced injury. *Exp Clin Cardiol.* 2013 Winter;18(1):e60-4.
 19. Pepe S., Tsuchiya N., Lakatta E.G., Hansford R.G. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):H149-58.
 20. Rosca M.G., Hoppel C.L. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010 Oct 1;88(1):40-50.
 21. Sivakumar R., Anandh Babu P.V., Shyamaladevi C.S. Protective effect of aspartate and glutamate on cardiac mitochondrial function during myocardial infarction in experimental rats. *Chem Biol Interact.* 2008 Nov 25;176(2-3):227-33.
 22. Takuwa Y., Takuwa N., Rasmussen H. The Effects of Isoproterenol on Intracellular Calcium Concentration. *J Biol Chem.* 1988 Jan 15;263(2):762-8.
 23. Uyemura S.A., Curti C. Respiration and mitochondrial ATPase in energized mitochondria during isoproterenol-induced cell injury of myocardium. *Int J Biochem.* 1991;23(10):1143-9.
 24. Wang S.B., Tian S., Yang F., Yang H.G., Yang X.Y., Du G.H. Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009 Aug 1;615(1-3):125-32.
 25. Wieckowski M.R., Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 1998 Feb 27;423(3):339-42.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

E-mail: dugara27@ukr.net

Матеріал надійшов

до редакції 19.08.2013

А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

Вплив Lys-форми плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів

Досліджено вплив різних форм плазміногену на стан актинового цитоскелета тромбоцитів людини. Як показник реорганізації цитоскелета тромбоцитів використовували співвідношення різних пулів актину, детекцію якого проводили методом імуноблотингу. Показано, що в інтактних тромбоцитах вміст глобулярного (G) актину й актину, що формує мембранний кортекс (MC), становить 56 і 40 % відносно вмісту філаментної (F) форми відповідно. У тромбоцитах, активованих тромбіном або колагеном, актин знаходиться майже виключно у F-формі. Інкубація неактивованих тромбоцитів з Lys-формою плазміногену викликає збільшення вмісту MC-фракції актину до 79 % відносно F-форми. Крім того, Lys-плазміноген інгібує перерозподіл пулів актину, характерний для активованих тромбоцитів. На відміну від Lys-форми, Glu-плазміноген не пригнічує агоністіндуковану агрегацію тромбоцитів і не порушує процес реорганізації їх актинового цитоскелета. Таким чином, наші результати свідчать про залучення цитоскелетних структур тромбоцитів у реалізацію антиагрегативних ефектів Lys-плазміногену.

Ключові слова: плазміноген, тромбоцити, агрегація тромбоцитів, актин, цитоскелет.

ВСТУП

Тромбоцити – без'ядерні клітинні фрагменти, основною функцією яких є формування первинного тромбу у місцях пошкодження судин. Здатність тромбоцитів синтезувати, селективно накопичувати та секретувати цілу низку регуляторних молекул, у тому числі факторів росту клітин, зумовлює їх участь в імунологічних реакціях і регенеративних процесах. Структурно-функціональні порушення тромбоцитів можуть бути причинами різних патологій (тромбоз, геморагія, запальні реакції, ангіогенез, пухлинний ріст тощо) [19]. У зв'язку з цим велике науково-практичне значення має ідентифікація чинників, що впливають на функціональний стан тромбоцитів, а також розкриття молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук на ці форменні елементи крові. Протягом останніх двох десятиріч активно досліджується участь компонентів плазміноген–плазмінової системи в регуляції функціонування різних клітин [32]. Плазміноген є неактивним попередником

серинової протеїнази плазміну – ключового ензиму фібринолітичної системи. Нативною формою плазміногену, що циркулює у плазмі, є Glu-плазміноген, який являє собою односторонній глікопротеїн з молекулярною масою близько 92 кДа. Характерною рисою молекулярної структури плазміногену є наявність п'яти петлевих доменів, що отримали назву кринглів. Специфічні ділянки міжмолекулярного розпізнавання, локалізовані у кринглових доменах, зумовлюють функціональні взаємодії плазміногену та плазміну з субстратом (фібрином), активаторами та інгібіторами [18]. На поверхні плазматичної мембрани деяких клітин крові Glu-плазміноген може перетворюватися на плазмін під дією активаторів. Припускається, що таке перетворення зимогену на активну протеїназу відбувається через проміжну стадію утворення частково деградованої форми плазміногену (Lys-плазміноген), яка відрізняється від нативної форми конформаційно [31]. Однак фізіологічне значення Lys-плазміногену і

© А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

можливі самостійні функції цього білка залишаються недостатньо дослідженими.

Активовані тромбоцити здатні сорбувати у п'ять разів більшу кількість плазміногену, ніж інтактні клітини, причому афінність Lys-плазміногену до сайтів зв'язування на поверхні тромбоцитів є щонайменше втричі вищою у порівнянні з цією величиною для Glu-форми. Вважається, що плазмін, який утворюється з плазміногену на тромбоцитах, зумовлює профібринолітичні властивості їх поверхні [21, 22]. Разом з тим до недавнього часу у літературі була відсутня інформація відносно впливу різних форм плазміногену на агрегативну активність тромбоцитів. Раніше нами було показано, що Lys-плазміноген, на відміну від нативної форми білка, ефективно інгібує агоністіндуковану агрегацію у препаратах відмитих тромбоцитів людини [24], однак молекулярні механізми, що лежать в основі антиагрегативної активності Lys-плазміногену, потребують детального дослідження.

Під час активації тромбоцити зазнають цілу низку складних морфологічних змін, які здійснюються в результаті реорганізації їх цитоскелета, основними компонентами якого є актинові мікрофіламенти. Актин у тромбоцитах наявний у трьох формах: у складі власне філаментів (F-актин), у вигляді глобул-мономерів (G-актин) та у комплексі з актин-асоційованими білками, формуючи так званий мембранний кортекс (МС). Активація тромбоцитів індукує процес полімеризації G-актину та асоціацію актинового кортексу з філаментним апаратом клітини, тому в активованих тромбоцитах близько 90% усього актину знаходиться у F-формі. Виходячи з цього, співвідношення різних пулів актину використовується як чутливий показник, котрий характеризує стан цитоскелета клітини [10].

Взаємодія МС з інтегриновими рецепторами є умовою для забезпечення міцної адгезії та агрегації тромбоцитів [3]. Інгібування процесів полімеризації актину та реорганізації актинового цитоскелета порушує

адгезивні властивості інтегринів, що призводить до втрати тромбоцитами агрегативної здатності, як це показано в експериментах з використанням цитохалазинів [6]. Інформація про те, що деякі крингльвімісні фрагменти плазміногену (ангіостатини) пригнічують міграцію моноцитів–макрофагів завдяки дезорганізації актинового цитоскелета цих клітин [23], стала додатковим стимулом для проведення цього дослідження. Таким чином, метою нашої роботи було дослідити вплив різних форм плазміногену на стан актинового цитоскелета тромбоцитів, що знаходяться у стані фізіологічного спокою, а також активованих різними індукторами.

МЕТОДИКА

Плазму крові отримували з венозної крові 9 умовно здорових донорів. Для експериментів використовували препарати відмитих тромбоцитів, отриманих за методом Geag та співавт. [11] з модифікаціями. Відмиті тромбоцити одержували поетапним центрифугуванням крові, до якої попередньо був доданий цитратний буфер (100 ммоль/л цитрату натрію, 80 ммоль/л лимонної кислоти, 110 ммоль/л глюкози) як антикоагулянт у співвідношенні кров : буфер – 9 : 1. Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) отримували після центрифугування крові при 160 g протягом 20 хв за кімнатної температури. Далі її центрифугували (340 g, 20 хв), осад тромбоцитів ресуспендували в буфері для їх відмивки (20 ммоль/л HEPES; рН 6,8, 137 ммоль/л NaCl, 4 ммоль/л KCl, 0,2 ммоль/л MgCl₂ з додаванням 0,2 % глюкози та 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну). Суспензію клітин повторно центрифугували за тих самих умов і ресуспендували у буфері, об'єм якого становив 1/2 об'єму ЗТП.

Для дослідження ефектів Glu- і Lys-форм плазміногену на перебудови актинового цитоскелета тромбоцитів, що знаходяться у різних фізіологічних станах, використовували такі групи клітин: 1 – інтактні тромбоцити (контроль); 2 – тромбоцити, активовані тромбіном

(1 одиниця NIH/мл); 3 – тромбоцити, активовані колагеном (1,25 мг/мл); 4 – тромбоцити, інкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном (1,2 мкмоль/л); 5 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані тромбінном; 6 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані колагеном.

Кількість тромбоцитів у пробі становила 300–350 тис./мкл. Процес агрегації реєстрували протягом 5 хв за допомогою оптичного агрегометра SOLAR AT-02 з використанням пакету програм «Агрегометр 2.01» [33]. Перед внесенням стимулятора агрегації проби інкубували з Glu- або Lys-плазміногеном при 37 °С протягом 3 хв для забезпечення зв'язування білків з поверхнею тромбоцитів [20]. Агрегометрію проводили протягом 3 год з моменту забору крові. В експерименті використовували препарати тромбіну і колагену («Sigma Aldrich», США), концентрації активаторів були обрані згідно з рекомендаціями Barkagan та співавт. [2]. Препарати Glu- і Lys-плазміноген були отримані відповідно до описаних методик у праці [1] співробітниками відділу хімії та біохімії ферментів ІБХ НАНУ, вибір їх концентрацій було зроблено згідно з даними, описаними Рока-Моюя та співавт. [24].

Отримання білкових фракцій тромбоцитів, що містять різні пули актину, проводили руйнуванням клітин за допомогою Triton X-100-вмісного буфера та наступного диференціального центрифугування [7]. Відразу після проведення агрегометрії до суспензії тромбоцитів вносили рівний об'єм лізуючого буфера такого складу: 100 ммоль/л тріс-НCl (рН 7,4), 2% Triton X-100, 10 ммоль/л етиленглікольтетраоцтової кислоти, 2 мкг/мл лейпептину, 100 ммоль/л бензамідину, 2 ммоль/л фенілметилсульфонілфлуориду, 2 ммоль/л ванадату натрію. Після обережного ресуспендування клітин при 4 °С лізати тромбоцитів центрифугували при 15000 g протягом 4 хв. Отриманий осад, нерозчинний у буфері з Triton X-100, містить фракцію F-актину. Для відділення пулів G- і MC-ак-

тину, що залишилися у надосадовій рідині, супернатант центрифугували при 100000 g протягом 2 год. Осад містив фракцію MC-актину. Пул G-актину, солнобілізованого у Triton X-100-вмісному буфері, залишався при цьому у супернатанті. Всі етапи центрифугування проводили при 4 °С.

До осадів, отриманих після низько- та високошвидкісного центрифугувань, вносили тріс-НCl-буфер (62,5 ммоль/л, рН 6,8), що містив 0,1 % додецилсульфату натрію (DS-Na), 1 % β-меркаптоетанолу, 10% гліцерину та 0,001 % бромфенолового синього, в об'ємі 100 мкл/осад і кип'ятили на водяній бані протягом 15 хв для солнобілізації білків. Проби, що містять G-актин, змішували із зазначеним буфером у співвідношенні проба : буфер – 2:1 і кип'ятили в такому самому режимі. Електрофоретичне розділення білків у пробах проводили у пластині 10%-го поліакриламідного гелю (РААГ) за наявності 0,1% DS-Na за стандартною методикою [17] з урахуванням рекомендацій, описаних у праці Brunso та співавт. [4]. Детекцію актину здійснювали за допомогою імуноблотингу [27]. Для цього білки з РААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану («GE Healthcare Amersham», Велика Британія), яку після блокування у 5%-му розчині знежиреного сухого молока («Carnation», США), обробляли кролячими антитілами проти актину («Sigma Aldrich», США) у розведенні 1:400. Далі нітроцелюлозу інкубували зі вторинними антитілами проти імуноглобуліну G кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma Aldrich», США), взятими у розведенні 1:1500. Візуалізацію комплексу антиген–антитіло (поліпептидна зона 42 кДа) проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02% H₂O₂) і хромогену (0,01 % діамінобензидин). Після проведення реакції мембрани промивали, ретельно висушували і сканували для отримання цифрового зображення. Відносний вміст різних пулів актину у тромбоцитах кожної групи оцінювали денситометрично і виражали у відсотках від кількості F-актину у тій самій

групі клітин. Розраховані середні значення представлено на гістограмі у вигляді медіан, для оцінки вірогідності міжгрупової різниці використовували непараметричний U-критерій Манна–Уїтні [13]. Різницю вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашій роботі вперше отримано експериментальні результати щодо впливу Lys-плазміногену на стан актинового цитоскелета відмитих тромбоцитів людини та порушення агоністіндукованої реорганізації цитоскелетних структур. Результати імуноблотингу (рис. 1, а) та денситометрії (рис. 2), демонструють, що у тромбоцитів, які знаходяться у стані фізіологічного спокою, вміст G-актину й актину, що формує MC, становить 56 і 40 % відносно кількості F-форми відповідно. Інкубація неактивованих тромбоцитів з нативною (Glu-формою) плазміногену істотно не впливала на співвідношення різних пулів

актину. Проте внаслідок дії Lys-плазміногену збільшується вміст актину тромбоцитів, який входить до складу MC (у середньому 79 % відносно F-форми).

Для дослідження стану актинового цитоскелета активованих тромбоцитів та оцінки впливу різних форм плазміногену на реорганізацію філаментного матеріалу в експерименті використовували тромбін і колаген – найбільш потужні фізіологічні індуктори, дія яких викликає незворотну агрегацію тромбоцитів. Активація тромбоцитів як тромбіном, так і колагеном призводить до суттєвого зменшення вмісту G- і MC-актину (див. рис. 1, б). Наші результати узгоджуються з даними Cegecedo та співавт. [5]: активація тромбоцитів індукує інтенсивний фібрилогенез, що супроводжується полімеризацією G-актину з формуванням філаментів і асоціацією MC з актиновими фібрилами. Фібрилогенез вважається однією з ранніх ознак активації тромбоцитів, у цитоплазмі яких вміст F-форми може сягати 90% від загальної

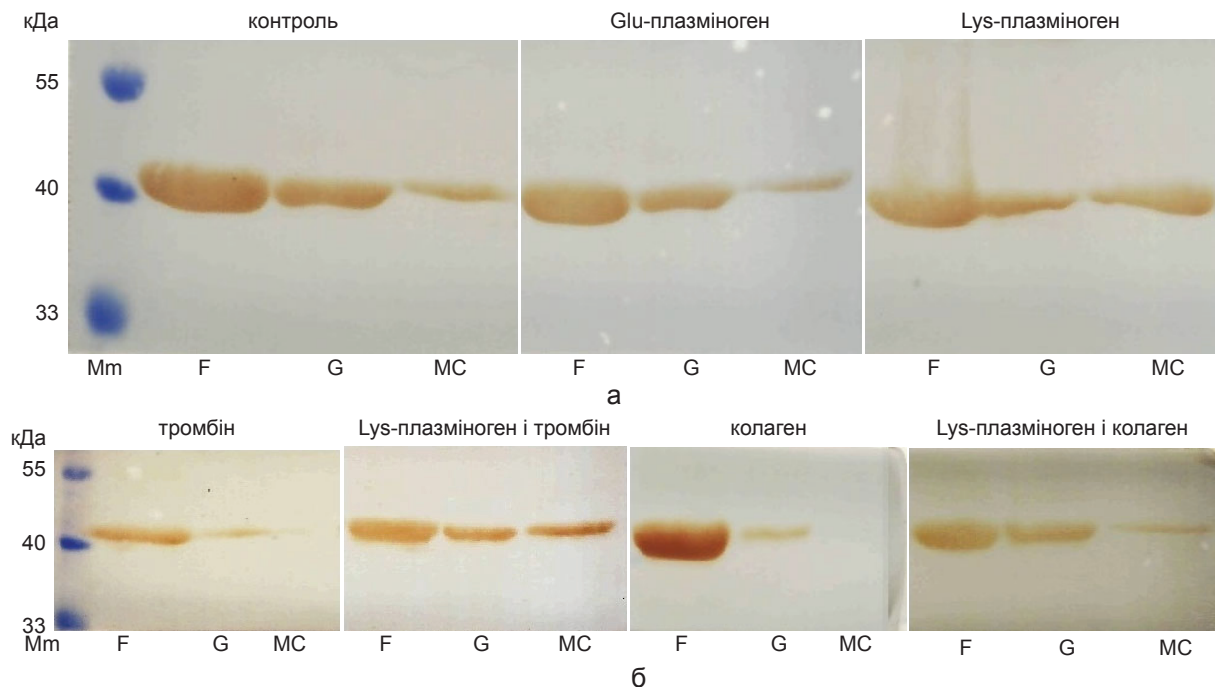


Рис. 1. Вплив Glu- і Lys-форм плазміногену на розподілення різних пулів актину у неактивованих тромбоцитах (а) та клітинах, активованих тромбіном або колагеном (б): Mm – маркери молекулярної маси; F – філаментний актин; G – глобулярний актин; MC – актин мембранного кортексу

кількості актину клітини [30]. Результати кількісного аналізу (див. рис. 2) показують, що вміст фракцій G- і MC-актину становить 17 і 8 % відносно кількості F-форми у тромбоцитах, активованих тромбіном, та 11 і 5 % у колагенактивованих тромбоцитах. Однак після дії індукторів активації на тромбоцити, що були преінкубовані з Lys-плазміногеном, перерозподілу пулів актину, характерного для активованих тромбоцитів, не відбувається (див. рис. 1, б). Денситометричний аналіз імуноблотингу (див. рис. 2) дав змогу встановити, що у тромбоцитах, преінкубованих з Lys-плазміногеном і далі активованих тромбіном, G-форма актину становить 64% відносно кількості F-актину, тоді як на актин MC припадає 62 %. Цей показник для G- і MC-актину тромбоцитів, преінкубованих з Lys-плазміногеном з наступною активацією колагеном, становить 63 і 51 % відповідно.

Результати аналізу різних форм актину у білкових пробах тромбоцитів, які свідчать про порушення Lys-плазміногеном адекватної реорганізації цитоскелета тромбоцитів, корелюють з даними агрегометричного аналізу. Показано зниження ступеня тромбін- і колагеніндукованої агрегації за наявності цієї

форми плазміногену приблизно вдвічі (рис. 3, 4). Натомість, Glu-плазміноген істотно не впливає на індуковану агрегацію тромбоцитів (приклад кривої, що ілюструє відсутність антиагрегативних ефектів Glu-плазміногену, наведено на рис. 4). Також слід зазначити, що жодна з форм плазміногену не викликає агрегацію відмитих тромбоцитів людини [24]. Оскільки Glu-плазміноген, на відміну від Lys-форми, не проявляє антиагрегативну активність і не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів, то його ефекти на агоністіндуковану реорганізацію цитоскелета у цьому модельному експерименті не досліджували.

Згідно з класичним уявленням, послідовність біохімічних і клітинних процесів, які складають основу функціонування тромбоцитів у первинному гемостазі, включає чотири стадії: адгезію, активацію, секрецію й агрегацію. Незважаючи на наявність великої кількості активаторів та їх рецепторів, клітина має обмежену кількість сигнальних шляхів та ефекторних механізмів [19]. Зокрема, тромбін активує тромбоцити людини, зв'язуючись зі специфічними PAR (від англ. protease activated receptors) -1 та -4,

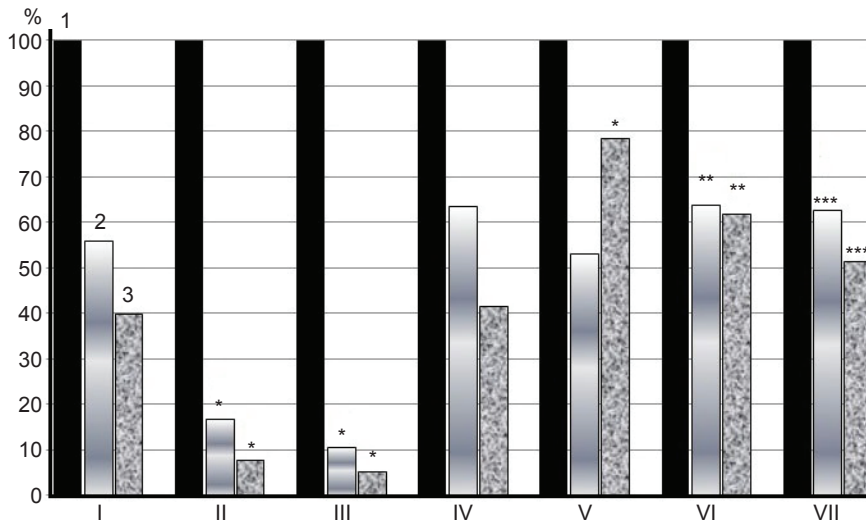


Рис. 2. Відносний вміст різних форм актину тромбоцитів (у відсотках від вмісту F-актину): 1 – F-актин, 2 – G-актин, 3 – актин мембранного кортексу; I – контроль, II – тромбін, III – колаген, IV – Glu-плазміноген, V – Lys-плазміноген, VI – Lys-плазміноген і тромбін, VII – Lys-плазміноген і колаген. *P<0,05 у порівнянні з контролем; **P<0,05 у порівнянні з тромбоцитами, що були активовані тромбіном; ***P<0,05 у порівнянні з тромбоцитами, що були активовані колагеном

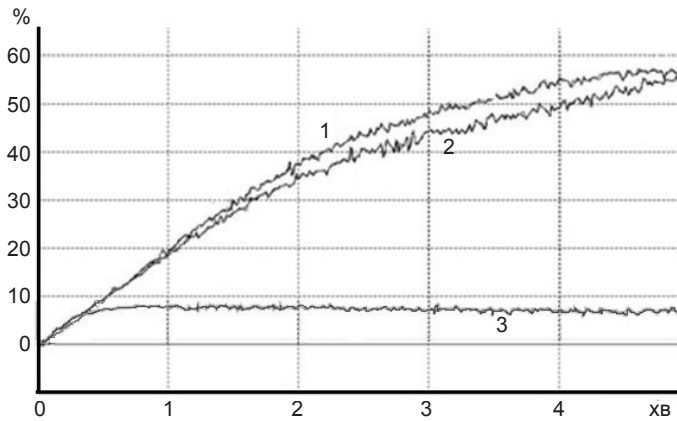


Рис. 3. Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на тромбініндуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини: 1 – тромбін (1 одиниця NIH/мл); 2 – Glu-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і тромбін; 3 – Lys-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і тромбін

відщеплюючи від них N-кінцеві пептиди. Це викликає активацію рецепторів і передачу сигналу через фосфоліпазу C β , котра, у свою чергу, розщеплюючи фосфатидилінозитол, призводить до утворення інозитол-3-фосфату та діацилгліцеролу. Обидва компоненти, що утворились, є стимуляторами наступних реакцій, кінцевим результатом яких є активація протеїн-тирозинкіназ, що відносяться до родин Src, FAK і Syk, вивільнення Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулуму та реорганізація актинового цитоскелета. У разі колагеніндукованої агрегації активатор зв'язується зі специфічним рецептором GPVI на плазматичній мембрані тромбоцитів. Активованій рецептор передає сигнал на фосфоліпазу C γ ,

а подальший шлях є подібним до описаного вище тромбінзалежного механізму [9, 14, 25]. Особливу роль у процесах активації і агрегації відіграє MC, який формується з коротких актинових філаментів, що знаходяться у комплексі з актинасоційованими білками (спектрином, вінкуліном, таліном, α -актиніном, кіндліном тощо). При активації сигнальних шляхів тромбоцитів актинові фібрили цитоплазми асоціюють з MC з утворенням єдиної філаментної мережі. MC опосередковує взаємодію мембранних рецепторів з цитоскелетом клітини, утворюючи, з одного боку, міцний комплекс з інтегрином GP IIb/IIIa, а з іншого – з філаментами цитоплазми. Передача сигналу через цитоскелетні білки,

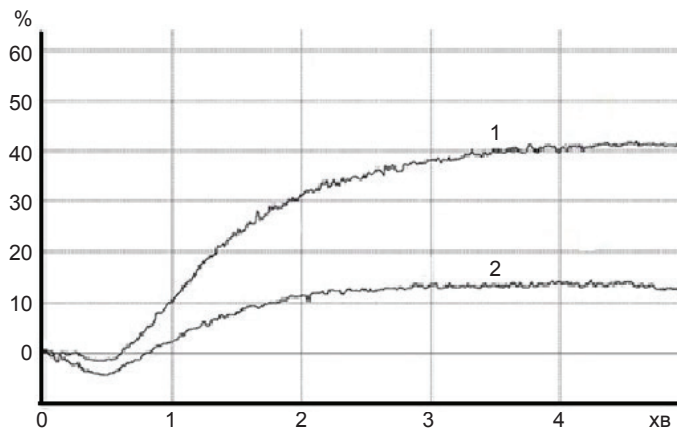


Рис. 4. Вплив Lys-плазміногену на колагеніндуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини: 1 – колаген (1,25 мг/мл); 2 – Lys-плазміноген (1,2 мкмоль/л) і колаген

зв'язані з GP ІІІа (талін, кіндлін), призводять до активації інтегрину, який з більшою афінністю зв'язує адгезивні ліганди (фібриноген, фібронектин, вітронектин, фактор фон Вілебранда), що призводить до агрегації тромбоцитів. Крім того, цитоскелет регулює адгезивні властивості GP ІІІа, філаментні структури також контролюють кластеризацію молекул інтегрину у плазматичній мембрані [26]. В експериментах Diaz-Ricart та співавт. [6] показано, що в результаті обробки тромбоцитів агентами-інгібіторами полімеризації актину (цитохалазін В, латрункулін А), ці клітини втрачають здатність розпізнавати адгезивні ліганди та агрегувати навіть за наявності потужних індукторів. У свою чергу взаємодія GP ІІІа з адгезивними молекулами стабілізує цитоскелет тромбоцитів і сприяє організації філаментів у стрес-фібрили, характерні для фокальних контактів [15].

Раніше висловлювалося припущення про те, що зв'язування Glu- і Lys-плазміногену з тромбоцитами здійснюється завдяки їх взаємодії з адгезивними молекулами (фібриноген, тромбоспондин, вітронектин), які секретуються тромбоцитами під час їх активації, або конкуренції з цими лігандами за сайти зв'язування на мембранних рецепторах активованих тромбоцитів [22]. Показано, що сорбція плазміногену на поверхні тромбінактивованих тромбоцитів забезпечується фібрином, який утворюється з фібриногену внаслідок дії тромбіну. Водночас припускається, що взаємодія плазміногену з неактивованими тромбоцитами не залежить лише від фібрин(оген)у, і потребує наявності додаткових центрів зв'язування [20]. Результати нашої роботи про вплив Lys-плазміногену на цитоскелет неактивованих тромбоцитів також свідчать на користь існування альтернативного механізму взаємодії плазміноген-тромбоцит. Потрібні подальші дослідження для ідентифікації рецепторів Lys-плазміногену на мембрані інтактних і активованих тромбоцитів, активація котрих впливає на

ключові сигнальні шляхи клітини, що регулюють динаміку актинового цитоскелета. Індуковані Lys-плазміногеном зміни можуть призводити до аберантної асоціації МС, запобігаючи інтеграції останнього до єдиної філаментної мережі з цитоплазматичними фібрилами, як це було продемонстровано у дослідях з використанням фрагментів плазміногену, що складаються з декількох кринглових доменів. Ці фрагменти, відомі під назвою ангіостатини, функціонують як регулятори активності ендотеліоцитів, а також деяких клітин крові [16]. Так, було показано, що ангіостатин, який містить у своєму складі перші три крингли (К1-3), ефективно пригнічує міграцію моноцитів-макрофагів через дезорганізацію актинового цитоскелета цих клітин [23]. Автори припускають, що К1-3 може індукувати дисоціацію актинових філаментів внаслідок взаємодії на поверхні моноцитів-макрофагів з білком ангіомотином, який відповідає за формування актинових фібрил і клітинну рухливість. Ще одним білком, який претендує на роль рецептора плазміногену, може бути сам актин, який експонується на поверхні плазматичної мембрани деяких клітин, у тому числі активованих тромбоцитів [12]. Існують дані про те, що поверхневий актин асоційований з філаментним матеріалом цитоплазми. Обговорюється його роль як рецепторної молекули та матриці для зв'язування та активації білків [28]. Зокрема, молекули плазміногену-плазміну розпізнають і зв'язуються з актином з достатньо високою афінністю (за даними різних авторів, величина константи дисоціації комплексу плазміноген – β -актин знаходиться у діапазоні 70–140 нм) [29]. Не виключається, що до зв'язування Lys-плазміногену з поверхнею тромбоцитів задіяний актин, і ця взаємодія генерує сигнал, який призводить до порушення реконструкції внутрішньоклітинної цитоархітекtonіки. Можливо, що визначений у нашій роботі вплив Lys-плазміногену на цитоскелет є одним з механізмів регуляції клітинної активності,

спільним як для молекули плазміногену, так і для деяких його кринглівмісних фрагментів.

Слід зазначити, що відмиті тромбоцити людини виявилися не чутливими до дії нативної форми плазміногену. Як припускалося раніше [7], відсутність атиагрегативної активності Glu-плазміногену може пояснюватися його більш закритою у порівнянні з Lys-формою конформацією, внаслідок чого центри міжмолекулярного розпізнавання, що знаходяться у кринглових доменах, опиняються недоступними для взаємодії зі специфічними лігандами. Незважаючи на те, що плазміноген циркулює у плазмі тільки у вигляді Glu-форми, фізіологічне значення Lys-плазміногену як регулятора активності клітин не можна виключати [8]. Вірогідно, що Lys-плазміноген здатний утворюватися також на поверхні плазматичної мембрани тромбоцитів і модулювати їх функціональну активність. Таким чином, компоненти системи плазміноген-плазмін відіграють першорядну роль не лише у перебігу фібринолітичних процесів, але й беруть участь у регуляції тромбоцитарного гемостазу.

ВИСНОВКИ

1. Lys-форма плазміногену впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів людини та індукує зростання відносного вмісту актину мембранного кортексу.

2. Обробка тромбоцитів Lys-плазміногеном перед дією активаторів (тромбіну та колагену) порушує агоністіндуковану реконструкцію актинового цитоскелета.

3. Нативна форма плазміногену (Glu-форма) не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів.

4. Отримані результати дають змогу припустити, що актинові компоненти цитоскелета тромбоцитів залучаються до процесів, які зумовлюють антиагрегативну активність Lys-плазміногену.

**А.А. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков,
Я.М. Рока-Мойя, С.І. Диордієва, Т.В. Гриненко**

ВЛИЯНИЕ LYS-ФОРМЫ ПЛАЗМИНОГЕНА НА АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ ТРОМБОЦИТОВ

Изучалось влияние разных форм плазминогена на состояние актинового цитоскелета тромбоцитов человека. В качестве показателя реорганизации цитоскелета тромбоцитов использовали соотношение разных пулов актина, детекции которого проводили методом иммуноблоттинга. Показано, что в интактных тромбоцитах количество глобулярного (G) актина и актина, который формирует мембранный кортекс (MC), составляет 56 и 40% относительно содержания филаментной (F) формы соответственно. В тромбоцитах, активированных тромбином или коллагеном, актин находится почти исключительно в F-форме. Инкубация неактивированных тромбоцитов с Lys-формой плазминогена вызывает увеличение содержания MC-фракции актина до 79% относительно F-формы. Кроме того, Lys-плазминоген ингибирует перераспределение пулов актина, характерное для активированных тромбоцитов. В отличие от Lys-формы, Glu-плазминоген не угнетает агонистиндуцированную агрегацию тромбоцитов и не нарушает процесс реорганизации их актинового цитоскелета. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о вовлечении цитоскелетных структур тромбоцитов в реализацию антиагрегативных эффектов Lys-плазминогена. Ключевые слова: плазминоген, тромбоциты, агрегация тромбоцитов, актин, цитоскелет.

**A.A. Tykhomyrov, D.D. Zhernosekov,
Y.M. Roka-Moya, S.I. Diordieva, T.V. Grinenko**

EFFECTS OF LYS-FORM OF PLASMINOGEN ON PLATELET ACTIN CYTOSKELETON

The effects of several forms of plasminogen on the state of actin cytoskeleton of human platelets were studied. A ratio between various actin pools, which were detected by immunoblotting, was taken as indicator of platelet cytoskeleton reorganization. It was revealed that intact platelets contain globular (G) actin and membrane cortex (MC) actin in amounts that are 56 and 40% of filamentous (F) actin level, respectively. In both thrombin- and collagen-activated platelets, actin is almost entirely presented in F-form. Incubation of resting platelets with Lys-plasminogen causes elevation of MC-actin level up to 79% in respect to F-form content. In addition, Lys-plasminogen inhibits reorganization of actin cytoskeleton typical for activated platelets. In contrast to Lys-form, Glu-plasminogen affects neither platelet aggregation nor redistribution of actin pools. Thus, these data indicate that cytoskeletal structures of platelets are involved in realization of anti-aggregating effects of Lys-plasminogen.

Key words: plasminogen, platelets, platelet aggregation, actin, cytoskeleton.

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Asina RB, Mukhametova LI, Gulin DA, Levashov MY, Prisyazhnaya NV, Gershkovich KB, Varfolomeyev SD. Inhibitory effect of angiostatins on activity of the plasminogen/plasmin activator system. *Biochemistry (Moscow)*. 2001;**74**(10):1104-1113.
2. Barkagan ZS, Momot AP. *Diagnostics and controlled therapy of hemostasis disorders*, 3rd ed. Moscow: Newdiamed; 2008.
3. Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plan-tavid M, Payrastra B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci*. 2005;**118**:759-769.
4. Brunso L, Segura D, Monreal L, Escolar G, White JG, Diaz-Ricart M. The secretory mechanisms in equine platelets are independent of cytoskeletal polymerization and occur through membrane fusion. *Platelets* 2010;**21**(8):658-666.
5. Cerecedo D, González S, Mondragón M, Reyes E, Mondragón R. In-vitro model for the ultrastructural study of the formation of thrombi in human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;**17**(2):161-164.
6. Diaz-Ricart M., Arderiu G, Estebanell E, Pérez-Pujol S, Lozano M, White JG, Escolar G, Ordinas A. Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. *Am J Pathol*. 2002;**160**(1):329-337.
7. Diaz-Ricart M, Estebanell E, Cases A, Calls J, López-Pedret J, Carretero M, Castillo R, Ordinas A, Escolar G. Abnormal platelet cytoskeletal assembly in hemodialyzed patients results in deficient tyrosine phosphorylation signaling. *Kidney Int*. 2000;**57**(5):1905-1914.
8. Ellis V. Plasminogen activation at the cell surface. *Curr Top Dev Biol*. 2003;**54**:263-312.
9. Farndale RW. Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;**36**(2):162-165.
10. Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost*. 1993;**70**(6):884-893.
11. Gear ARL, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 2001;**97**(4):937-945.
12. George JN, Lyons RM, Morgan RK. Membrane changes associated with platelet activation. Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion. *J Clin Invest*. 1980;**66**(1):1-9.
13. Hollender M, Wolf D. *Nonparametric statistical methods*. Moscow: Finances and statistics; 1983.
14. Jennings LK, Fox JE, Edwards HH, Phillips DR. Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem*. 1981;**256**(13):6927-6932.
15. Jirousková M, Jaiswal JK, Collier BS. Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* 2007;**109**(12):5260-5269.
16. Klys' YG, Zajtseva NV, Kizim AI, Verevka SV. Proteolytic derivatives of plasminogen as a factor in malignancy development. *Oncology* 2010;**12**(1):17-21.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680-685.
18. Lugovskoi EV, Makogonenko EM, Komisarenko SV. *Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin*. Kyiv: Naukova Dumka; 2013.
19. Michelson AD. *Platelets*, 3rd ed. Academic Press; 2012.
20. Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J Biol Chem*. 1988;**263**(24):11928-11934.
21. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FG, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci*. 2005;**1**(10):1754-1762.
22. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem*. 1985;**260**(7):4303-4311.
23. Perri SR, Annabi B, Galipeau J. Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. *FASEB J*. 2007;**21**(14):3928-3936.
24. Roka-Moya YM, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolymers and Cell*. 2012;**28**(5):352-356.
25. Rosado JA, Graves D, Sage SO. Tyrosine kinases activate store-mediated Ca²⁺ entry in human platelets through the reorganization of the actin cytoskeleton. *Biochem J*. 2000;**351**:429-437.
26. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;**104**(6):1606-1615.
27. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;**76**(9):4350-4354.
28. Tykhomyrov AA. Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role. *Biopolymers and Cell*. 2012;**28**(6):413-423.
29. Wang H, Doll JA, Jiang K, Cundiff DL, Czarnecki JS, Wilson M, Ridge KM, Soff GA. Differential binding of plasminogen, plasmin, and angiostatin 4.5 to cell surface beta-actin: implications for cancer-mediated angiogenesis. *Cancer Res*. 2006;**66**(14):7211-7215.
30. White JG. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. *Am J Pathol*. 1984;**117**(2):207-217.
31. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoid cell surface. *J Thromb Haemost*. 2003;**1**(6):1264-1270.
32. Zhernosekov DD, Iusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukr Biokhim Zh*. 2012;**84**(4):5-19.
33. Zubovskaya ET, Svetlitskaya SG. *System of hemostasis. Theoretical backgrounds and research methods*. Minsk: BGUFK; 2010.

Ин-т біохімії ім. А.В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 04.05.2013

О.М. Хома, Д.А. Заводовський, Д.Н. Ноздренко, О.В. Долгополов,
М.С. Мірошніченко, О.П. Мотузюк

Динаміка скорочення ішемізованого камбалоподібного м'яза щура

Досліджено характер зміни генерації силової відповіді штучно ішемізованого камбалоподібного м'яза щура при застосуванні електричної стимуляції еферент-сигналом, модульованим за частотою. Показано, що ішемія камбалоподібного м'яза щура (muscle soleus) призводить до зменшення максимальної силової продуктивності та зниження порогової частоти виходу скорочення на тетанічний рівень. Доведено, що при роботі ішемічно ушкодженого камбалоподібного м'яза сила скорочення і час встановлення стаціонарного рівноважного стану залежали від часу розвантажувального сегмента стимуляції.

Ключові слова: скелетний м'яз, ішемія, динаміка скорочення.

ВСТУП

Серед патологій (денервація, ішемія, тенотомія та їх комбінація), що виникають у м'язах при травмі, ішемічні ушкодження становлять до 35 % від загальної кількості ускладнень [2, 3, 6].

Сучасні методи лікування пацієнтів з переломами кісток дають змогу проводити медичну і соціальну реабілітацію в короткі терміни. Однак надання допомоги постраждалим при такому ускладненні, як гострий внутрішньотканинний гіпертензійний синдром (компартмент-синдром) залишається актуальною проблемою [3, 7, 9]. За даними різних авторів, частота його розвитку при закритих переломах кінцівок становить до 35 %, а при відкритих переломах кісток гомілки – до 10 %. Найбільш часто гострий компартмент-синдром розвивається як ускладнення складних, сегментарних і переломів кісток гомілки зі зміщенням [3, 6, 7, 10, 11].

Розвиток ускладнень при переломах довгих трубчастих кісток з наступною тривалою реабілітацією пацієнтів прямо залежить від внутрішньотканинного тиску. Однак в опи-

сах певних особливостей патогенезу цього синдрому на фундаментальному рівні багато суперечливостей [4, 7], що вимагає додаткових досліджень.

Метою нашої роботи було вивчення біомеханічних характеристик скорочення скелетних м'язів при ішемії на різних етапах розвитку компартмент-синдрому.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на 12 дорослих щурах масою від 0,2 до 0,3 кг. Тривалість досліду становила 8 год, час гострої ішемії – 5 год. При підготовці до експерименту анестезію здійснювали внутрішньочеревинним введенням разової дози нембуталу (40 мг/кг). Для доступу до судин, які живлять м'язи кінцівки, використовували розріз шкіри (L= 1,5–2,5 см) на внутрішній поверхні стегна. На відпрепаровану стегнову артерію та вену накладали лігатури для практично повного припинення кровопостачання м'яза, задіяного в експерименті. Підготовка разом з вищезазначеними заходами включала: проведення канюлювання сонної артерії та яремної вени

(для введення фармпрепаратів і вимірювання тиску), трахеотомію, ламіноектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. Камбалоподібний м'яз щура (*muscle soleus*) ретельно звільняли від навколишніх тканин, дистальне сухожилля відділяли від кістки. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у сегментах L7-S перерізували вентральні корінці безпосередньо в місці їхнього виходу зі спинного мозку.

Зміну сили вимірювали за допомогою чотирьох тензорезисторів, наклеєних із двох боків на сталеву пластину та включених у мостову вимірювальну схему. Сигнал, сформований вимірювальним пристроєм реєстрували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача (АЦП-ЦАП), підключеного до персонального комп'ютера, та використовували для зворотного зв'язку в контурі сервокерування. Оптимальне настроювання параметрів кожного регулятора робили при механічній дії на механостимулятор еластичним навантаженням із жорсткістю близько 0,5 Н/мм. Постійні часу перехідних процесів у обох режимах сервоконтролю не перевищували 50–60 мс, власна податливість правильно відрегульованого механостимулятора не перевищувала 2 мкН/мм.

Для формування командних сигналів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми. Зовнішнє навантаження на ішемізований м'яз здійснювали за допомогою системи механостимулятора, а зміни навантаження – лінійним електродвигуном, стимуляцію – електричними імпульсами прямокутної форми тривалістю 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів, керованого АЦП-ЦАП через платинові електроди. Перед кожним патерном частотно-модульованої стимуляції викликали поодинокі скорочення м'яза для виведення скоротливого апарату з нативного стану. Патерн стимульовального сигналу задавали програмно й передавали з комплексу АЦП-ЦАП на стимулятор.

Статистичну обробку результатів дослід-

ження проводили за методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

Кожна з кривих, наведених на рисунках у нашій роботі, є типовою серед 12 аналогічних експериментів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Компартмент-синдром – стан, за якого високий внутрішньотканинний тиск у щільних кістково-фасціальних об'ємах викликає порушення руху крові у капілярах, що призводить до появи ішемії та швидкого зменшення максимальної силової продуктивності, пришвидшує виникнення і розвиток процесів втоми [1, 8].

Для аналізу розвитку втоми м'яза ми застосували двокомпонентний стимуляційний патерн з різними часовими рівнями розвантаження (зменшений за частотою подразнювальний сигнал, який не призводить до тетанічних скорочень – ділянка Δf_2). Це дало змогу прослідкувати динаміку розвитку ішемічних ушкоджень м'язових волокон і мінімізувати можливий вплив зміни жорсткісних компонентів скорочення м'яза.

Зміна тривалості ділянок розвантаження між частинами стимуляційного сигналу (рис. 1, 2, 3 ділянка Δt_1), дала змогу прослідкувати зміну генерації силової відповіді ішемізованого м'яза в процесі розвитку пошкодження тканини на ділянках до та після розвантажувальної компоненти (Δt_1 та Δt_3 відповідно).

Процеси генерації сили при першому пулі модульованої стимуляції (див. рис 1, ділянка Δf_1 та відповідна їй Δt_1), зареєстровані перед розслабленням м'яза (ділянка Δt_2), являли собою стандартну генерацію силової відповіді, зменшення якої лінійно корелювало з часом ішемізації. М'язова активність призводить до зменшення силової продуктивності, що може свідчити про появу м'язової втоми. Продемонстровано [1, 8], що розвиток втоми при стимуляціях скелетного м'яза, що повторюються, складається з початкового

періоду зі зменшенням сили на 10–15 % . За ним настає другий етап, коли сила залишається постійною. І, нарешті, кінцевий період характеризується різким зменшенням сили до низького рівня. Показано також, що початкове зниження сили м'яза в цілому зумовлено зменшенням зусилля, яка генерується при утворення поперечних містків. Наступні етапи зниження сили спричинені зменшенням кількості молекулярних моторів, тобто поперечних містків, задіяних у генерації механічного зусилля. Отже, в цьому разі ми можемо говорити про подібність силових відповідей при втомі і штучній ішемії.

Після застосування розвантажувальної стимуляції зміна силової відповіді до нового, меншого за значенням рівня (ділянка Δf_2), може бути зумовлена фізіологічною адаптаційною реакцією ішемізованого м'яза для збереження максимально коректної реалізації еферентної активності [5]. При додатковому навантаженні процеси генерації механічного напруження в досить коротких інтервалах часу (до 0,3–0,5с від початку стимуляції другим пулом – ділянка Δt_3), виявляли тенденцію до зменшення: не менше ніж 60 % від загальної зміни сили м'яза. Статична компонента генерації зусилля, що полягала у повільному переході до нового, меншого за значенням, рівня сили могла бути зумовлена фізіологічною адаптаційною ішемізованого м'яза [5] для збереження максимально коректної реалізації стимуляційних пулів.

Однією з перешкод при кількісному описанні м'язової динаміки є недостатня вивченість складних, нелінійних ефектів, як розбіжності у співвідношеннях основних параметрів м'язового скорочення: сили та зміни довжини в дискретних часових проміжках. Перш за все, така розбіжність відображає нестационарні властивості м'язового скорочення, які у разі ішемічного ушкодження м'яза набувають важливого значення [4].

Зміни швидкості генерації силової відповіді ішемічно ушкодженого м'яза при модульованих змінах частоти еферентної

стимуляції, спостерігаються в рамках двокомпонентного стимуляційного сигналу з різними часовими розвантажувальними ділянками (див. рис. 1). Переходи від одного значення рівноважної сили м'яза (Δf_1) до іншого (Δf_2) при використаному в експерименті постійному зовнішньому навантаженні та частоти стимуляції відповідають в такому разі лінійним зменшенням силових відповідей залежно від одного зовнішнього фактора – часу ішемізації м'яза.

При збільшенні часу розвантажувальної стимуляції (ділянка Δt_2 , див. рис. 1) на зміну швидкості основних динамічних компонентів проявлялися статичні компоненти, які являють собою більш повільне зменшення сили м'яза, рівень зменшення яких збігався з загальною тривалістю ішемізації органа (див. рис. 1). Уповільнення динамічних реакцій зі збільшенням часу розвантажувальної стимуляції ішемізованого м'яза, принаймні частково, могло бути зумовлено нестационарними властивостями м'язового скорочення [5], які особливо виразно проявляються в умовах ішемічного ушкодження м'язових волокон [12, 13].

При переході від скорочення до подовження м'яза (сегмент на межі ділянок Δt_1 та Δt_2), рівень змін статичної компоненти (ділянка Δf_2) зменшувався зі збільшенням часу розвантажувальної стимуляції. Водночас зменшення максимальної силової відповіді призводило до встановлення нового стаціонарного рівня. Таким чином, зі збільшенням часу розвантажувальної стимуляції мінімізувалися розбіжності в максимальних силових відповідях на ділянках Δf_2 , які на ділянках Δf_1 збільшувалися з тривалістю ішемії. У частині дослідів з вивчення динаміки скоротливих процесів ішемізованого камбалоподібного м'яза спостерігався тремор. Затухаючі коливання рееструвались як при подовженні, так і при скороченні м'яза. Зі збільшенням тривалості розвантажувальної стимуляції їхня амплітуда зменшувалася до повного зникнення.

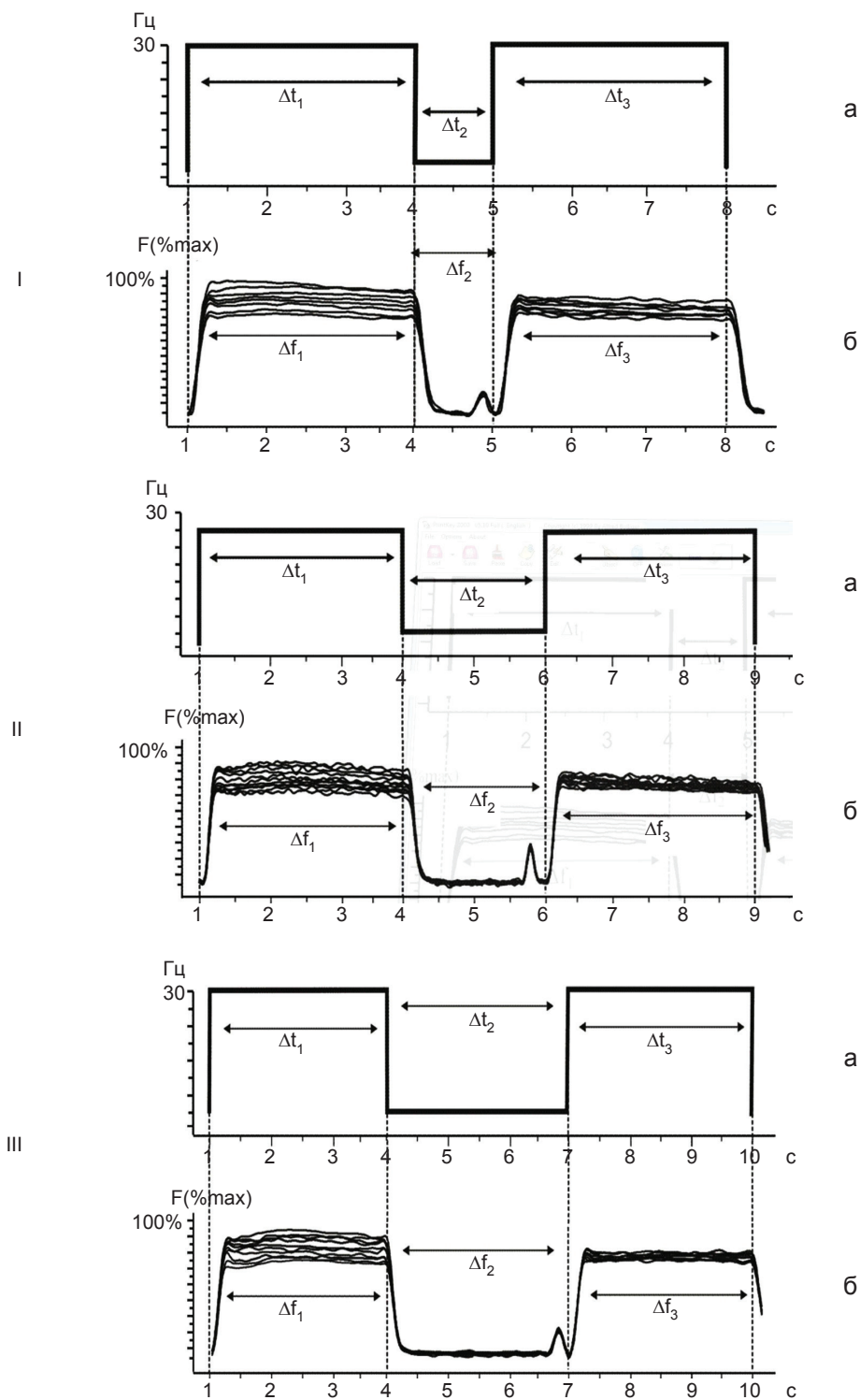


Рис. 1. Криві генерації сили ішемізованого камбалоподібного м'яза щура (muscle soleus) за умов застосування модульованого стимуляційного сигналу з часом розвантажувальної стимуляції 1с (I), 2с (II) і 3с (III): а – частотні зміни прикладеної електричної стимуляції, б – криві зміни силової відповіді м'язового скорочення; $\Delta t_1 - \Delta t_3$ часові інтервали стимуляції, $\Delta f_1 - \Delta f_3$ ділянки зміни силової відповіді

Слід відмітити, що описані ефекти проявляються тільки при збільшенні часу розвантажувальної стимуляції (Δt_2), при незмінному часі стимуляції м'яза. При зміні тривалості стимуляції від 1 до 2 та 3 с. Відповідно (рис. 2), значення сили на ділянках Δf_3 в усіх випадках залишався майже на одному рівні.

Різний характер проходження приросту сили ішемічно пошкоджених м'язів (рис. 3), говорить про наявність складної регуляції молекулярних механізмів скорочення, яка, можливо, відрізняється, залежно від стану, в якому перебуває скоротливий апарат. Слід підкреслити, що описані ефекти з'являється лише за умов стимуляції, близьких до фізіологічних, що свідчить про важливість цих процесів у загальному механізмі скорочення при ішемії.

Отримані результати вказують на те, що частота сигналів еферентної стимуляції не визначає кінцевий результат силової продук-

тивності ішемічно пошкоджених м'язів.

Таким чином, у всіх процесах скорочення muscle soleus час встановлення стаціонарного рівноважного стану статичної компоненти Δf_2 був відносно постійним при збільшенні часу розвантажувальної стимуляції і, водночас, швидко збільшувався зі зменшенням часу розвантажувального еферентного подразнення. Видно, що при застосуванні модульованої стимуляції спостерігаються кількісні та якісні розбіжності у скороченні ішемічно пошкодженого камбалоподібного м'яза щура перед та після проходження максимального плато стимуляції (див. рис. 3).

Виходячи з того, що скорочення м'яза це – динамічний коливальний процес, що базується на роботі взаємопов'язаних підсистем, можна припустити, що в умовах виникнення патологічних змін у м'язових волокнах, викликаних ішемізацією, повинне бути оптимальне співвідношення параметрів

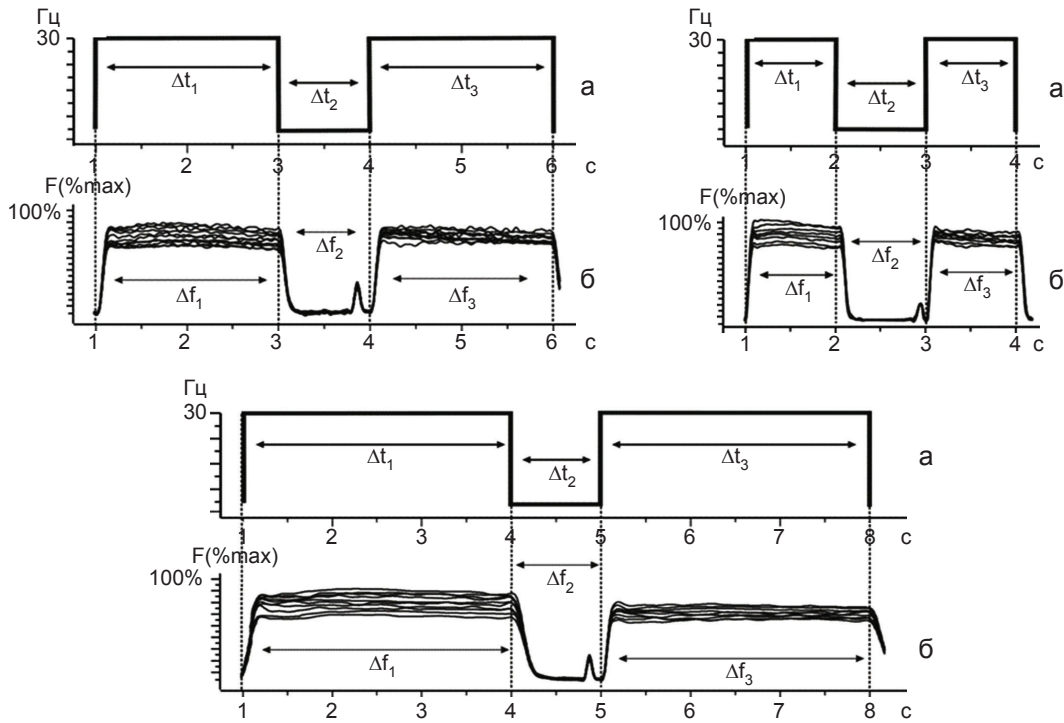


Рис. 2. Криві генерації сили ішемізованого камбалоподібного м'яза щура (muscle soleus) за умов застосування модульованого стимулювального сигналу з часом розвантажувальної стимуляції 1с і часом стимуляції на 1 і 1с, 2 і 2с, та 3 і 3с відповідно: а – частотні зміни прикладеної електричної стимуляції, б – криві зміни силової відповіді м'язового скорочення; $\Delta t_1 - \Delta t_3$ часові інтервали стимуляції, $\Delta f_1 - \Delta f_3$ ділянки зміни силової відповіді

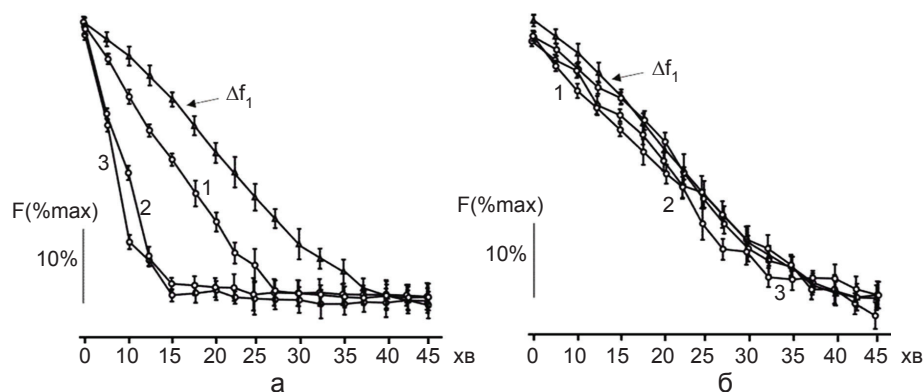


Рис. 3. Криві генерації сили ішемізованого камбалоподібного м'яза щура (muscle soleus) на ділянках Δf_3 (1, 2, 3) за умов застосування модульованого стимулювального сигналу з часом розвантажувальної стимуляції 1, 2 та 3 с відповідно (а), та при зміні часу стимуляції на стаціонарних ділянках 1, 2 та 3 с (б) відповідно 1, 2, 3

стимуляції, здатних задіяти максимальну кількість структур саркомера для найбільш оптимального виконання скорочення. Гетерогенний склад скоротливого елемента скелетного м'яза ускладнює оцінку пошкодження кожного окремого компонента [13, 14]. Однак, без сумніву, виявлений зв'язок часу встановлення стаціонарного рівноважного стану з часом розвантажувальної стимуляції – цікава і важлива властивість ішемічно пошкодженого камбалоподібного м'яза, яка потребує всебічного вивчення.

Отже, скорочення ішемічно пошкодженого камбалоподібного м'яза щура характеризується тривалою післядією, яка суттєво впливає на подальшу роботу м'яза.

А.Н. Хома, Д.А. Заводовський, Д.Н. Ноздренко, О.В. Долгополов, М.С. Мірошниченко А.П. Мотузюк

ДИНАМИКА СОКРАЩЕННЯ ІШЕМИЗОВАНОЇ КАМБАЛОВИДНОЇ М'ЯЩИ КРЫСИ

Исследовано процессы изменения генерации силового ответа искусственно ишемизированой камбаловидной мышцы крысы, при использовании электрической стимуляции эферент-сигналом, модулированным по частоте с использованием методов тензометрической регистрации сокращения. Для индукции процессов ишемии мышц на магистральные сосуды нижней конечности животного накладывали лигатуры. Показано, что ишемия мышц вызывает уменьшение максимальной силовой производительности и снижает пороговую частоту стимулирующего

сигнала, которая необходима для выхода сокращения на тетанический уровень. Продемонстрировано, что при сокращении ишемической мышцы, сила сокращения и время установления стационарного равновесного состояния коррелировали со временем разгрузочного сегмента стимуляции.

Ключевые слова: мышца, ишемия, динамика сокращения, силовой ответ.

A.M. Khoma, D.A. Zavodovskiy, D.M. Nozdrenko, O.V. Dolgoplov, M.S. Miroshnichenko A.P. Motuzjuk

DYNAMICS OF ISCHEMIC SKELETAL SOLEUS MUSCLE CONTRACTION OF THE RAT

The processes of change in the rate of generation of power response of artificially ischemic muscle using frequency modulated electrical efferent stimulation were investigated. A strain-gauge technique for registration of contraction process was used. Ischemia was induced by ligating main blood vessels of lower extremity. It is shown that ischemia causes a decrease in muscle performance and reduces maximum frequency of the stimulus signal, which leads to the titanic contraction level. It is shown that the lowering of ischemic muscle strength and reduction of the time that needed to establish a steady state depended on the time of discharge segment in stimulation pattern. Key words: muscle, ischemia, contraction dynamics, power answer.

Taras Shevchenko National University of Kyiv; Institute of Traumatology and Orthopedics NMA Ukraine; Lesya Ukrainka Eastern European National University

REFERENCES

1. Allen D, Lamb G, Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue. Cellular Mechanisms. *Physiol Rev.* 2008;**88**(1):287-332.
2. Blick S, Brumback R, Poka A. Compartment syndrome in

- open tibial fractures. J Bone Jt Surg. 1986;68:1348-53.
3. Clough T, Baie R. Audit of open tibial diaphyseal fracture management at a district accident . Ann R Coll Surg Engl. 2000;**82**(6):436-440.
 4. Dolgoplov O, Nozdrenko D, Strafun S, Miroshnichenko M. Changes in contraction parameters of skeletal muscle due to acute ischemia. Physics of alive. 2010;**18**(3):64-69.
 5. Kostyukov A, Korchak O. Length changes of the cat soleus muscle under frequency-modulated distributor stimulation of efferents in isotonical conditions. Neuroscience. 1998;**82**:943-955.
 6. McQueen M, Christie M, Court-Brown M. Acute compartment syndrome in tibial diaphyseal fractures. J Bone Jt Surg. 1996;**78**(Pt B):95-98.
 7. Murdock M, Murdoch M. Compartment syndrome: a review of the literature. Clin Podiatr Med Surg. 2012;**29**(2):301-310.
 8. Nocella M, Colombini B, Benelli G, Cecchi G, Bagni M, Bruton J. Force decline during fatigue is due to both a decrease in the force per individual cross-bridge and the number of cross-bridges. J Physiol. 2011;**589**(13):3371-81.
 9. Parekh R, Care D, Tainter R. Rhabdomyolysis: advances in diagnosis and treatment. Emerg Med Pract. 2012;**14**(3):1-15.
 10. Pasquale M, Frykberg E, Tinkoff G. Management of complex extremity trauma. Bull Am Coll Surg. 2006;**91**(6):36-38.
 11. Pierce S.M. Acute lower extremity compartment syndrome: avoiding limb loss and long-term complications. Adv NPs PAs. 2012;**3**(4):21-24.
 12. Schubert A. Exertional compartment syndrome: review of the literature and proposed rehabilitation guidelines following surgical release. Int J Sports Phys Ther. 2011;**6**(2):126-141.
 13. Triffitt P, König D, Harper W, Barnes M, Allen M, Gregg P. Compartment pressures after closed tibial shaft fracture: their relation to functional outcome. J Bone Jt Surg. 1992;**74**(Pt B):195-198.
 14. Woll T, Duwelius P. The segmental tibial fracture. Clin Orthop Relat Res. 1992;**28**:204-207.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
ДУ Ін-т травматології та ортопедії АМН України, Київ;
Східноєвроп. нац. ун-т ім. Лесі Українки, Луцьк
E-mail: mirosh@bigmir.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 04.05.2013*

І.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, О.А. Савченко, Т.М. Фалалєєва, С.А. Суходоля, Т.В. Берегова

Екзокринна функція підшлункової залози у щурів за умов експериментального ожиріння

Вивчали вплив неонатального введення гіперосмолярного хлориду натрію і глутамату натрію на екзокринну функцію підшлункової залози у щурів. Встановлено, що за умов ожиріння спостерігався розвиток гострого панкреатиту. Так, площа поперечного перерізу ацинусів достовірно зменшилася на 12 %, площа поперечного перерізу ядер ациноцитів збільшилася на 10 %, відстань між часточками залози зросла на 48 %. Вміст амілази в сироватці крові збільшився на 43%, амілази панкреатичної – на 68 %, ліпази – на 24 %.

Ключові слова: ожиріння, гіперосмолярний хлорид натрію, глутамат натрію, підшлункова залоза, гострий панкреатит.

ВСТУП

Ожиріння без перебільшення можна назвати епідемією світового масштабу, оскільки кількість осіб як серед дорослого, так і серед дитячого населення, що мають надмірну масу тіла, постійно збільшується [8]. Якщо ця тенденція збережеться, то все населення економічно розвинутих країн до середини наступного сторіччя буде страждати на ожиріння [8]. Насамперед це зумовлено малорухливим способом життя і висококалорійним харчуванням, що призводить до дисбалансу між надходженням та використанням енергії [1]. За даними вчених з університету Північної Кароліни, кількість людей з надлишковою масою тіла перевищує кількість голодуючих. Це стосується як багатих країн, так і тих, що розвиваються. У Сполучених Штатах та інших країнах з 1980 по 2004 р. поширеність ожиріння зросла з 15 до 33 % серед дорослого населення, а надлишкової маси тіла у дітей, що часто в дорослому віці призводить до ожиріння, збільшилась з 6 до 19 % [14, 18]. В Україні 30–40 % населення має зайву масу тіла, серед дітей і підлітків ожиріння становить 11–15 % [2].

Ожиріння є причиною розвитку багатьох захворювань серцево-судинної системи (ар-

теріальна гіпертонія, атеросклероз, ішемічна хвороба серця), інсульту, інсуліннезалежного цукрового діабету, передчасної смерті, захворювання опорно-рухового апарату (остеохондроз хребта та обмінно-дистрофічний поліартрит), хвороби гепатобіліарної системи (дискінезія жовчного міхура, хронічний холецистит, жовчнокам'яна хвороба), пухлини низки локалізацій, зокрема рак легень, молочної залози, тіла матки і яєчника, порушення оваріально-менструального циклу, дисліпідемія у жінок [1, 19]. Ожиріння зменшує тривалість життя на 3–5, а інколи на 15 років. Від захворювань, які пов'язані з ожирінням, в світі щорічно помирає 2,5 млн. людей. При схудненні на 10 % ризик розвитку серцево-судинної патології знижується на 9 %, цукрового діабету – на 44%, смертність від онкологічних захворювань, асоційованих з ожирінням – на 40 %, загальна смертність – на 20 % [1].

Ожиріння і метаболічні порушення, які виникають, є одним з етіологічних факторів хвороб підшлункової залози. За останні 30 років відзначено більш ніж двократне зростання частоти панкреатитів. Якщо на початку ХХ сторіччя захворюваність на гострий панкреатит була низькою, то вже на

межі XX–XXI століть за кількістю випадків це захворювання наздогнало гострий апендицит. Незважаючи на досягнуті успіхи в діагностиці та лікуванні панкреатитів, останніми роками відзначено зростання кількості людей із цією патологією, збільшення частоти рецидивів, тривалості загострень, активності клінічних проявів. Значна частина лікарів пов'язує це з порушенням характеру харчування та ожирінням. Механізми взаємозв'язку ожиріння і захворювань підшлункової залози залишаються до кінця незрозумілими і вимагають детального вивчення. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити морфофункціональний стан підшлункової залози щурів за умов експериментального ожиріння.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 40 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

За добу до експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. Щури були розділені на 4 групи. До I контрольної групи ввійшли інтактні 4-місячні щури. Новонародженим щурам дослідних груп на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя підшкірно вводили фізіологічний розчин (8 мкл/г, II група), гіперосмолярний розчин хлориду натрію (8 мкл/г, III група) і глутамат натрію (4 мг/г, IV група) [12]. Через 4 міс у щурів всіх груп

було проаналізовано зміни маси тіла. Після чого тварин декапітували за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, внутрішньоочеревинно), видаляли та зважували вісцеральний жир. Підшлункову залозу видаляли та фіксували у 10%-му нейтральному формаліні впродовж 1–2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчинах етилового спирту в зростаючих концентраціях (70, 80, 90, 96 % – по одній добі у кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год) та хлороформі (1 год), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год при +37 °C) та чистим парафіном (2 год при +56 °C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи підшлункової залози завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікромомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином [7].

Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа у 200 і 1500 разів. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 («Olympus Europe GmbH», Японія).

На знімках, отриманих зі збільшенням у 1500 разів, вимірювали площу поперечного перерізу ядер ендокринних і екзокринних клітин підшлункової залози, площу поперечного перерізу екзокринних клітин і відстань між часточками залози за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool, яке було розроблено у Техаському державному університеті (Сан-Антоніо, 1995–2002 р.). У сироватці крові визначали вміст амілази, панкреатичної амілази та ліпази стандартними біохімічними методами [9].

Наші результати згідно з тестом Шапіро–Вілкса були розподілені нормально і представлені у вигляді $M \pm m$. Статистичне порівняння між групами проводили з використанням критерію t Стьюдента для незв'язаних вибірок. Статистична значимість була встановлена на рівні $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У інтактних щурів І і тварин ІІ групи (фізіологічний розчин) підшлункова залоза мала типову будову. Ациноси її екзокринної частини були нормальної будови, ациноцити мали конічну форму та виражену полярність – апікальну (зимогенну) та базальну (гомогенну) зони. У базальній частині ациноцитів розміщені ядра з чітко окресленими ядер-

цями (рис. 1). Площа поперечного перерізу ациносів становила $1273,0 \pm 62,7 \text{ мкм}^2$, ядер ациноцитів – $19,8 \pm 0,3 \text{ мкм}^2$, а відстань між часточками підшлункової залози у щурів контрольної групи – $2,7 \pm 0,1 \text{ мкм}$ (рис. 2).

Вміст ферментів (амілаза, панкреатична амілаза, ліпаза), що характеризують стан підшлункової залози, був в межах норми (таблиця). Значущих змін маси тіла та вісцерального жиру не спостерігалось.

Вміст ферментів (ум.од./л) у сироватці крові щурів з експериментальним ожирінням (М±m)

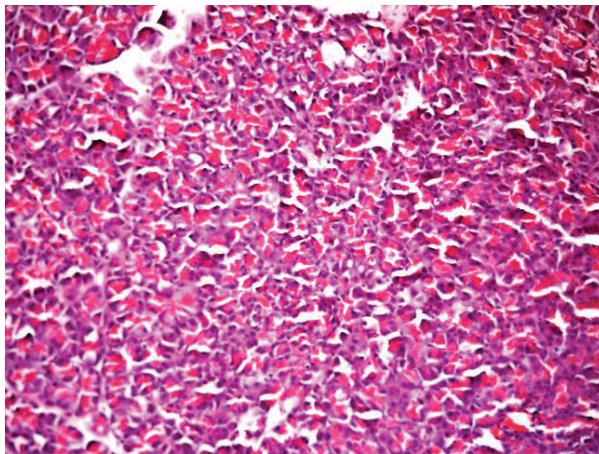
| Групи тварин | Амілаза | Панкреатична амілаза | Ліпаза |
|---------------------------------------|--------------|----------------------|-------------|
| Інтактний контроль | 61±4,80 | 22±1,51 | 17±1,53 |
| Фізіологічний розчин | 60±4,80 | 23±1,45 | 17±1,91 |
| Гіперосмолярний розчин хлориду натрію | 86±6,88* | 37±1,29* | 21±1,91* |
| Глутамат натрію | 115±9,20*,** | 59±6,67*,** | 70±5,60*,** |

*P<0,05 щодо контролю, **P<0,05 щодо гіперосмолярного розчину хлориду натрію.

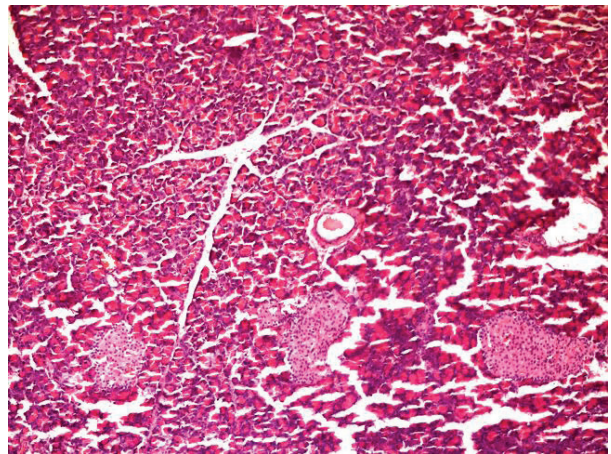
У щурів, що отримували гіперосмолярний розчин хлориду натрію (ІІІ група), маса тіла та вісцерального жиру перевищувала контрольні показники на 85 і 151 % (P<0,01) відповідно (рис. 3).

У підшлунковій залозі спостерігався виражений міжчасточковий набряк (рис. 4,а), міжчасточковий і периваскулярний ліпоматоз. Виявлені ділянки з лімфоїдно-клітинною ін-

фільтрацією та з вогнищевим некрозом паренхіми (див. рис. 4,б). Площа поперечного перерізу ациносів була знижена на 12 % (P<0,05), а ядер ациноцитів збільшена на 10 % (P<0,05), відстань між часточками залози – на 48 % (P<0,05) щодо контролю (див. рис. 2). Вміст ферментів у сироватці крові був збільшений: амілази на 43 %, амілази панкреатичної – 68 % і ліпази – на 24 % (P<0,05; див. таблицю).



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії підшлункової залози щурів – нормальна гістологічна будова екзокринної паренхіми: а – інтактний контроль, б – фізіологічний розчин. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Зб. х200

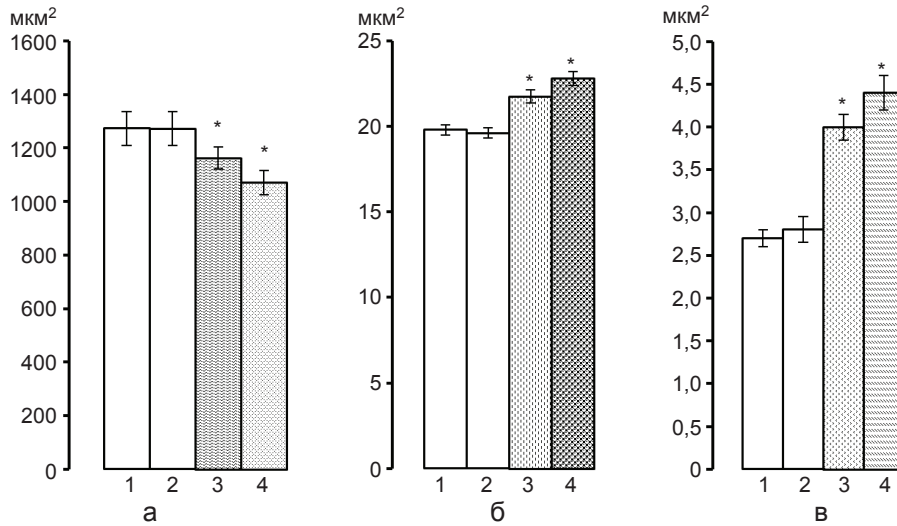


Рис. 2. Морфометричні показники підшлункової залози (а – площа поперечного перерізу ацинусів, б – площа поперечного перерізу ядер ациноцитів, в – міжчасточкова відстань): 1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин; 3 – гіперосмолярний розчин хлориду натрію; 4 – глутамат натрію. *P<0,05 щодо контролю

Отже, у щурів, що отримували гіперосмолярний розчин хлориду натрію в неонатальному періоді, екзокринна (зовнішньосекреторна, або екскреторна) функція підшлункової залози була порушена, що проявлялося у збільшенні концентрації ферментів (амілази та ліпази) в крові, яке спостерігається при гострому панкреатиті [6]. Таким чином, розвивалось ожиріння у дорослому віці, маса тіла щурів та маса вісцерального жиру перевищувала контрольні значення в 1,9 та 2,4

раза відповідно. Ін'єкції з гіперосмолярним розчином новонародженим щурам порушували систему регуляції водно-сольового балансу. Показано, що підвищене вживання харчової солі призводить до зростання концентрації натрію в плазмі крові, внаслідок чого стимулюється спрага, збільшуючи тим самим споживання рідини. Це призводить до збільшення об'єму циркулюючої крові [3, 5, 11]. Дійсно, щури, яким вводили гіперосмолярний розчин хлориду натрію, споживали

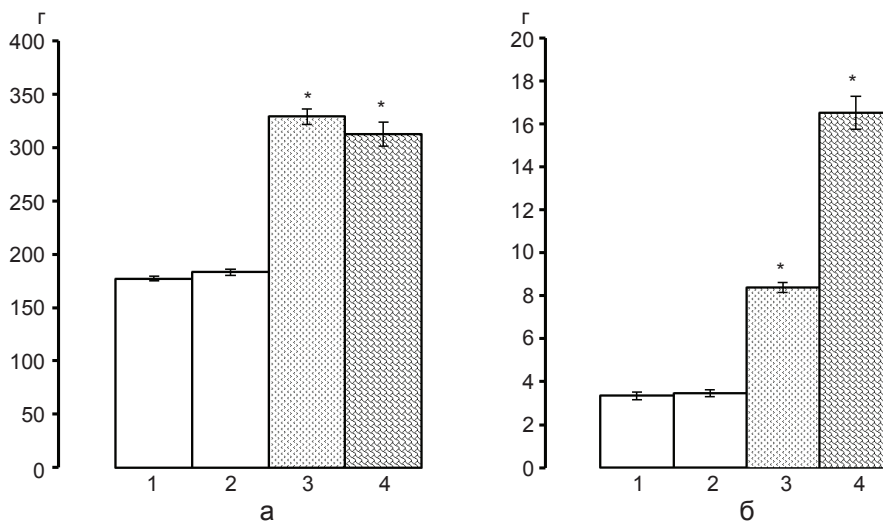


Рис. 3. Зміни маси тіла (а) та вісцерального жиру (б) у щурів за умов експериментального ожиріння: 1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин; 3 – гіперосмолярний розчин хлориду натрію; 4 – глутамат натрію. *P<0,01 щодо контролю

воду значно більше, ніж у інших досліджуваних групах.

За даними літератури, іони натрію подразнюють супраоптичні ядра переднього відділу гіпоталамуса, що призводить до підвищеного синтезу вазопресину, котрий по аксонам їхніх нейронів транспортується через задній відділ гіпоталамуса у задні частки гіпофіза, а з нього в кров'яне русло. Кровотоком А вазопресин (аргініновий) заноситься в збіральні трубочки нирок і за допомогою V_2 -рецепторів відкриває в їх стінці аквапорини, через які вода переходить у міжклітинний простір й далі в кров. Це призводить до накопичення її в організмі, розвитку набряків і зростання маси тіла щурів [4].

Коли підвищена концентрація виділеного вазопресину потрапляє в латеральні ядра гіпоталамуса (центр голоду) внаслідок їх стимуляції розвивається прожерливість (гіперфагія), якщо у вентромедіальні ядра (центр насичення) і пригнічує їх – до безперервного вживання їжі та ожиріння.

Надмірне вживання харчової солі призводить до накопичення Na^+ в організмі, які викликають деполяризацію зовнішньосекреторних клітин підшлункової залози [5], в результаті чого їх синтетична функція зростає (про це свідчить збільшення концентрації її

ферментів – амілази і ліпази крові). В процесі наростаючого ожиріння, завдяки зворотному негативному зв'язку, накопичуваний жир самостійно стимулює синтез цих ферментів.

L-вазопресин (лізиновий) через V_1 -рецептори деполяризує гладенькі м'язи судин. Вони, скорочуючись, викликають тривале звуження судинного русла, що призводить до погіршення кровопостачання підшлункової залози та її секреторних клітин. Тривале звуження судин, дефіцит кисню і поживних речовин у тканинах викликають значні метаболічні та структурні зміни в залозі, які за допомогою зворотного зв'язку спричиняють посилене утворення клітинами залози місцевих судинорозширювальних речовин. Висловлюється думка, що місцеві вазодилататори дифундують до прекапілярних сфінктерів, метаартеріол і артеріол і викликають їх значне тривале розширення (що спостерігалось у наших дослідженнях). До таких судинорозширювальних речовин відносяться: гістамін, аденозин, вуглекислий газ, іони калію і водню. Тобто розвиток значних структурних змін тканин підшлункової залози проявляється її дисфункцією, подібною до клінічних форм гострого панкреатиту.

У щурів, що отримували глютамат натрію (IV група), маса тіла та вісцерального жиру

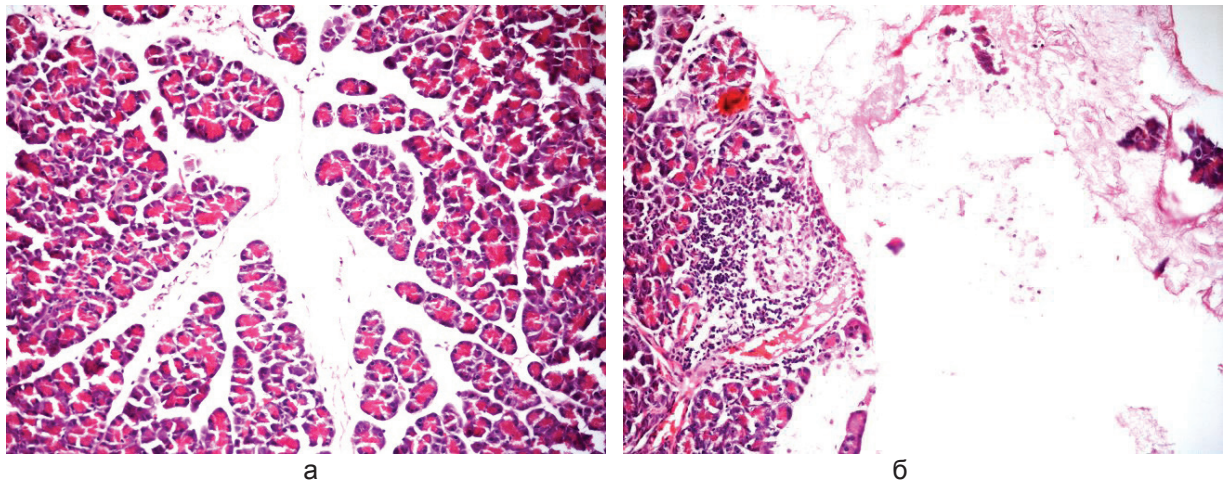


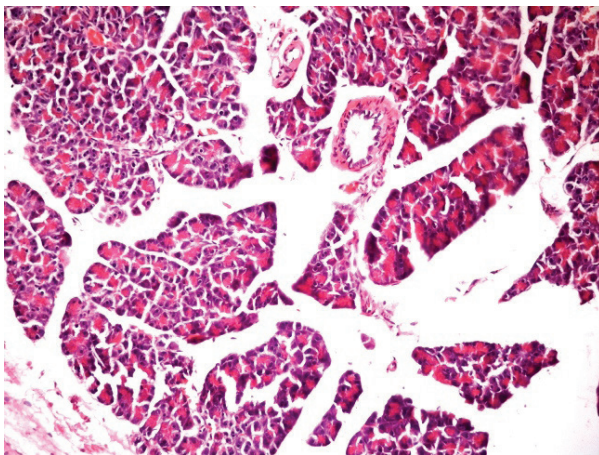
Рис. 4. Мікрофотографії підшлункової залози III групи щурів – міжчасточковий набряк (а), ділянка некрозу паренхіми, лімфоїдно-клітинна інфільтрація (б). Забарвлення гематоксиліном-еозином. 36. x200

перевищувала контрольні значення на 76 і 395 % ($P < 0,001$) відповідно. Статистичної різниці між значеннями маси тіла в III та IV групах не було, проте маса вісцерального жиру, в групі щурів, що отримували в неонатальному періоді глутамат натрію, була в 2 рази більше, ніж у тварин, які отримували хлорид натрію та в 5 разів порівняно з контролем (див. рис. 3). У підшлунковій залозі цієї групи спостерігався виражений міжчасточковий набряк (рис. 5,а), міжчасточковий та периваскулярний ліпоматоз (див. рис. 5,б). Судини були різко розширені, спостерігалося повнокров'я, утворювались екстравазати. Площа поперечного перерізу ацинусів у порівнянні з інтактним контролем була знижена на 16 % ($P < 0,05$). Площа поперечного перерізу ядер ациноцитів була збільшена на 15 %, відстань між часточками підшлункової залози – на 63 % ($P < 0,05$) щодо контролю. Статистичної різниці у морфометричних показниках між III і IV групами щурів не було.

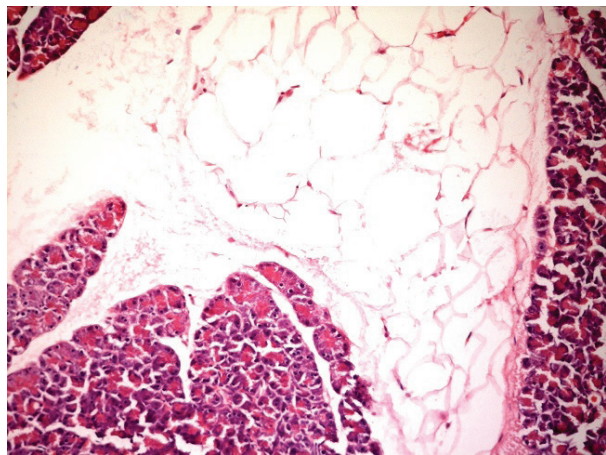
Концентрація ферментів у сироватці крові в IV групі щурів була збільшена у порівнянні з контрольною групою, а саме амілази – на 92 % ($P < 0,001$), амілази панкреатичної – на 168 % ($P < 0,001$) та ліпази – на 312 % ($P < 0,001$), що в 1,3, 1,6 та в 3,3 рази відповідно більше, ніж в III групі (див. таблицю).

Отримані результати підтверджують дані інших дослідників, які встановили, що введення новонародженим гризунам глутамату натрію індукує розвиток вісцерального ожиріння у дорослих тварин та є моделлю ожиріння [15], а також викликає ураження в дугоподібному та вентромедіальному ядрах гіпоталамуса, які стають менш чутливими до лептину та інсуліну (гормонів насичення), в результаті чого розвивається гіперлептинемія та гіперінсулінемія [13]. Водночас він суттєво стимулює секрецію шлунковими залозами греліну, який накопичується в гіпоталамусі та стимулює центри голоду, що призводить до посилення апетиту.

Зміни структури і функції підшлункової залози розвиваються при глутамат-натрієвому ожирінні і є більш вираженими, ніж при введенні гіперосмолярного розчину хлориду натрію. Натрієва сіль глутамінової кислоти є класичним орексигеном (збільшує вживання їжі та її засвоєння). Механізм її дії пов'язаний насамперед з дугоподібними ядрами гіпоталамуса, нейрони яких синтезують орексигенні речовини – нейропептид Y (NPY – нейрони) і меланінопосередковий білок (AGRP – нейрони). Підвищення їх концентрації в організмі різко посилює засвоєння їжі, знижує витрати енергії, призводить до вираженого ожиріння.



а



б

Рис. 5. Мікрофотографії підшлункової залози IV групи щурів – міжчасточковий набряк (а), виражений міжчасточковий ліпоматоз (б). Забарвлення гематоксиліном-еозином. Зб. x200

Важливу роль у механізмах ожиріння відіграє гастроінтестинальний гормон грелін, який виділяється парієтальними клітинами шлунка, слизовою оболонкою ясен і парадонта та в значно меншій кількості кишками. Вміст греліну в крові підвищується натщесерце перед і в перші хвилини після вживання їжі. Це дало можливість трактувати його як гормон апетиту, стимулятор вживання і засвоєння їжі [13].

Таким чином, неонатальне введення гіперосмолярного розчину хлориду натрію і глутамату натрію призводило до ожиріння в дорослому віці та розвитку гострого панкреатиту, що підтверджувалося зміною морфометричних показників підшлункової залози та зростанням концентрації її ферментів у сироватці крові.

И.В. Лещенко, В.Г. Шевчук, А.А. Савченко, Т.М. Фалалеева, С.А. Суходоля, Т.В. Береговая

ЭКЗОКРИННАЯ ФУНКЦИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ

Изучали влияние неонатального введения гиперосмолярного хлорида натрия и глутамата натрия на экзокринную функцию поджелудочной железы у крыс. Установлено, что при ожирении наблюдалось развитие острого панкреатита. Так, площадь поперечного сечения ацинусов уменьшилась на 12 %, площадь поперечного сечения ядер ациноцитов увеличилась на 10 %, расстояние между дольками железы выросла на 48 %. Содержание амилазы увеличилось на 43 %, амилазы панкреатической – на 68 %, липазы – на 24 %. Ключевые слова: ожирение, гиперосмолярный хлорид натрия, глутамат натрия, поджелудочная железа, острый панкреатит.

I.V. Leschenko, V.G. Shevchuk, O.A. Savchenyuk, T.M. Falalyeyeva, S.A. Suhodolya, T.V. Beregova

EXOCRINE FUNCTION OF PANCREAS IN RATS UNDER EXPERIMENTAL OBESITY

The influence of neonatal administration of hyperosmolar sodium chloride and sodium glutamate on the exocrine function of the pancreas in rats has been investigated. It was observed the development of acute pancreatitis under experimental obesity. The cross-section area of acini reduced by 12 %, the cross-section area of acinocytes nuclei increased by 10 %, the length between the lobes of the gland

has grown by 48 %. The level of amylase was increased by 43 %, the levels of pancreatic amylase and lipase were increased by 68 % and 24 %, respectively.

Key words: obesity, hyperosmolar sodium chloride, monosodium glutamate, pancreas, acute pancreatitis.

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv, Ukraine;

Taras Shevchenko National University, Kyiv;

M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa.

REFERENCES

- Ginsburg MM. Obesity and metabolic syndrome. Impact on health, prevention and treatment. Samara: Parus; 2000.
- Girina OM, Gromovich AV. [The prevalence of obesity as a risk factor for somatic pathology among adolescents]. Practitioner. 2012;2:32-35. Russian.
- He FJ, Marrero NM, MacGregor GA. Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: a link to obesity? Hypertension. 2008 Mar;51(3):629-34.
- Karppanen H, Mervaala E. Sodium intake and hypertension. Prog Cardiovasc Dis. 2006 Sep-Oct;49(2):59-75.
- Kuo JJ, Silva AA, Hall JE. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. Hypertension. 2003 Mar;41(3 Pt 2):768-74.
- Leshchenko IV, Shevchuk VH, Falalieieva TM, Beregova TV. [The influence of long-term monosodium glutamate feeding on the structure of rats pancreas]. Fiziol Zh.58(2):59-65. Ukr.
- Lilly R. Histopathological technique and practical histochemistry. K.: Mir; 1969.
- Livingstone B. Epidemiology of childhood obesity in Europe. Eur J Pediatr. 2000 Sep;159 Suppl 1:S14-34.
- Lowe ME. Assays for pancreatic triglyceride lipase and colipase. Methods Mol Biol. 1999;109:59-70.
- Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Suazo-Barahona J, Robles-Diaz G, Perez-Mateo M. Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis. Pancreatol. 2004;4(1):42-8.
- McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. News Physiol Sci. 2004 Feb;19:1-6.
- Miskowiak B, Partyka M. Effects of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on hypothalamo-pituitary-thyroid axis in adult male rats. Histol Histopathol. 1993 Oct;8(4):731-4.
- Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. Exp Anim. 2000 Oct;49(4):239-49.
- Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM. Epidemiologic trends in overweight and obesity. Endocrinol Metab Clin North Am. 2003 Dec;32(4):741-60, vii.
- Oida K, Nakai T, Hayashi T, Miyabo S, Takeda R. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats.

- Int J Obes. 1984;8(5):385-91.
16. Porter KA, Banks PA. Obesity as a predictor of severity in acute pancreatitis. Int J Pancreatol. 1991 Nov-Dec;10(3-4):247-52.
17. Segersvard R, Sylvan M, Herrington M, Larsson J, Permert J. Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat. Scand J Gastroenterol. 2001 Jun;36(6):658-63.
18. Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. Prev Med. 1993 Mar;22(2):167-77.
19. Yang W., Kelly T., He J. Genetic Epidemiology of Obesity. Epidemiol Rev. 2007(29): 49-61.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Вінницьк. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова
E-mail: falalyeyeva@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 24.10.2013*

О.І. Савчук, В.С. Мельник, С.В. Гончаров, В. Ю. Шандюк, Д.О. Строй,
В.Є. Досенко, Л.І. Соколова, Г.Г. Скибо

Частота алельного поліморфізму генів субодиноць конституційної та імунної протеасом у хворих на ішемічний інсульт

Представлені результати визначення частоти алельного поліморфізму генів, що кодують великі мультифункціональні протеази LMP2 (Arg₆₀→His-поліморфізм) та α6-субодиноцю кіркової частини протеасоми (C⁸→G-поліморфізм), у хворих на ішемічний інсульт, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Алельні варіанти генів PSMA6 розподілилися наступним чином: C/C – 80,2 %, C/G – 19,8 %, G/G – не зареєстровано (в контрольній групі) та C/C – 75,5 %, C/G – 21,4 %, G/G – 3,1 % у хворих (P=0,22). Встановлено, що частота алельних варіантів генів LMP2 була такою: Arg/Arg 53,3 %, Arg/His – 43,5 %, His/His – 6,7 % в контрольній групі, а у хворих – Arg/Arg – 55,9 %, Arg/His – 34,3 %, His/His – 9,8 % (P > 0,05). Отримані результати свідчать про те, що поліморфізми генів LMP2 та PSMA6 не впливають на ймовірність виникнення ішемічного інсульту в українській популяції.

Ключові слова: протеасома, поліморфізм поодиноких нуклеотидів, ішемічний інсульт.

ВСТУП

Ішемічний інсульт є однією з найважливіших причин інвалідизації та смертності населення у розвинених країнах [10, 14]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно від цього захворювання помирає близько 5 млн людей (1 випадок на 1000 населення) [8]. Інсульт є мультифакторним полігенним захворюванням, що спричинюється взаємодією негативних факторів навколишнього середовища та генетичних варіацій. Численні епідеміологічні обстеження сімей, особливо з близнюками, вказують на наявність факторів, які зумовлюють схильність до розвитку інсульту в поєднанні з іншими факторами ризику [10]. Атеросклероз розглядається як одна з причин розвитку інсульту, так само як і інших серцево-судинних захворювань [12]. У патогенезі останнього активно вивчається роль протеасомного протеолізу [7–9]. Протеасома є основним

нелізосомним мультикаталітичним протеазним комплексом, залученим у деградацію більшості внутрішньоклітинних білків і має велике значення при апоптозі, клітинному циклі, проліферації, диференціації та імунній відповіді [17].

Показано, що протеасомне розщеплення внутрішньоклітинних білків відіграє значну роль у регуляції обміну ліпопротеїдів, експресії молекул клітинної адгезії, апоптозі гладеньком'язових та ендотеліальних клітин, тобто в процесах, що мають принципове значення в атерогенезі [2]. З іншого боку, визначено алельні варіанти генів, що кодують субодиноці протеасоми, а також проводяться дослідження, спрямовані на вивчення асоціації між генетичними варіаціями та ймовірністю розвитку багатьох серцево-судинних захворювань, зокрема ішемічного інсульту [15]. Так виявлено наявність цілої низки SNP (від англ. single nucleotide polymorphism) у гені, що кодує α6-субодиноцю протеасоми

© О.І. Савчук, В.С. Мельник, С.В. Гончаров, В. Ю. Шандюк, Д.О. Строй, В.Є. Досенко, Л.І. Соколова, Г.Г. Скибо

(PSMA6), а один з найбільш розповсюджених у популяції ген (C⁻⁸→G, rs1048990) частіше зустрічається у хворих на інфаркт міокарда та збільшує транскрипційну його активність [12].

При дослідженні розподілу варіантів SNP PSMA6 у популяціях західної Європи та Японії, виявили низьку частоту виникнення генотипу гомозигот за мінорним алелем гена PSMA6 у хворих з інфарктом міокарда (1–2 та 3–8 % відповідно).

Показано, що у хворих на цукровий діабет з інфарктом міокарда більш часто зустрічається G-алель порівнянно з контролем, при цьому достовірно збільшується частота G-алеля PSMA6 у хворих на цукровий діабет з інфарктом міокарда в порівнянні з такими без інфаркту [1, 4, 5, 13].

Японські дослідники Suita та Takashima [16] показали, що C⁻⁸→G SNP достовірно асоціюється зі щільністю каротидної артерії, припускаючи що це відіграє значну роль у патогенезі атеросклерозу. При цьому Bennett та співавт. [2] встановили протилежне, досліджуючи алельний поліморфізм гена PSMA6, вони виявили, що тютюнопаління, артеріальна гіпертензія чи цукровий діабет не впливають на виникнення інфаркту міокарда.

Не меншу увагу привертають поліморфізми в субодиницях імунопротеасоми – мультикаталітичного комплексу, що утворюється при дії на клітини прозапальних цитокінів (насамперед, γ -інтерферону), а також експресується постійно в деяких органах, у тому числі в головному мозку. Glenn Y. Deng та співавт. [5] встановлено залежність між цукровим діабетом та поліморфізмом гена, що кодує субодиницю імунопротеасоми LMP2 (Arg₆₀→His). Нами встановлено, що частота розподілу цього алельного поліморфізму та варіанту α 6-субодиниці протеасоми (C⁻⁸→G) відрізняє хворих на первинну артеріальну гіпертензію [6].

Мета нашої роботи – дослідити частоту алельних варіантів генів PSMA6 та LMP2, що кодують субодиниці протеасоми, у хворих на

ішемічний інсульт в українській популяції та провести аналіз впливу вказаних поліморфізмів на клінічні показники.

МЕТОДИКА

Обстежено 102 пацієнти (дослідна група) з гострим ішемічним інсультом – 54 (52,9 %) чоловіків та 48 (47,1 %) жінок, середній вік яких на момент розвитку інфаркту мозку становив 70,4±9,9 роки. Вогнище інфаркту локалізувалося: в басейні лівої передньої мозкової артерії – у 1 (1 %) хворого; в басейні лівої середньої мозкової артерії – у 47 (46,1 %) хворих; в басейні правої середньої мозкової артерії – у 37 (36,3 %) хворих; у вертебрально-базиллярному басейні – у 17 (16,6 %). Двадцять хворих в анамнезі вже перенесли ішемічний інсульт – 14 (13,7%) в тому ж басейні та 6 (5,9%) в іншому судинному басейні.

Вихідний рівень неврологічного дефіциту в середньому становив 12,0±2,1 бала: у 43 (42,2 %) хворих порушення були тяжкими (13,8±0,7 бала), у 46 (45,1 %) — середньої тяжкості (11,5±1,5 бала), у 13 (12,8 %) — легкими (7,8±0,4 бала).

Контрольна група складалася з 92 осіб, середній вік яких становив 71,3±10,2 роки, що за основними показниками та факторами ризику інсульту не відрізнялися від пацієнтів із гострими порушеннями мозкового кровообігу (транзиторними ішемічними атаками, ішемічного або геморагічного інсульту) в анамнезі.

Гендерне співвідношення контрольної групи становило 45 чоловіків (48,9 %) та 47 (51,1 %) жінок, а в дослідній групі – 54 (52,9 %) чоловіків та 48 (47,1 %) жінок. Гіпертонічна хвороба була виявлена у 77 осіб контрольної групи та у 84 осіб із гострими порушеннями мозкового кровообігу. Миготливу аритмію було діагностовано у 24 людей контрольної групи та у 25 людей дослідної групи. У 11 осіб контрольної групи було виявлено інфаркт міокарда в анамнезі, у 24

– цукровий діабет. У пацієнтів із гострими порушеннями мозкового кровообігу інфаркт міокарда був зареєстрований у 12, а цукровий діабет у 19 осіб.

Матеріалом дослідження була венозна кров хворих на ішемічний інсульт, що проходили лікування у 1-му та 2-му неврологічному відділенні Київської міської лікарні №4. Венозну кров забирали в стерильних умовах у моновети об’ємом 2,7 мл з кальцієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта (“Sarstedt”, Німеччина).

ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів (“NucleoSpin®Blood”, США) згідно з рекомендаціями виробника.

Алельний поліморфізм генів PSMA6 (C⁻⁸→G; rs1048990) та LMP2 (Arg₆₀→His; rs17587) визначали із застосуванням методики полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Для ампліфікації ділянки зазначеного гена застосовували пару специфічних праймерів: прямий (forward) – PSMB9_F 5’-TGAACCGAGTGTTTGACAAGCT-3’ і зворотний (reverse) – PSMB9_R 5’-CAGCAGCTGAAC-CAGAGAGT-3’, а також флуоресцентні зонди до мажорного та мінорного алеля (PSMB9_V

VIC 5’-ACGAGCGCATCTAC-3’, PSMB9_M FAM 5’-CACGAGCACATCTAC-3’). Для ампліфікації брали 0,5 мкл ДНК і додавали до суміші, що містила 10 мкл 2-кратного TaqMan PCR Master Mix, 0,5 мкл 40-кратної суміші специфічних праймерів і зондів, об’єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою.

Алельний поліморфізм гена PSMA6 (C⁻⁸→G) (rs 1048990) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_11599359_10 та 7500 Fast Real Time PCR System (“Applied Biosystems”, США) [13]. Для ампліфікації брали 0,5 мкл ДНК і додавали до суміші, що містила 10 мкл 2-кратного TaqMan PCR Master Mix, 0,5 мкл 40-кратного TaqMan® SNP Assay C_11599359_10, об’єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації складалася з 50 циклів (денатурація – 92 °C, 15 с, гібридизація та елонгація – 60 °C, 1 хв), після чого проводили аналіз з дискримінації алелей (рис. 1, 2).

Статистичний аналіз проведено за допомогою програмного пакета SPSS версія 20.0, а також за законом Харді–Вайнберга для розподілу генів у популяції. Для створення прогностичної моделі ризику виникнення інсульту була використана бінарна логістична

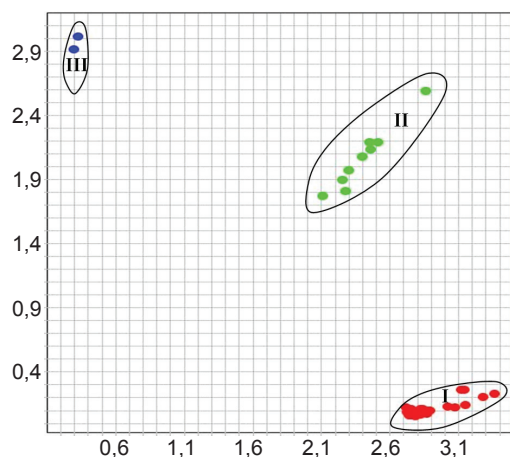


Рис. 1. Результати дискримінаційного аналізу алелей гена PSMA6 (C⁻⁸→G) із застосуванням 7500 Fast Real-time PCR System між людьми контрольної групи та хворими на ішемічний інсульт: I – гомозиготи C/C, II – гетерозиготи C/G, III – гомозиготи G/G

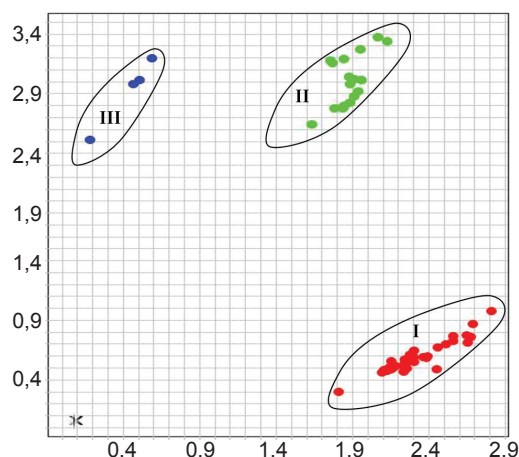


Рис. 2. Результати дискримінаційного аналізу алелей гена LMP2 (Arg₆₀→His) із застосуванням 7500 Fast Real Time PCR між здоровими людьми контрольної групи та хворими на ішемічний інсульт: I – гомозиготи Arg/Arg, II – гетерозиготи Arg/His, III – гомозиготи His/His

регресія. Предиктори були такі: 2 поліморфізми (PSMA6 та LMP2), стать і вік. При проведенні обробки результатів нам не вдалося виявити статистично-значимих предикторів ($P > 0,05$), які б дали змогу з певною ймовірністю прогнозувати ризик розвитку інсульту.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті генотипування було встановлено, що частота різних алельних варіантів гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$) у пацієнтів з ішемічним інсультом була такою: C/C – 75,5 %, C/G – 21,4 %, G/G – 3,1 %, що достовірно не відрізнялося від контролю: C/C – 80,2 %, C/G – 19,8 %, G/G – не зареєстровано ($P=0,22$ за критерієм χ^2 ; рис. 3.).

При генотипуванні встановлено, що частота різних алельних варіантів субодиноці імунпротеасоми LMP2 у хворих достовірно відрізнялася від пацієнтів без інсульту та була наступною: Arg/Arg – 55,9 %, Arg/His – 34,3 %, His/His – 9,8 %, а у контролі: Arg/Arg – 53,3 %, Arg/His – 43,5 %, His/His – 6,7 % ($P > 0,05$; див. рис. 3).

Ми проаналізували вік, в якому розвинувся ішемічний інсульт у хворих з різними алельними варіантами субодиноць гена LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) та PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$). Встановлено, що середній вік хворих з мажорним гомозиготним алельним варіантом (Arg/Arg)

становив $69,4 \pm 10,8$ роки, алельним варіантом (Arg/His) – $73,9 \pm 7,7$ роки та мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) – $63,3 \pm 6,5$ роки. Таким чином, було встановлено, що у пацієнтів-гомозигот за мінорним алельним варіантом гена LMP2 ішемічний інсульт розвинувся в середньому на 10,6 років раніше порівняно з гетерозиготним варіантом (Arg/His) та на 6,1 роки раніше порівняно з хворими з мажорним гомозиготним варіантом (Arg/Arg). Подібну, однак дещо менш виражену, тенденцію виявлено і при аналізі впливу алельного поліморфізму субодиноці гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$): середній вік хворих з мажорним гомозиготним алельним варіантом (C/C) становив $70,3 \pm 10,3$ роки, гетерозиготним – (C/G) – $71,7 \pm 9,5$ роки та мінорним гомозиготним – (G/G) – $66,0 \pm 9,5$ роки ($P > 0,05$). У хворих з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиноці гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виник в середньому на 5,7 роки раніше порівняно з пацієнтами з гетерозиготним варіантом (C/G) та в середньому на 4,3 роки раніше порівняно з особами з мажорним гомозиготним алельним поліморфізмом (C/C; $P > 0,05$).

Також ми проаналізували поширеність цукрового діабету, миготливої аритмії, перенесеного в минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту серед пацієнтів з різними алельними варіантами субодиноць гена LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) та гена PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$; таблиця).

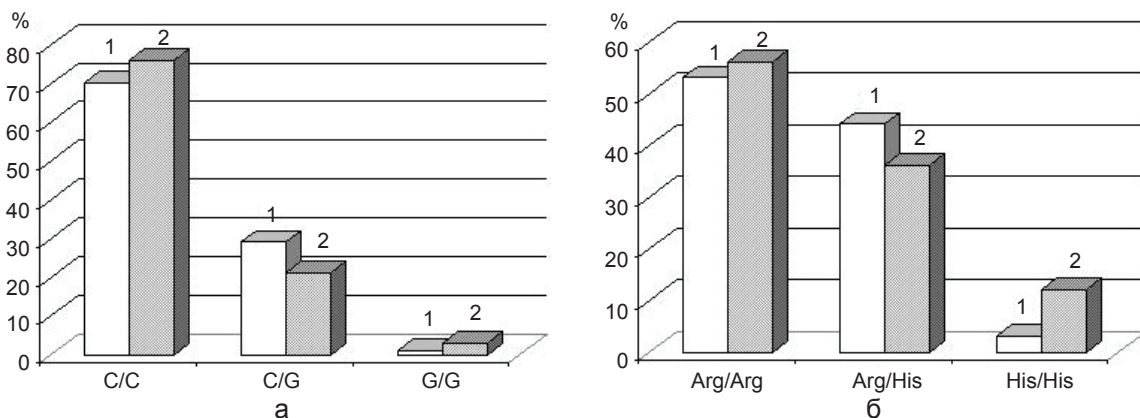


Рис. 3. Частота алельних варіантів субодиноці гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$) (а), імунпротеасоми LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) (б) серед осіб контрольної (1) та хворих дослідної груп (2)

При порівнянні частоти вищезгаданих факторів ризику у хворих з різними варіантами субодиноць гена PSMA6 (C⁻⁸→G) встановлено, що у пацієнтів з мінорним варіантом генотипу поширеність перенесених у минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту, хоча й не сягали достовірної різниці, були більш розповсюдженими порівняно з гетерозиготним і мажорним гомозиготним варіантом субодиноць гена PSMA6: інфаркт міокарда в анамнезі зареєстровано у 1 з 3 хворих (P=0,098), а перенесений в минулому ішемічний інсульт у 2 з 3 хворих (P=0,056). Поширеність цукрового діабету та миготливої аритмії достовірно не відрізнялися (див. таблицю).

У результаті проведеного порівняння нами встановлено, що поширеність цукрового діабету серед хворих на гострий ішемічний інсульт з різними алельними варіантами субодиноць гена LMP2 (Arg₆₀→His) достовірно відрізнялась (P=0,032): найбільш поширеним цукровий діабет був серед пацієнтів з гетерозиготним варіантом (Arg/His) – зареєстрований у 11 (31,4 %) з 36 хворих. Поширеність миготливої аритмії, перенесених в минулому

інфаркту міокарда та ішемічного інсульту достовірно не відрізнялась у пацієнтів з різними варіантами субодиноць гена LMP2 (див. таблицю).

Таким чином, встановлено, що частота різних алельних варіантів гена субодиноць протеасоми PSMA6 та імунопротеасоми LMP2 у хворих на ішемічний інсульт достовірно не відрізнялася від пацієнтів без інсульту. Нами виявлено, що у пацієнтів з мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) гена субодиноць імунопротеасоми LMP2 та у осіб з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиноць гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виникає в значно молодшому віці порівняно з пацієнтами з гетерозиготним і мажорним гомозиготним поліморфізмом; цукровий діабет був серед пацієнтів з гетерозиготним варіантом (Arg/His).

Подальші дослідження, можливо, вкажуть як поліморфізми впливають на ризик розвитку артеріальної гіпертензії та інфаркту міокарда, але не пов'язані з ішемічним інсультом.

Поширеність цукрового діабету, фібриляції передсердь, перенесеного в минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту серед пацієнтів з різними алельними варіантами субодиноць гена PSMA6 (C⁻⁸→G) та LMP2 (Arg₆₀→His)

| Генотипи | Цукровий діабет | Без цукрового діабету | Фібриляція передсердь | Без фібриляції передсердь | Інфаркт міокарда в анамнезі | Без інфаркту міокарда в анамнезі | Ішемічний інсульт в анамнезі | Без ішемічного інсульту в анамнезі |
|----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Arg/Arg | 8 (14,0%)* | 49 (86%) | 11 (19,3%) | 46 (80,7%) | 4 (7%) | 53 (93%) | 12 (21,1%) | 45 (78,9%) |
| Arg/His | 11 (31,4%)* | 24 (68,6%) | 11 (31,4%) | 24 (68,6%) | 7 (20%) | 28 (80%) | 8 (22,9%) | 27 (77,1%) |
| His/His | - | 10 (100%) | 3 (30%) | 7 (70%) | 1 (10%) | 9 (90%) | - | 10 (100%) |
| C/C | 14 (18,9%) | 60 (81,1%) | 19 (25,7%) | 55 (74,3%) | 11 (14,9%) | 63 (85,1%) | 16 (21,6%)* | 58 (78,4%) |
| C/G | 4 (19%) | 17 (81%) | 6 (28,6%) | 15 (71,4%) | - | 21 (100%) | 2 (9,5%)* | 19 (90,5%) |
| G/G | - | 3 (100%) | - | 3 (100%) | 1 (33,3%) | 2 (66,7%) | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) |

* P<0,05.

**Е.И. Савчук, В.С. Мельник, С.В. Гончаров,
В. Ю. Шандюк, Д.А. Строй, В.Е. Досенко,
Л.И. Соколова, Г.Г Скибо**

**ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ
ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ КОНСТИТУЦИОН-
НОЙ И ИМУННОЙ ПРОТЕАСОМ У БОЛЬ-
НЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ**

Представлены результаты определения частоты аллельного полиморфизма генов, кодирующих большие мультифункциональные протеазы LMP2 (Arg₆₀→His-полиморфизм) и αβ-субъединицу корковой части протеасомы (C⁻⁸→G-полиморфизм), у больных с ишемическим инсультом, используя метод полимеразной ценной реакции в реальном времени. Аллельные варианты гена PSMA6 распределялись следующим образом: C/C – 80,2%, C/G – 19,8%, G/G – не зарегистрировано (в контрольной группе) и C/C – 75,5%, C/G – 21,4%, G/G – 3,1% у больных ишемическим инсультом (P=0,22). Установлено, что частота аллельных вариантов гена LMP2 была следующей: Arg/Arg – 53,3%, Arg/His – 43,5%, His/His – 6,7% в контрольной группе, а у больных ишемическим инсультом – Arg/Arg – 55,9%, Arg/His – 34,3%, His/His – 9,8% (P>0,05). Полученные результаты свидетельствуют о том, что полиморфизмы генов LMP2 и PSMA6 не влияют на вероятность развития ишемического инсульта в украинской популяции. Ключевые слова: протеасома, полиморфизм единичных нуклеотидов, ишемический инсульт.

**O.I. Savchuk, V.S. Melnyk, S.V. Goncharov,
V.Yu. Shandyuk, D.O. Stroi, V.E. Dosenko,
L.I. Sokolova, G.G. Skibo**

**FREQUENCY OF ALLELIC POLYMORPHISM
OF PROTEASOME SUBUNITS PSMA6 AND
LMP2 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC
STROKE**

Frequency of allelic variants of proteasome subunits genes LMP2 (Arg₆₀→His) and PSMA6 were determined in patients with ischemic stroke using real-time PCR. Allelic variants of PSMA6 were disposed in the next manner: C/C – 80,2%, C/G – 19,8%, G/G – were not (in control) and C/C – 75,5%, C/G – 21,4%, G/G – 3,1% (P=0,22) in patients with IS. It was shown that distribution of LMP2 allelic variants was the following: Arg/Arg – 53,3%, Arg/His – 43,5%, His/His – 6,7% in control and Arg/Arg – 55,9%, Arg/His – 34,3%, His/His – 9,8% in IS group (P>0,05). The data show that LMP2 and PSMA6 gene polymorphism is not a risk factor of ischemic stroke in Ukrainian population. Key words: proteasome, single nucleotide polymorphism, ischemic stroke.

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

State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology

REFERENCES

1. Barbieri M, Marfella R, Rizzo MR, Boccardi V, Siniscalchi M, Schiattarella C, Siciliano S, Lemme P, Paolisso G. The 8'UTR C/G polymorphism of PSMA6 gene is associated with susceptibility to myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2008; **201**: 117- 123.
2. Bennett DA, Xu P, Clarke R, Zondervan K, Parish S, Palmer A, Cardon L, Peto R, Lathrop M, Collins R. The exon 1-8C/G SNP in the PSMA6 gene contributes only a small amount to the burden of myocardial infarction in 6946 cases and 2720 controls from a United Kingdom population. *Eur J Hum Genet*. 2008; **16**: 480-486.
3. Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR, Robinette CD. A study of twins and stroke. *Stroke*. 1992; **23**(2): 221-223.
4. Cheng YC, Anderson CD, Bione S, Keene K, Maguire JM, Nalls M, Rasheed A, Zeginigg M, Attia J, Baker R, Barlera S, Biffi A, Bookman E, Brott TG, Brown RD Jr, Chen F, Chen WM, Ciusani E, Cole JW, Cortellini L, Danesh J, Doheny K, Ferrucci L, Grazia Franzosi M, Frossard P, Furie KL, Golledge J, Hankey GJ, Hernandez D, Holliday EG, Hsu FC, Jannes J, Kamal A, Khan MS, Kittner SJ, Koblar SA, Lewis M, Lincz L, Lisa A, Matarin M, Moscato P, Mychaleckyj JC, Parati EA, Parolo S, Pugh E, Rost NS, Schallert M, Schmidt H, Scott RJ, Sturm JW, Yadav S, Zaidi M, Boncoraglio GB, Levi CR, Meschia JF, Rosand J, Sale M, Saleheen D, Schmidt R, Sharma P, Worrall B, Mitchell BD. Are myocardial infarction-associated single-nucleotide polymorphisms associated with ischemic stroke? *Stroke*. 2012; **43**: 980-986.
5. Deng GY, Muir A, Maclaren NK, She JX. Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Amer. J. Hum. Genet*. 1995; **56**: 528-534.
6. Dosenko VE, Mykhalchuk DV, Zagoryi VY, Khaytovych MV, Moibenko AA. Functional significance of allelic polymorphisms of genes encoding the catalytic subunit immunoproteasome. *Fiziol Zh*. 2005; **51**(6): 3-10.
7. Freilinger T, Bevan S, Ripke S, Gschwendtner A, Lichtner P, Müller-Myhsok B, Wichmann HE, Markus HS, Meitinger T, Dichgans M. Genetic variation in the lymphotoxin-alpha pathway and the risk of ischemic stroke in European populations. *Stroke*. 2009; **40**: 970-972.
8. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol*. 2002; **39**(3): 147-164.
9. Goldberg A, Eledzh C, Harper DzhV. Mechanisms of cell death. *The world of science*. 2001; **2**: 32-37.
10. Mishchenko TS. Treatment of stroke: towards full use of the opportunities of the therapeutic window. *Health Protection of Ukraine*. 2009; **1**: 12-15.
11. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA*. 2007; **297**: 1551-1561.

12. Ozaki K, Sato H, Iida A. A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Nat. Genet.* 2006; **38**(8): 921-925.
13. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Executive summary: heart disease and Stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012; **125**: 188-197.
14. Skvortsova VI, Yarygin VN, Yarygin KN, Pirogov AY, Gubskiy LV, Uchevatkin AA, Glushkova TT. Experimental model of focal cerebral ischemia in rats based endovascular microsurgery. *Zh. Neurology and Psychiatry by SS Korsakov.* 2008; **109**(2): 62-69.
15. Sjakste T, Poudziunas I, Ninio E, Perret C, Pirags V, Nicaud V, Lazdins M, Evanss A, Morrison C, Cambien F, Sjakste N. SNPs of PSMA6 gene –investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Genetik.* 2007; **43**: 553-559.
16. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation.* 2004; **109**: 2-10.
17. Zhang W, Meng H, Li ZH, Shu Z, Ma X, Zhang BX. Regulation of STIM1, store-operated Ca²⁺ influx, and nitric oxide generation by retinoic acid in rat mesangial cells. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007; **292**(3): 1054-1064.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України;
Державна ключова лабораторія молекулярної і клі-
тинної біології, Київ
E-mail: floweringbowl@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 23.09.2013*

Б.В. Донської, В.П. Чернишов, В.Ю. Сіренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

Вплив акцентованої гіпо- та гіперактивності НК-лімфоцитів на імплантацію ембріонів

У попередній роботі нами був розроблений та описаний новий метод визначення активності НК-лімфоцитів за експресією маркера активації CD69, внаслідок стимуляції клітинами-мішенями K562 – клітинна лінія еритромієлолейкозу людини. Продемонстровано, що кількість активованих клітин відображає популяційно-функціональний стан НК-клітин периферичної крові. В цьому дослідженні, ми вивчали значення даного показника для фізіологічного перебігу імплантації ембріона у 84 пацієнток, які проходили лікування методом ІВФ (in vitro фертилізації). Слід відмітити, що пацієнти з акцентованими підвищеними або зниженими рівнями НК-активності мають несприятливі умови для настання імплантації (9,1 %, 3/13) і, відповідно, (15,1 %, 5/25) порівняно з пацієнтками з умовно нормальними рівням (52,2 % 25/46). Таким чином, умовно нормальний рівень НК-активності є важливим фізіологічним та одночасно зручним діагностично-прогностичним фактором імунологічної сприйнятливості імплантації ембріона.

Ключові слова: CD69-експресія, імплантація ембріона, НК-лімфоцити, НК-активність, НК-стимуляція.

ВСТУП

Фізіологічна неоднозначність і складність системи НК-лімфоцитів пов'язана з її філогенетичним походженням. У людини вони формують “еволюційний місток” між вродженими та власне імунними механізмами захисту та регуляції гомеостазу організму [28]. НК-клітини є базовий механізм одночасно як природної, так і адаптивної ланки імунної системи [34]. Вони є активними учасниками імунорегуляції, розвитку стовбурових клітин і нейроендокринної взаємодії [22].

Недостатня НК-реактивність часто призводить до розвитку хронічних вірусних процесів [26]. Водночас НК-лімфоцити відіграють критичну, проте не до кінця зрозумілу, роль у таких репродуктивних механізмах, як ембріоімплантація, інвазія трофобласта та перебудова спіральних артерій. Відомо, що підвищення кількості НК [3, 33], їх цитотоксичності [23] та дисбаланс між інгібіторними та активаційними рецепторами на НК-

клітинах [7], призводить до різних порушень репродуктивного процесу [35]. З іншого боку, ця ланка вкрай необхідна для репродукції: було показано, що затримка розвитку плоду пов'язана зі зниженням кількості НК-клітин у децидуальній оболонці [11], їх видалення призводить до аномального формування плаценти [2], недорозвинення спіральних артерій [6] та втрати вагітності [13]. Не дивно, що дослідження ролі імунних механізмів у репродукції фокусуються на саме ролі НК-лімфоцитів [5].

НК-клітини виявляють високу різноманітність в експресії поверхневих маркерів і рецепторів, баланс між сигналами від активаційних та інгібіторних рецепторів формує їх загальну активність [8, 21, 32]. Результат такого регулювання є особливо критичним у разі материнського реагування на плід [17], що відбувається під час спонтанних викиднів [23] та неплідді [20, 25]. Визначення функції НК-лімфоцитів є важливим для діагностики та прогнозування великої кількості захворювань [34].

© Б.В. Донської, В.П. Чернишов, В.Ю. Сіренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

Функціональна активність НК-клітин вимірюється у класичному 4-годинному цитотоксичному тесті проти HLA (від. англ. – human leukocyte antigen) негативної клітинної лінії K562, як клітин-мішеней [29]. Цей метод набув багато модифікацій з використанням радіоактивного Cr^{51} [4] та нерадіоактивних міток (dimethylthiazol-diphenyl bromide, tetrazolium bromide, methylumbelliferyl heptanoate, Alamar blue) [14]; або флуорисцентних міток (europium, D275, rhodamine-123, carboxy-fluorescein diacetate, bis-carboxyethyl-carboxy-fluorescein) [32], а також метод проточної флуориметрії [18, 31].

Треба зауважити, що цитотоксичні методи мають певні обмеження, які пов'язані з використанням як ефекторів виділених мононуклеарних клітин периферичної крові. Таким чином частка НК-клітин і, відповідно, істинне співвідношення ефектор/мішень, а також вплив стеричних перешкод і шанси на зустріч з мішенню залишається невизначеним. Досліджена в такому тесті цитотоксичність НК-клітин є одночасно функцією від власне НК-активності, загальної частки цих клітин та збагаченням зразка мононуклеарів моноцитами. Раніше було показано, що інкубація лімфоцитів з мішенями призводить до появи на НК-клітинах маркера активації CD69 [12, 19, 24]. Нами також було продемонстровано така реакція НК-клітин на інкубацію з лінією K562 [1]. Виявлена кореляція між НК-цитотоксичністю та рівнем експресії CD69 на НК після сумісної інкубації [9]. Це, в свою чергу, дає змогу використання такого підходу у аналізі активності НК-лімфоцитів [10].

Мета нашої роботи – провести дослідження взаємозв'язку активності НК та імплантації ембріона після його перенесення у матку.

МЕТОДИ

Для дослідження були відібрані пацієнтки з непліддям, що проходили лікування методом ІВФ (in vitro фертилізація). Переважна

їх більшість не проходили попереднього лікування за допомогою різних допоміжних репродуктивних технологій і мали здебільшого трубний фактор непліддя. Пацієнтки були соматично здорові, віком до 32 років та не мали акушерських ускладнень у минулому. В дослідження були взяті лише жінки, яким було перенесено у порожнину матки не менше двох власних ембріонів високої якості. У всіх випадках був використаний довгий протокол стимуляції з контрольованою гіперстимуляцією яєчників рекомбінантним фолікулоstimулювальним гормоном. Пацієнтки були проінформовані про участь у дослідженні та дали письмову згоду, згідно з протоколом, рекомендованим Комітетом з медичної етики ІПАГ НАМН України.

Роботу проводили за схемою подвійного сліпого дослідження. Периферичну кров від 84 пацієнток забирали в день переносу ембріонів.

НК-активність визначали згідно з методом, що був описаний раніше [9]. Гепаринізовану кров (100 мкл) інкубували 16 год із клітинами лінії K562 ($2,5 \cdot 10^6$) та 400 мкл живильного середовища RPMI-1640 у CO_2 -інкубаторі при $37^\circ C$ (“Revco”, Швейцарія). Спонтанну активність вимірювали на зразках, що культивувались за відсутності клітин K562. Клітини мітили FITC-, PE- та PE Cy5 моноклональними антитілами до CD69, CD56 та CD3 (“BD Bioscience”, США). Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації вимірювали на проточному цитометрі FACScan за допомогою програмного забезпечення CellQuest software (“BD Bioscience”, США).

Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після стимуляції ($CD69^{+стим}$, %) дорівнював різниці між середнім значенням експресії CD69 та спонтанної експресії CD69 в контрольних зразках. Загальну кількість НК-лімфоцитів, що здатні до активації, підраховували як добуток рівня експресії CD69 на НК-лімфоцитах після стимуляції ($CD69^{+стим}$, %) на відсотковий вміст НК-лімфоцитів в периферичній крові,

розділений на 100 %. NK-активність для аналізу було розділено на три зони – підвищену, нормальну та знижену, аналогічно до попередньо описаного кореляційного зв'язку із NK-цитотоксичністю [1, 10]. Норма відповідала 90 % CI (від англ. – confidence intervals) інтервалу із 74 здорових пацієнтів із нормальним рівнем активності NK - клітин.

Статистичний аналіз-апроксимація Вульфа, OR (від англ. – odds ratio) та 95 % CI, тест Фішера (непарний непараметричний із двобічним значенням P) був виконаний за допомогою програми In Stat version 3.0 for Windows (“Graph Pad Software” Inc., San Diego, CA, США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Двобічність розподілу NK-активності

Вагітність було діагностовано у 33 пацієнок із 84 (39,3 %). У 5 пацієнок згодом вагітність замерла на першому триместрі. Ці пацієнтки не мали відмінностей за віком, кількістю попередніх спроб ІВФ, кількістю ембріонів, що були перенесені та за клінічним типом непліддя. Середні значення всіх досліджуваних показників NK-клітин, спонтанна та стимульована CD69-експресія були подібні у пацієнок з успішною імплантацією та пацієнок, які не завагітніли. Однак якісний розподіл параметрів демонстрував різницю між цими групами. Розподіли відсоткового вмісту NK та рівень CD69^{+стим}-експресії, представлені на рис. 1,а,б. Нормальні значення показника CD69^{+стим} були притаманні пацієнтам з успішною імплантацією – в цій групі значення утворили більш локальний розподіл з незначними “хвостами”, тоді як пацієнти з неуспіхом ІВФ мали здебільшого акцентовані рівні CD69^{+стим}-експресії. Знижені рівні CD69^{+стим} частіше виявлялись у пацієнок з неуспіхом ІВФ (39,2 %, 20/51) порівняно з жінками з успішною імплантацією (15,1 %, 5/33) та були достовірним фактором неуспішного прогнозу (OR 6,9, P=0,0004; таблиця). Проте підвищені зна-

чення відсоткового вмісту CD69^{+стим} також частіше виявлялися у пацієнок з неуспіхом ІВФ порівняно з групою, що завагітніли (20 та 9,1 % відповідно). Ця різниця не сягала повної достовірності (OR=3,96, P=0,061) і середні значення в цих групах були однакові (див. таблицю). Підвищені рівні CD69^{+стим}-експресії ставали вірогідним фактором неуспішного прогнозу за умов видалення з аналізу пацієнок із завмиранням вагітності (OR=5,47, P=0,047; рис. 1,б), оскільки акцентовані рівні CD69^{+стим}-експресії були у трьох із п'яти пацієнок із завмиранням вагітності (дві пацієнтки зі зниженим рівнем, одна – з підвищеним).

Загальна кількість здатних до активації NK-лімфоцитів також мала різний розподіл залежно від подальшого перебігу репродуктивного процесу. Знижені рівні NK-клітин здатних до активації, частіше виявлялися у пацієнок з неуспіхом ІВФ (20,9 %, 15/51) порівняно з жінками з успішною імплантацією (9,1 %, 3/33) та були достовірним фактором несприятливого прогнозу (OR=6,45, P=0,0115; див. рис. 1,в). Підвищені значення цього самого показника, також частіше виявлялися у пацієнок з безрезультатним ІВФ порівняно із групою жінок, що завагітніли (17,6 та 9,1 % відповідно; див. рис. 1,в).

Прогностичне значення нормальної NK-активності

У пацієнок з нормальними рівнями CD69^{+стим}-експресії вагітність після циклу ІВФ, наставала достовірно частіше порівняно із тими, в кого він був поза нормою – зниженим чи підвищеним (рис. 2). Прогностичними факторами для успішної імплантації були нормальні значення відсоткового вмісту NK (OR=2,48, P=0,109) та CD69^{+стим} (OR=4,46, P=0,0032). Успішність імплантації ембріона не була пов'язана із кількістю NK-клітин, проте асоціювалась із нормальним рівнем CD69^{+стим}-експресії. Крім того, нормальний рівень CD69^{+стим} рідше зустрічався у пацієнок із завмиранням вагітності (2 із 5; див. рис. 1,в).

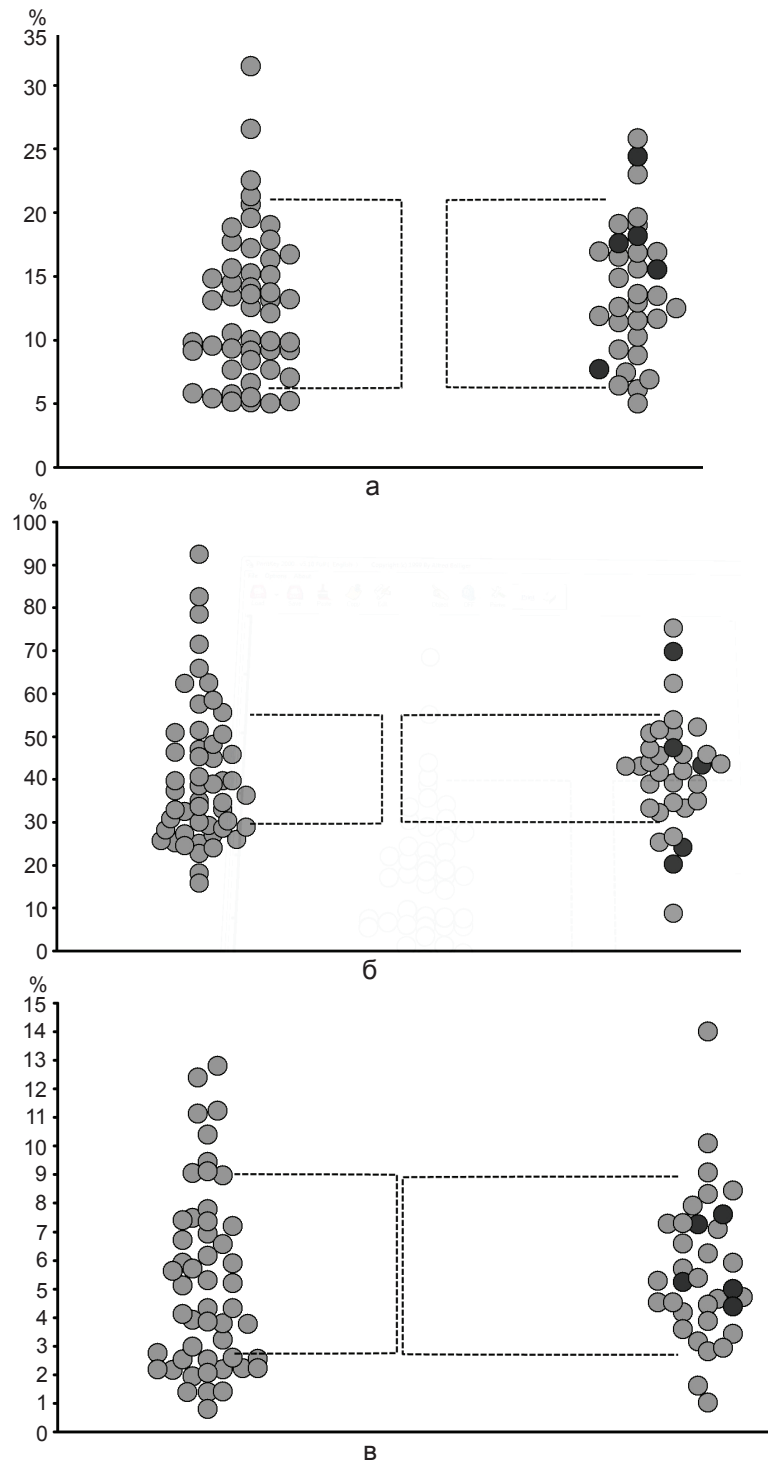


Рис. 1. Розподілення імунних параметрів у пацієнтів згідно з наступним результатом лікування (1 – безрезультативний ІВФ цикл, n=51, та 2 – настання вагітності в циклі *in vitro* фертилізації, n=33): а – кількість NK-лімфоцитів як відсоток CD56+CD3⁺ у крові, б, в – відсотковий вміст та загальна кількість NK-лімфоцитів, що стали позитивними за активаційним маркером CD69 внаслідок інкубації з клітинами пухлинної лінії, відповідно. Кожна точка відображає значення показника у кожного пацієнта, штрихові лінії – умовно нормальні рівні. Чорні точки це – кількість пацієток у яких вагітність, що настала внаслідок лікування, завмерла в першому триместрі

Прогностичне значення показників NK-лімфоцитів для подальшого розвитку вагітності внаслідок циклу in vitro фертилізації (ІВФ) для пацієнтів, розділених за ознакою відхилення від норми відсоткового вмісту NK-лімфоцитів та рівня CD69^{стим}-експресії

| Показники | ІВФ | | OR* для безрезультатного циклу ІВФ | 95%-й довірчий інтервал | P** |
|---|----------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------|--------|
| | неуспіх (n=51) | вагітність (n=33) | | | |
| Підвищення вмісту NK-лімфоцитів > 20 % | 5 (9,8%) | 3 (9,1%) | 1,08 | 0,22-4,5 | 1 |
| Зниження вмісту NK-лімфоцитів < 6 % | 8 (15,6%) | 1 (3,0%) | 4,8 | 0,5-40,6 | 0,115 |
| Підвищений рівень експресії CD69 після стимуляції >55 % | 10 (19,6%) | 3 (9,1%) | 3,96 | 0,96-16,33 | 0,061 |
| Знижений рівень експресії CD69 після стимуляції <30% | 20 (39,2%) | 5 (15,1%) | 6,9 | 2,27- 21,04 | 0,0004 |

* Апроксимація Вульфа, ** тест Фішера двопарний.

Результати засвідчили, що індукція експресії CD69 під впливом стимуляції K562 (CD69^{стим}, %) на NK-лімфоцитах є фізіологічним маркером активаційного стану популяції. Цей стан відображає здатність NK-популяції підтримувати імплантаційну здатність ендометрія, і є клінічно значущим фактором для прогнозування успішності імплантації та подальшого розвитку вагітності.

ОБГОВОРЕННЯ

Загальний рівень NK-лімфоцитів є показником, що характеризує дану популяцію клітин і його підвищення, пов'язане із репродуктивними порушеннями [3]. Цитотоксична

активність цих клітин є функціональним показником і відображає стан NK-ланки більш фізіологічно та із більшою клінічною значущістю, ніж простий підрахунок загального числа NK-лімфоцитів. Вимірювання цитотоксичної активності не позбавлено впливу різних фізіологічних і методичних факторів. Невизначеність реального співвідношення ефектор/мішень і неоднакова ефективність під час інкубації зразків із різною кількістю NK-лімфоцитів впливають на рівень цитотоксичності та на можливість взаємодії ефекторних клітини із мішенню.

Попередньо ми продемонстрували кореляцію між NK-цитотоксичністю та відсотковим вмістом NK. Однак не завжди зразки

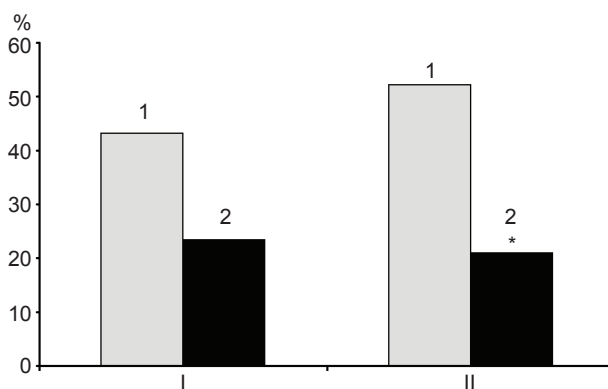


Рис. 2. Рівні настання вагітності у пацієнок, розділених за відхиленням від норми: 1 – норма, 2 – відхилення від норми; I – відсотковий вміст NK-лімфоцитів, II – рівень експресії CD69^{стим}. * P<0,05

із високим вмістом НК-клітин (більше ніж 18 або навіть 20 %) мають підвищену НК-цитотоксичність, тоді як зразки із вмістом НК-клітин менше ніж 10 % іноді мають високу цитотоксичність [9].

Ефективність цитотоксичної реакції, що вимірюється у кількості вбитих клітин-мішеней, зростає із зниженням співвідношення ефектор/мішень.

Лізіс сягає максимальної ефективності, коли кількість клітин-мішеней буде істотно перевищувати таку кількість ефекторних клітин. Природно, що у цій зоні співвідношення ефектор/мішень відсотковий вміст клітин-мішеней, що загинуть, критично низький для точного аналізу. Однак, побудувавши апроксимуючу криву у співвідношенні ефектор/мішень, ми отримуємо у цій зоні ефективність лізису 0,45–0,55, тобто при максимально сприятливих умовах лише кожний другий НК-лімфоцит вбиває клітину-мішень. Іншими словами, лише половина НК-лімфоцитів вступає у цитотоксичну реакцію. Цей аналіз підтверджується здатністю НК до активації після стимуляції надлишком клітин K562. Так, нами продемонстровано, що в середньому 50 % від числа НК-клітин стають CD69⁺ після стимуляції [9, 10].

Вимірювання активації НК-клітин після інкубації K562 є альтернативним методом визначення стану цієї популяції. В попередньому дослідженні [9] ми показали значну кореляцію між цим показником і НК-цитотоксичністю. Однак новий метод є незалежним від загальної кількості НК-клітин, що робить його більш фізіологічно-функціональним [10].

У цьому дослідженні ми оцінювали клінічне значення запропонованого методу в прогнозуванні імплантації. Підтверджено прогностичну роль НК-активності, а також продемонстровано діалектичність ролі НК у репродуктивних процесах – підвищення і зниження НК-активності має негативний вплив на імплантацію. Для нас була очікуваною асоціація підвищеної активації із

негативним прогнозом, оскільки подібне було описано попередньо на клінічних та експериментальних моделях [16, 23].

Ми вперше продемонстрували взаємозв'язок зниженої НК-функції із негативним впливом на імплантацію. До цього було лише продемонстровано, що затримка розвитку плода асоційована із низькою кількістю НК-лімфоцитів у децидуальній оболонці [11].

Можливим методичним поясненням нашої знахідки є покращена роздільна здатність нового методу визначення НК-активності, особливо у нижній зоні діапазону. Це дало змогу точніше визначити стан зниженої НК-активності та виявити клінічну асоціацію. Також важливим фактором у роботі є те, що зразки крові були відібрані безпосередньо перед введенням ембріона і демонструють саме актуальний для імплантаційного вікна функціональний статус популяції НК-лімфоцитів.

Зниження і підвищення НК-активності може погіршувати ефективність імплантації в один фізіологічний спосіб, а саме створення несприятливої НК-функції, що у свою чергу призводить до несприятливого стану рецептивного ендометрія. Раніше було показано, що гормональна стимуляція яєчників спричинює нагромадження НК-клітин у ньому [15]. Було опубліковано, що CD62L-залежна адгезія НК-лімфоцитів зростає під час овуляції у пацієток з наступним розвитком вагітності [30]. У нашому попередньому дослідженні ми продемонстрували, що високий рівень CD62L-експресії характерний саме для НК-клітин, що є неактивними у відповідь на стимуляцію K562 [9]. І в наших дослідженнях [7] і в працях інших авторів зазначається [25], що жінки із численними безрезультатними імплантаціями мають підвищену кількість НК-лімфоцитів та НК-цитотоксичності. Можливим поясненням цього феномену, є те, що обстежувані пацієнтки були без обтяженого анамнезу і більшість з них не мали підвищення числа НК-клітин, та інших несприятливих імунних параметрів.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз середніх значень не висвітлює різниці між групами через причини двобічності розподілу параметрів і є не придатним для таких випадків, тоді як якісний аналіз розподілу параметрів є більш інформативним і коректним.

2. Показано наявність меж сприятливих значень NK-активності та доведено негативне клінічне значення її акцентованих рівнів для імплантації ембріону.

3. Акцентовані стани NK-активності, що визначаються новим методом, можуть надалі допомогти у створенні діагностичного підходу до прогнозування репродуктивних порушень.

Б.В. Донской, В.П. Чернышов, В.Ю. Сиренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

ВЛИЯНИЕ АКЦЕНТИРОВАННОЙ ГИПО- И ГИПЕРАКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ НА ИМПЛАНТАЦИЮ ЭМБРИОНОВ

В предыдущей работе нами был разработан и описан новый метод определения активности NK-лимфоцитов по экспрессии маркера активации CD69 вследствие стимуляции клетками-мишенями K562 (клеточная линия эритромиелолойкоза человека). Продемонстрировано, что количество активированных клеток отражает популяционно-функциональное состояние NK-лимфоцитов периферической крови. В данном исследовании мы изучали значение этого показателя для физиологического протекания имплантации эмбриона у 84 пациенток, которые проходили лечение методом ИВФ (in vitro фертилизация). Следует отметить, что пациенты с акцентированным повышением или снижением уровней NK-активности, имеют неблагоприятные условия для имплантации (9,1 %, 3/13) и, соответственно, (15,1 %, 5/25) в сравнении с пациентками с условно нормальными уровнями (52,2 %, 25/46). Таким образом условно нормальный уровень NK-активности является важным физиологическим условием и одновременно удобным диагностическим-прогностическим фактором иммунологической готовности к имплантации эмбриона.

Ключевые слова: CD69-экспрессия, имплантация эмбриона, естественные киллерные лимфоциты.

B.V. Dons'koi, V.P. Chernyshov, V.Y. Sirenko, G.V. Strelko, D.V. Osypchuk

EFFECT OF HYPO- AND HYPER-ACCENTUATED NK CELL ACTIVITY ON EMBRYO IMPLANTATION

NK lymphocytes play an important role in implantation and during development in early pregnancy. Recently, we showed that

the proportion of NK that expressed CD69 after incubation with K562 (CD69^{stim}) cells reflected the NK population excitation potential. In the present study, we investigated the significance of NK activation levels in predicting the implantation outcome in 84 patients following IVF (in vitro fertilization). Remarkably, the patients with an accentuated increase or a decrease of the levels of NK activity, have unfavourable conditions for implantation (9,1 %, 3/13 and 15.1%, 5/25, respectively) compared to the patients with the nominally normal levels (52.2%. 25/46). Therefore, a nominally normal level of the NK activity is an important physiological condition and predictive factor for immune readiness to embryo implantation. This study describes an easy, efficient, sensitive and informative method for measuring NK cell activity that is relevant to clinical trials.

Key words: CD69-expression, embryo implantation, natural killer lymphocytes, NK-activity, NK-stimulation.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology; National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv; Institute of Reproductive Medicine, Kyiv; Institute of Genetic of Reproduction, Kyiv

REFERENCES

1. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. Immunophenotypic characterization of two functionally different subpopulations of Natural killer cells in human peripheral blood. *Int J of Phys and Path.* 2011;**2**:P.327-334.
2. Barber E.M., Pollard J.W. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.*-2003;**171**: P.37-46.
3. Beer A.E., Kwak J.Y., Ruiz J.E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol.*1996;**35**:P.376-382.
4. Brunner K.T., Mael J., Cerottini J.C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.*1968;**14**:181-196.
5. Coulam C.B., Roussev R.G. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.*2003;**20**:58-62.
6. Croy B.A., Zhang J., Tayade C., Colucci F., Yadi H., Yamada A.T. Analysis of uterine natural killer cells in mice. *Methods Mol Biol.*2010;**612**:465-503.
7. Chernyshov V.P., Sudoma I.O., Dons'koi B.V., Kostyuchyk A.A., Masliy Y.V. Elevated NK cell cytotoxicity, CD158a expression in NK cells and activated T lymphocytes in peripheral blood of women with IVF failures. *Am J Reprod Immunol.*2010;**64**:58-67.
8. Di Santo J.P. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance *Annu Rev Immunol.*2006;**24**:257-286.
9. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69

- up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*.2011;**30**:187-195.
10. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. The immunophenotypic characteristics of two functionally different subpopulations of natural killer cell in human peripheral blood. *Int J of Phys and Path*.2011;**2**:327-334.
 11. Eide I.P., Rolfseng T., Isaksen C.V., Mecsei R., Roald B., Lydersen S., Salvesen K.A., Harsem N.K., Austgulen R. Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis. *Virchows Arch*.2006;**448**:269-276.
 12. Giavedoni L.D., Velasquillo M.C., Parodi L.M., Hubbard G.B., Hodara V.L. Cytokine Expression, Natural Killer Cell Activation, and Phenotypic Changes in Lymphoid Cells from Rhesus Macaques during Acute Infection with Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus. *J Virol*.2000;**74**:1648-1657.
 13. Guimond M.J., Luross J.A., Wang B., Terhorst C., Danial S., Croy B.A. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod*.1997;**56**:169-179.
 14. Hussain R.F., Nouri A.M., Oliver R.T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods*.1993;**160**:89-96.
 15. Junovich G, Mayer Y, Azpiroz A, Daher S, Iglesias A, Zylverstein C, Gentile T, Pasqualini S., Markert U.R., Gutiérrez G. Ovarian stimulation affects the levels of regulatory endometrial NK cells and angiogenic cytokine VEGF. *Am J Reprod Immunol*. 2011;**65**:146-153.
 16. Kinsky R., Delage G., Rosin N., Thang M.N., Hoffmann M., Chaouat G. A murine model of NK cell mediated resorption. *Am J Reprod Immunol*.1990;**23**:73-77.
 17. Kusumi M., Ymashita T., Fujii T., Nagamatsu T., Kozuma S., Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56 bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol*.2006;**70**:33-42.
 18. Kolber M.A., Quinones R.R., Gress R.E., Henkart P.A. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods*.1988;**108**:255-264
 19. Korbel D.S., Newman K.C., Almeida C.R., Davis D.M., Riley E.M. Heterogeneous Human NK Cell Responses to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology*.2005;**175**:7466-7473.
 20. Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol*.2008;**59**:388-400.
 21. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*.2003;**15**:308-14.
 22. Le Bouteiller P., El Costa H., Aguerre-Girr M., Tabiasco J. Immunity of pregnancy: novel concepts. *Bull Acad Natl Med*.2009;**193**:1029-1041.
 23. Matsubayashi H., Hosaka T., Sugiyama Y., Suzuki T., Arai T., Kondo A., Sugi T., Izumi S., Makino T. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. *Am J Reprod Immunol*.2001;**46**:318-322.
 24. Ntrivalas E.I., Kwak-Kim J.Y., Gilman-Sachs A., Chung-Bang H., Beaman K.D., Mantouvalos H.P., Beer A.E. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod*. 2001;**16**:855-861.
 25. Ntrivalas E.I., Bowser C.R., Kwak-Kim J., Beaman K.D., Gilman-Sachs A. Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *Am J Reprod Immunol*.2005;**53**:215-221.
 26. Riley J.K., Yokoyama W.M. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol*.2008;**59**:371-387.
 27. Roussev R.G., Dons'koi B.V., Stamatkin C., Ramu S., Chernyshov V.P., Coulam C.B., Barnea E.R. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy. *Reprod Biomed Online*.2013;**26**:79-87.
 28. Sun J.C, Lanier L.L. Natural killer cells remember. An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*.2009;**39**:2059-2064.
 29. Szekeres J., Pacsa A.S., Pejtsik B. Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods*.1981;**40**:151-154.
 30. Van den Heuvel M.J., Horrocks J., Bashar S., Taylor S., Burke S., Hatta K., Lewis J.E., Croy B.A. Menstrual cycle hormones induce changes in functional interactions between lymphocytes and decidual vascular endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*.2005;**90**:2835-2842.
 31. Wang X.M., Terasaki P.I., Rankin G.W. Jr., Chia D., Zhong H.P., Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol*.1993;**37**:264-270.
 32. Warren H.S. Using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to monitor human NK cell division: Analysis of the effect of activating and inhibitory class I MHC receptors. *Immunology and Cell Biology*.1999;**77**:544-551.
 33. Winger E.E., Reed J.L., Ashoush S., El-Toukhy T., Ahuja S., Taranissi M. Elevated Preconception CD56(+) 16(+) and/or Th1:Th2 Levels Predict Benefit from IVIG Therapy in Subfertile Women Undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol*.2011;**66**:394-403.
 34. Whiteside T.L., Herberman R.B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol*.1995;**7**:704-710.
 35. Yamada H., Kato E.H., Kobashi G., Ebina Y., Shimada S., Morikawa M., Sakuragi N., Fujimoto S. High NK cell activity in Early Pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol*.2001;**46**:132-136.

ДУ “Ін-т педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України”, Київ;

Ін-т репродуктивної медицини НАМН України”, Київ;

Ін-т генетики репродукції НАМН України”, Київ

E-mail: boris_donskoy@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 10.07.2013

О.І. Бондаренко

Дослідження кальцієвих каналів мітохондріальної мембрани ендотеліальних клітин

*Надходження Ca^{2+} в мітохондрії, що забезпечується так званим мітохондріальним кальцієвим уніпортером, відіграє центральну роль у продукції АТФ, регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та відкритті мітохондріальної пори. Враховуючи це, дослідження механізмів, що забезпечують вхід Ca^{2+} в мітохондрії нині є надзвичайно актуальними, оскільки їх розуміння дає можливість впливати на функціональну активність і життєздатність клітин, безпосередньо модулюючи вміст мітохондріального кальцію. Донедавна дослідження процесів надходження Ca^{2+} в мітохондрії було значною мірою обмежено непрямими методами, здебільшого оптичними. Застосування методу фіксації потенціалу до внутрішньої мембрани ізольованих мітохондрій дало змогу дослідити поодинокі активності кальційпровідних каналів. У роботі, проведеній на мітопластах (мітохондіях без зовнішньої мембрани), ізольованих від ендотеліальних клітин, у конфігурації *mitoplast-attached* методу *patch-clamp* описані електрофізіологічні властивості кальційпровідних каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани. Показано наявність трьох типів провідності кальцієвих каналів. Одержані результати свідчать про комплексну природу механізмів, що забезпечують надходження кальцію в мітохондрії і наявність альтернативних до мітохондріального кальцієвого уніпортера шляхів надходження.*

Ключові слова: мітопласти, кальцієві канали, ендотеліальні клітини.

ВСТУП

Мітохондрії відіграють важливу роль у регуляції функцій і життєздатності клітин, забезпечуючи синтез АТФ, підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та вміст вільних радикалів. Крім того, завдяки регуляції відкриття мітохондріальної пори, Ca^{2+} , що надходять у мітохондріальний матрикс, ці органели визначають індукцію загибелі клітин. Останніми дослідженнями доведено, що індукція мітохондріальної пори (МП) є однією з ланок патогенезу таких станів, як ішемічно-реперфузійні ушкодження серця та мозку, діабет, хвороба Паркінсона тощо [8].

Різноманітність функцій мітохондрій тісно пов'язана з їх здатністю захоплювати, акумулювати та вивільнювати іони кальцію в цитозоль. Трансмітохондріальний транспорт кальцію, як відомо, відіграє активну роль у

регуляції внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації та надходженні кальцію через депокеровані кальцієві канали [16]. Хоча здатність мітохондрій акумулювати Ca^{2+} відома з початку 60-х років минулого століття, механізми їх транспорту в мітохондріальний матрикс на теперішній час не є визначеними та залишаються дуже актуальними.

Вважається, що Ca^{2+} -акумулююча функція мітохондрій забезпечується так званим кальцієвим уніпортером, чутливим до рутенієвого червоного (RuR). Нещодавно було вперше показано, що мітохондріальний кальцієвий уніпортер є високоселективним кальцієвим каналом, який за відсутності двовалентних катіонів є натрійпровідним [11]. При цьому амплітуда струму, викликаного переносом Na^+ , значно перевищує таку, що розвивається внаслідок надходження Ca^{2+} у матрикс. Дослідження останніх років,

проведені із застосуванням флуоресцентних зондів, виявили залучення декількох протеїнів у трансмітохондріальний транспорт Ca^{2+} , серед яких MICU1 [14], MCUR1 [13], роз'єднувальні білки (UCP2 і UCP3) [18], ріанодинові рецептори [17], TRPC3-канали [9], і протеїн CCDC109A, який було перейменовано на мітохондріальний кальцієвий уніпортер (MCU) [2, 7]. Реєстрація струмів у конфігурації cell-attached виявила декілька типів активності поодиноких кальцієвих каналів у внутрішній мітохондріальній мембрані кардіоміоцитів [15, 17]. У мітохондріях, ізольованих з HeLa-клітин, було виявлено три типи активності цих каналів [3], що свідчить про комплексну природу механізмів транспорту Ca^{2+} в мітохондрії. Враховуючи важливу роль мітохондрій у регуляції функції і сигналізації ендотеліальних клітин [5, 6, 12], мета роботи полягала в дослідженні біофізичних властивостей каналів, що забезпечують надходження кальцію в мітохондрії ендотеліальних клітин.

МЕТОДИКА

Ендотеліальні клітини лінії EA.hy926, що походять від ендотеліальних клітин пуповинних артерій людини [8], вирощували в культуральному середовищі Ігла модифікації, Дюльбекко (DMEM) з додаванням 10%-ї телячої сироватки. Мітохондрії були ізольовані методом диференційного центрифугування [13]. Їх суспензували у розчині такого складу (ммоль/л): HEPES – 10, сахароза – 250, АТФ – 1, АДФ – 0,08, сукцинат – 5, K_2HPO_4 – 2, дитіотреїтол – 1, рН доводили до 7,4 за допомогою КОН. Мітопласти отримували з ізольованих мітохондрій їхньою інкубацією протягом 7 хв у гіпотонічному розчині такого складу (ммоль/л): HEPES – 5, сахароза – 5, EGTA – 1, рН 7,2. Після цього ізотонічність відновлювали додаванням 0,2 об'єму гіпертонічного розчину (ммоль/л): KCl – 750, HEPES – 80, EGTA – 1; рН 7,4.

Поодинокі іонні канали реєстрували з використанням методу patch-clamp у ре-

жимі фіксації потенціалу в конфігураціях mitoplast-attached та whole-mitoplast. Для реєстрації активності кальцієвих каналів у конфігурації mitoplast-attached піпетки заповнювали розчином, що містив 105 ммоль/л CaCl_2 , 10 ммоль/л HEPES. Опір піпеток становив 8–12 МОм. Для попередження відкриття МП і активності мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника у розчин додавали RuR (10 мкмоль/л) та CGP37157 (20 мкмоль/л). Значення потенціалів наведені стосовно внутрішньої поверхні мембрани. Для реєстрації кальцієвих струмів у конфігурації whole-mitoplast піпетки заповнювали розчином такого складу (ммоль/л): метансульфонат Cs – 120, CsCl – 30, EGTA – 1, сахароза – 110, глюконова кислота – 2; рН 7,2. Базовий зовнішній розчин у цих експериментах містив (ммоль/л): тріс-HCl – 150, EGTA – 1, EDTA – 1, HEPES – 10. Після отримання конфігурації whole-mitoplast, мітопласти підтримували при потенціалі 0 мВ. Ремпові зсуви мембранного потенціалу від -160 до +50 мВ впродовж 1 с прикладали кожні 10 с. Натрієвий струм викликали еквімолярним заміщенням тріс⁺ на Na^+ у зовнішньоклітинному розчині. Результати реєстрували за допомогою підсилювача НЕКА-7. Їх оцифровували з частотою 10 кГц, фільтрували низькочастотним фільтром Бесея та зберігали на жорсткому диску комп'ютера. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програми Clampfit 9.2 ("Molecular Devices", США).

РЕЗУЛЬТАТИ

З літературних даних видно [11], що у середовищі, котре не містить двовалентних катіонів у відповідь на ремпові зсуви підтриманого потенціалу до значень мембранного потенціалу мітохондрій розвивається інтегральний струм, який переноситься Na^+ . Амплітуда вхідного натрієвого струму через мітохондріальну мембрану перевищує таку, що розвивається внаслідок Ca^{2+} . Тому біофізичні властивості кальцієвих каналів у

таких умовах досліджувалися переважно при використанні Na^+ як проникних іонів.

У конфігурації ціла клітина, еквімолярна заміна тріс- HCl у базовому зовнішньоклітинному розчині на NaCl під час ремпових зсувів призводила до розвитку вхідного струму при негативних потенціалах (рис. 1). За контрольних умов при потенціалі -160 мВ амплітуда натрієвого струму була -652 ± 27 пА ($n=5$). Цей струм пригнічувався додаванням 10 мкмоль/л RuR, блокатора мітохондріального кальцієвого уніпортера. Наші результати демонструють наявність при негативних потенціалах чутливого до RuR вхідного натрієвого струму в мітопластах ендотеліальних клітин.

У конфігурації mitoplast-attached із 105 ммоль/л CaCl_2 у піпетці при потенціалах від -100 до -150 мВ спостерігалось 3 типи активності, які відрізнялися за провідністю. Першим типом активності був канал з провідністю 13 пСм (рис. 2,а), який спостерігався у 9 активних відведеннях з 14 (вірогідність 64 %). Другим типом активності був канал з провідністю 7 пСм (див. рис. 2,б). Він спостерігався у 4 відведеннях з 14 активних. Активність цього типу була в діапазонах від -80 до -160 мВ.

Крім описаних вище було зареєстровано ще один тип активності з провідністю 35 пСм і який мав пачкову активність (див. рис. 2,в). Цей тип активності спостерігався найменш часто і був зареєстрований у 3 відведеннях з 14 активних.

Таким чином, на внутрішній мітохондріальній мембрані ендотеліальних клітин за наявності зовнішньомітохондріального Ca^{2+} було ідентифіковано 3 типи активності поодиноких каналів. Всі вони спостерігались у діапазоні потенціалів від -80 до -160 мВ і були залежними від Ca^{2+} ззовні. Вхідні струми також викликалися після заміни зовнішньоклітинних іонів калію на тріс.

Для визначення селективності каналів у серії експериментів піпетки замість розчину, що містив 105 ммоль/л CaCl_2 та 10 ммоль/л HEPES, наповнювалися розчином, що містив 150 ммоль/л NMDGCl, 1 ммоль/л EGTA, 10 ммоль/л HEPES. У цих експериментальних умовах при потенціалах в діапазоні від -100 до -150 мВ вхідні струми не спостерігалися ($n=7$), вказуючи на те, що вхідні струми через досліджувані канали переносяться Ca^{2+} . Ці експерименти свідчать про гетерогенність механізмів надходження іонів Ca^{2+} в мітохондрії.

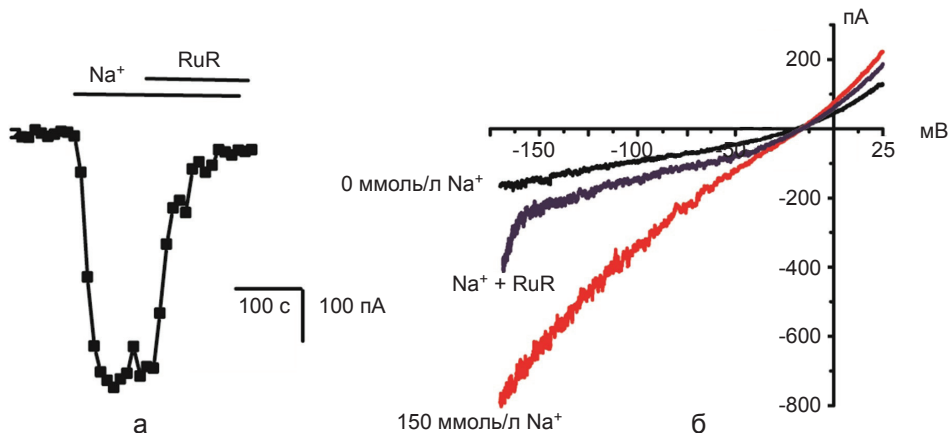


Рис. 1. Вхідний натрієвий струм, чутливий до рутенієвого червоного (RuR; 10 мкмоль/л), через внутрішню мітохондріальну мембрану ендотеліальних клітин у конфігурації whole-mitoplast: а – часовий перебіг струму при потенціалі -160 мВ у відповідь на суперфузію зовнішньоклітинного розчину, що містив 150 ммоль/л NaCl , 1 ммоль/л EGTA, 1 ммоль/л EDTA, 10 ммоль/л HEPES; б – трансмембранні інтегральні струми у безнатрієвому розчині за наявності 150 ммоль/л Na^+ до та після додавання RuR

ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження механізмів надходження кальцію в матрикс мітохондрій переважно проводяться із застосуванням непрямих методів, які унеможливають фіксацію багатьох параметрів реєстрації. Застосування методу patch-clamp відкриває можливість безпосередньо реєструвати кальцієві струми скрізь

мітохондріальну мембрану за умов фіксації потенціалу і іонного складу матриксу, а також зовнішньомітохондріального оточення. Показано, що застосування конфігурації whole-mitoplast дає змогу зареєструвати вхідний інтегральний струм через внутрішню мембрану мітохондрій, який є чутливим до RuR. Із застосуванням конфігурації mitoplast-attached нами диференційовано три типи поодинокі

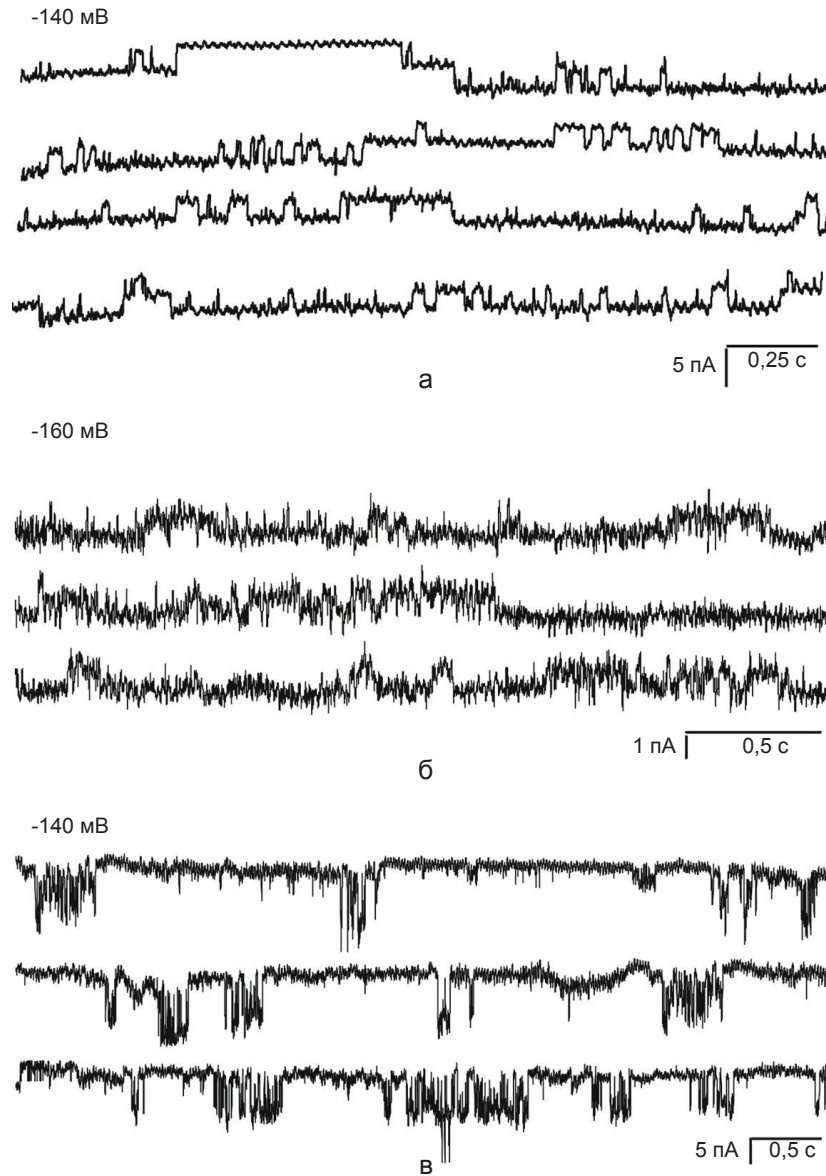


Рис. 2. Поодинокі активності кальцієвих каналів внутрішньої мембрани мітохондрій ендотеліальних клітин з різною провідністю: а – 13 пСм при підтриманому потенціалі -140 мВ; б – 7 пСм при підтриманому потенціалі -160 мВ; в – 35 пСм при підтриманому потенціалі -140 мВ

активності вхідних струмів при потенціалах, близьких до потенціалу мітохондрій. Оскільки при застосуванні безкальцієвого розчину у піпетці поодинокі активність при досліджених потенціалах не спостерігалася, можна зробити висновок, що зареєстрована активність належить до кальційпровідних каналів. Три типи кальцієвої провідності у внутрішній мітохондріальній мембрані вказує на комплексну регуляцію надходження кальцію в мітохондрії та, ймовірно, про наявність декількох молекулярних структур, що виконують функцію транспорту кальцію в мітохондрії ендотеліальних клітин.

Отримані результати добре узгоджуються з сучасними даними, які демонструють наявність декількох протеїнів у внутрішній мітохондріальній мембрані, що забезпечують і регулюють захоплення мітохондріями іонів кальцію [7, 9, 13, 14, 17]. Дослідження на мітопластах ізольованих від клітин HeLa, що походять з ракової пухлини шийки матки, раніше дали змогу нам також виявити три типи провідності кальційпровідних каналів [3]. Проте описані в нашій роботі два типи кальцієвої провідності в мітопластах ендотеліальних клітин (7 та 35 пСм) відрізняються від зареєстрованих раніше в мітопластах, ізольованих від HeLa-клітин (26 та 75 пСм), водночас третій тип спостерігався в мітопластах обох об'єктів [3]. У мітопластах, ізольованих з серцевої тканини людини [15], було ідентифіковано два типи провідностей кальцієвих каналів в умовах, ідентичних тим, в яких проведені наші експерименти. Цікаво, що значення провідностей, ідентифікованих в мітохондріях серцевого м'яза (13,7 та 7,7 пСм), були дуже близькими до таких, що описані в нашій роботі. Проте в мітохондріях ендотеліальних клітин нами ідентифіковано третій тип активності, що носив пачковий характер, з поодинокію провідністю 35 пСм, яка не була ідентифікована в мітопластах серцевого м'яза. Нещодавно було продемонстровано, що роз'єднувальні білки (UCP2 і UCP3) відіграють важливу роль у надхо-

дженні кальцію в мітохондрії ендотеліальних клітин [18]. Проте їх значення у транспорті кальцію в мітохондрії підшлункової залози не було підтверджено [1]. Подальші дослідження потребують ідентифікації специфічних протеїнів внутрішньої мітохондріальної мембрани, що забезпечують або контролюють регуляцію кальційпровідних каналів мітохондрії ендотеліальних клітин.

А.И. Бондаренко

ИССЛЕДОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Поступление Ca^{2+} в митохондрии, обеспечиваемое митохондриальным кальциевым унипортером, играет центральную роль в продукции АТФ, регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, а также в открытии митохондриальной поры. До недавнего времени понимание процессов поступления Ca^{2+} в митохондрии было в значительной степени ограничено исследованиями с применением непрямых методов, главным образом оптических. Метод фиксации потенциала позволил исследовать на внутренней мембране изолированных митохондрий одиночную активность кальцийпроводящих каналов. В работе, проведенной на митопластах, изолированных от эндотелиальных клеток, описаны электрофизиологические свойства кальцийпроводящих каналов внутренней митохондриальной мембраны. Показано присутствие трех типов проводимости каналов. Полученные результаты свидетельствуют о комплексной природе механизмов, обеспечивающих поступление кальция в митохондрии и существование альтернативных к митохондриальному кальциевому унипортера путей поступления. Ключевые слова: митохондрии, кальциевые каналы, эндотелиальные клетки.

A.I. Bondarenko

SINGLE CHANNEL RECORDINGS REVEAL DISTINCTIVE CHARACTERISTICS OF Ca^{2+} -PERMEABLE CHANNELS IN THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE

Mitochondria play a central role in the regulation of cell function. Ca^{2+} entry into mitochondria represents a central event in the regulation of ATP production, intracellular Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial permeability transition pore opening. Until recently, our understanding of the mechanisms of mitochondria Ca^{2+} uptake was largely limited by the use of indirect optical methods. Utilization of patch-clamp method to isolated mitoplasts allowed characterizing single channel properties of Ca^{2+} permeable channels in the inner mitochon-

drial membrane. Here we show the presence of three types of single channel activities of Ca^{2+} permeable channels in mitoplasts isolated from endothelial cells. While the identity and molecular structure of these channels still remain to be identified, these findings point for complex mechanisms of Ca^{2+} entry in mitochondria.

Key words: mitochondria, calcium channels, patch-clamp.

*Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine;
Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Medical
University of Graz, Austria*

REFERENCES

1. Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, M. Waldeck-Weiermair, M, Malli R, Graier WF. Mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2012; **287**:34445-54.
2. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**:341-345.
3. Bondarenko AI, Jean-Quartier C, Malli R, Graier WF (2013) Characterization of distinct single-channel properties of Ca^{2+} inward currents in mitochondria. *Pflugers Arch* **465**:997-1010.
4. Bondarenko AI, Jean-Quartier C, Parichatikanond W, Alam MR, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2013) Mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU)-dependent and MCU-independent Ca^{2+} channels coexist in the inner mitochondrial membrane. *Pflugers Arch*. in press.
5. Bondarenko OI, Sahach VF (2006) [Role of mitochondria in regulation of endothelial cell hyperpolarization to acetylcholine]. *Fiziol Zh* **52**:6-11.
6. Bondarenko OI, Sahach VF (2011) [Mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger inhibitor CGP37157 produces endothelial cell depolarization with membrane potential oscillations]. *Fiziol Zh* **57**:9-16.
7. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**:336-340.
8. Duchen MR, Szabadkai G (2010) Roles of mitochondria in human disease. *Essays Biochem* **47**:115-137.
9. Feng S, Li H, Tai Y, Huang J, Su Y, Zhu MS, Abramowitz J, Wang Y. Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**:11011-6.
10. Jean-Quartier C, Bondarenko AI, Alam MR, Trenker M, Waldeck-Weiermair, M, Malli R, Graier WF. Studying mitochondrial Ca^{2+} uptake - a revisit. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **353**:114-27.
11. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**:360-364.
12. Malli R, Frieden M, Osibow K, Graier WF (2003) Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca^{2+} elevation during agonist stimulation. *J Biol Chem* **278**:10807-10815.
13. Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenar T, Csordas G, Madireddi P, Yang J, Muller M, Miller R, Kolesar JE, Molgo J, Kaufman B, Hajnoczky G, Foskett JK, Madesh M (2012) MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol* **14**:1336-1343.
14. Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgo J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M (2012) MICU1 Is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca^{2+} Uptake that Regulates Cell Survival. *Cell* **151**:630-644.
15. Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, Wahlers T, Hoppe UC (2009) Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca^{2+} uptake by 2 different voltage-gated Ca^{2+} channels. *Circulation* **119**:2435-2443.
16. Parekh AB (2008) Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* **44**:6-13.
17. Ryu SY, Beutner G, Kinnally KW, Dirksen RT, Sheu SS (2011) Single channel characterization of the mitochondrial ryanodine receptor in heart mitoplasts. *J Biol Chem* **286**:21324-21329.
18. Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport. *Nat Cell Biol* 2007; **9**:445-52

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: abond01@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 21.10.2013*

Д.В. Варивончик, С.О. Риков, А.О. Салюков, А.Б. Мішенін, Г.Ю. Пишнов,
Є.В. Моїсеєнко

Морфофункціональні зміни органа зору у зимівників української антарктичної станції «Академік Вернадський»

Дослідженням з'ясовано, що територія Антарктики на Українській антарктичній станції «Академік Вернадський» відноситься до зони «надвисокого» ризику виникнення офтальмологічної патології, зумовленої ультрафіолетовим випромінюванням (УФВ). Результати комплексного офтальмологічного дослідження 24 зимівників XVI та XVII Українських антарктичних експедицій (2011–2013 рр.) засвідчили, що у них під впливом надлишкової експозиції природним УФВ розвиваються специфічні зміни в органі зору – паренхіматозно-ендотеліальна кератопатія, ядерно-задньокапсулярна фактопатія, макулопатія. Методом денситометрії зареєстровано такі морфологічні зміни рогівки: зменшення центральної товщини на 14,3 %; щільності на 10,1 % та кількості ендотеліальних клітин гексагональної форми на 16,6 %; у кришталику зареєстровано морфологічні зміни: збільшення його оптичної щільності – середньої на 10,1 %, максимальної на 21,6 %, заднього відділу на 13,1 %. Результати денситометричних профілів свідчать про розвиток локальних помутнень у задніх відділах кришталика (в ядрі та капсулі). Комп'ютерна квантитативна периметрія макули показала зниження світлочутливості ковбочкових клітин сітківки у 6 разів. У більшості зимівників спостерігалися морфологічні ознаки перенесеної гострої сонячної ретинопатії. Виявлені патологічні зміни є до- та субклінічними ознаками дистрофії рогівки, катаракти та макулодистрофії, які виникли внаслідок специфічної дії природного УФВ, що потребує розробки комплексних заходів профілактики. Ключові слова: природне ультрафіолетове випромінювання, офтальмологічна патологія, Антарктика, зимівники.

ВСТУП

Природне ультрафіолетове випромінювання є частиною електромагнітного спектра, що випромінює Сонце. За довжиною хвилі його розділяють на три діапазони: ультрафіолетовий А (UVA), (A1 – $\lambda=400-340$ нм; A2 – $\lambda=340-315$ нм); В (UVB), ($\lambda=315-280$ нм); – С (UVC), ($\lambda=200-280$ нм). Для кліматично-метеорологічних умов Антарктики характерні високі рівні приземного УФВ (середньорічні – 1277 Вт/м^2 , з максимумом восени та взимку), низькі рівні стратосферного озону (середньорічні – 276 од. Добсона), значна кількість (297) хмарних днів, що зумовлює високі рівні переважно розсіяного

(від небозводу) та відбитого (від снігу) УФВ, на фоні значного надходження прямого УФВ у сонячні дні, внаслідок формуванням «озонової дірки» (формується над Антарктикою з 1985 р. щорічно з серпня по січень, діаметр – близько 1 тис. км). Основним лімітуючим фактором надходження УФВ на землю є антарктична (полярна) ніч, яка триває з квітня по серпень [8, 14, 16].

Природне УФВ може бути небезпечним для людей, які більше часу працюють на відкритому повітрі [3, 4]. Так, доведено, що надлишкова експозиція УФВ проявляється як гострими, так і хронічними ефектами та наслідками для здоров'я людини, а саме:

– шкіра – еритема та засмага, сонячний

© Д.В. Варивончик, С.О. Риков, А.О. Салюков, А.Б. Мішенін, Г.Ю. Пишнов, Є.В. Моїсеєнко

опік, фотостаріння, фотодерматоз, сонячний кератоз, злоякісна меланома/рак (базально-клітинний і плоскоклітинний) шкіри, губи;

– орган зору – гострий фотокератит і фотокон'юнктивіт, гостра сонячна ретинопатія, птеригіум, пінгвекула, кліматична краплеподібна кератопатія, катаракта, ексудативна форма макулодистрофії, рак рогівки, кон'юнктиви (плоскоклітинний), увеальна меланома;

– імунна система – клітинна імуносупресія та знецінення ефекту профілактичних щеплень, активація латентної вірусної інфекції, зумовленої вірусами герпесу, папіломи тощо [13].

Визначено, що пошкодження рогівки та кришталика збільшується зі зменшенням довжини хвилі УФВ (максимум пошкодження при $\lambda=270$ нм, що помітно відрізняється від максимуму для шкіри – $\lambda=295$ нм). Це пояснюється тим, що більш короткохвильове УФВ має більшу енергію фотонів ($UVB = 3,94\text{--}4,43$ еВ, $UVC = 4,43\text{--}12,4$ еВ), яка максимально поглинається тканинами переднього відрізка ока (кон'юнктивою, рогівкою, кришталиком), викликаючи у них виражені фотохімічні зміни, які призводять до первинної денатурації білків рогівки та кришталика, вторинного утворення вільних радикалів, індукції апоптозу, оксидативного стресу та реалізації каскаду запально-дистрофічних патологічних процесів. Вищезазначене експериментально та клінічно проявляється гострими фотокератокон'юнктивітом і хронічними ефектами – птеригій, пінгвекула, кератопатія, ядерна, задньокапсулярна, кортикальна катаракта. Виникнення цих патологічних процесів залежать від добової енергетичної спектральної дози й тривалості опромінення УФВ і механізмів репарації тканин, які визначаються властивостями організму до виведення та нейтралізації продуктів фотохімічних реакцій у тканинах і можливості їх відновлення [5–10, 12, 15, 17, 18].

Крім того показано, що довгохвильове УФВ із меншою енергією фотонів (3,10–3,94

еВ) має здатність проникати у глибокі відділи ока, викликаючи пошкодження сітківки – гостра сонячна ретинопатія, гостра макулодистрофія. Особливо проникнення УФВ і пошкодження сітківки збільшується серед осіб після екстракції катаракти із імплантацією штучного кришталика без УФ-фільтра. З'ясовано, що найчастіше гостру макулодистрофію супроводжує інша патологія, що пов'язана з експозицією УФВ: катаракта, птеригій, пінгвекула [9, 13, 18, 19].

Серед зимівників перших Українських антарктичних експедицій було виявлено ознаки враження органа зору – кон'юнктивіти, хмароподібні катаракти, дегенерації сітківки [2]. Однак поглибленого морфологічного вивчення стану органа зору до теперішнього часу не проводилося. Найвні дослідження з цього питання є поодинокими та фрагментарними [11, 13, 14].

Мета нашої роботи – визначення морфологічних змін органа зору в зимівників Української антарктичної станції «Академік Вернадський», які зумовлені їх експозицією природним УФВ.

МЕТОДИКА

Проводили аналіз експозиційних рівнів природного УФВ, яке патогенно впливає на орган зору зимівників Української антарктичної станції «Академік Вернадський». Для цього використано дані за 2003–2012 рр., отримані супутником «ENVISAT-1» (Environmental Satellite; 2002–2012 рр.; власник: Європейське космічне агентство – ESA), який знаходився на сонячно-синхронній полярній орбіті. Рівні випромінювання та експозиційних доз приземного УФВ на території розміщення станції (–65° південної широти) отримували інструментом “SCIAMACHY”, розташованим на супутнику. Цей інструмент виконував дистанційне спектрометричне зондування зворотньо-розсіяного випромінювання атмосфери у діапазоні 240–2380 нм із спектральною роздільною здатністю 0,5–1,5 нм. Оцінювали

середньодобові показники ультрафіолетового індексу (УФІ) та добову еритемну дозу УФВ.

Морфофункціональний стан органа зору вивчали до відправлення та одразу після повернення 24 зимівників із XVI та XVII Українських антарктичних експедицій (2011–2013 рр.). Програма досліджень включала: оцінку скарг на якість зору (за опитувальником «VFQ-25», США); загальний офтальмологічний огляд із використанням рутинних методів – біомікроскопії, прямої та зворотної офтальмохромоскопії за Водовозовим, гоніоскопії; визначення: гостроти зору за таблицями Сивцева, очного тиску з використанням пневмотонометра. Також поглиблено досліджували оптичну щільність рогівки та кристалика методом денсиметрії, товщину рогівки та стан її ендотелію із використанням пахиметра та ендотеліального мікроскопа; морфологічний стан зорового нерва та шару нервових волокон сітківки з використанням Гейдельбергської ретинальної томографії; морфологічного стану сітківки в макулярній зоні – методом оптичної когерентної томографії, а її чутливість вивчали за допомогою квантитативної периметрії.

Результати дослідження обробляли методами параметричної статистики. Від усіх обстежених було отримано інформовану згоду, відповідно до протоколу дослідження.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експозиційні рівні та дози природного УФВ. Відповідно до супутникових спостережень географічна територія -65° південної широти, на якій розташована станція, характеризується таким режимом природного УФВ (енергетичною опроміненістю): середньодобовий UVI – $2,46 \pm 0,04$ ум. од. ($61,5 \pm 1,00$ мВт/м²), який упродовж 2003–2011 рр. мав коливання від 2,08 до 2,60 ум. од. ($52,0$ – $65,0$ мВт/м²). Інтенсивність УФВ опромінення сягає максимального рівня у грудні – $6,21 \pm 0,04$ ум. од. ($155,25 \pm 1,0$ мВт/м²). «Високий» та «помірний» рівні УФВ (3,0–6,9 ум. од.), які

зумовлюють потребу в захисті від природного УФВ, спостерігаються впродовж «антарктичного літа» (восени та взимку) 6 міс на рік (з вересня по лютий); «дуже високий» та «небезпечний» рівні UVI (7,0–11,0 ум. од.), які потребують підсиленого захисту від УФВ – не реєструються. Середньорічна добова еритемна доза УФВ становить – $1,60 \pm 0,03$ кДж/м² і впродовж 2003–2011 рр. мала коливання від 1,29 до 1,79 кДж/м². Максимального рівня протягом року така доза сягає у грудні – $4,39 \pm 0,03$ кДж/м² на добу (близько 22,0 міжнародної еритемної дози – МЕД, при $1\text{МЕД}_{\text{ФТ-I}} = 0,2$ кДж/м²). Упродовж 7 міс (з листопада по травень) спостерігається дозове навантаження $\geq 0,6$ кДж/м² на добу (≥ 3 МЕД), яке перевищує фізіолого-профілактичний рівень природного УФВ (рис. 1).

Результати супутникового спостереження свідчать, що, починаючи з серпня по листопад, із максимумом вересень – листопад, над Антарктикою спостерігається значна втрата озону у стратосферному шарі атмосфери (утворюється «озонова дірка»), що призводить до зростання UVI (рис. 2). Результатом цього є пікове збільшення над територією знаходження станції UVI до «небезпечних»

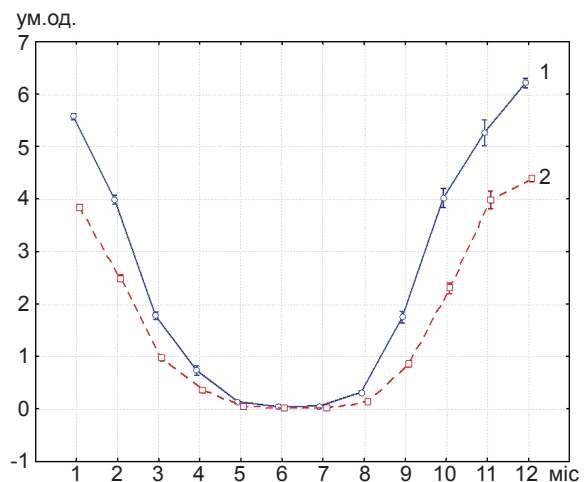


Рис. 1. Міжмісячна динаміка енергетичних характеристик природного ультрафіолетового випромінювання (УФВ) для території розташування української антарктичної станції «Академік Вернадський». -65° південної широти. Супутникове спостереження. 1 – УФВ; 2 – добова еритемна доза

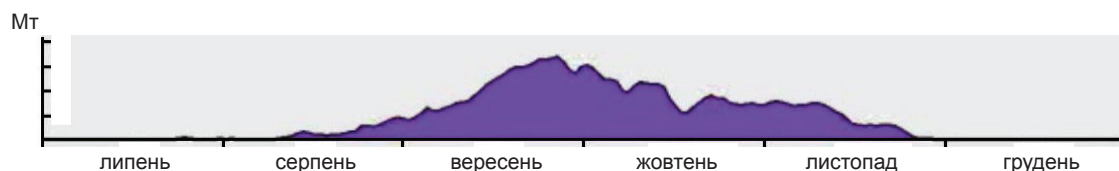


Рис. 2. Динаміка втрат озону у стратосфері протягом року (мегапон) у день найбільшої за площею «озонової дірки» над Антарктикою. Супутникове спостереження

значень (12,0–13,0 ум. од.; 300,0 – 325,0 мВт/м²). Таким чином, можна говорити про формування ризику для здоров'я, зумовленого УФВ, з вересня по лютий.

Морфофункціональний стан органа зору серед зимівників. Офтальмологічне обстеження протягом року зимівників в Антарктиці показало, що якість зору (за опитувальником «VFQ-25») у них не змінилася (табл. 1). Не було також суттєвих змін у центральній гостроті зору, рефракції та гідродинаміці ока (за показниками внутрішньоочного тиску; табл. 2). Не виявлено об'єктивних змін у кон'юнктиві, слъзових органах, повіках і м'язовому апараті очей.

Стан рогівки. Обстежені не пред'являли скарг, які б указували на патологічні зміни у рогівці. При об'єктивному огляді (світлова біомікроскопія) не виявлено виражених ознак її патології. Флуоресцентна біомікроскопія не показала ерозій чи виразок у рогівці.

Методом денситометрії зареєстровані значимі морфологічні зміни у рогівці, які

свідчать про розвиток субклінічної паренхіматозно-ендотеліальної кератопатії, а саме: зменшення центральної товщини рогівки (на 14,3 %, $P < 0,05$), котра знизилася до $458,5 \pm 31,4$ мкм, що є нижчим за популяційну норму (470,0–620,0 нм); зменшення щільності ендотеліальних клітин на її поверхні (на 10,1 %, $P < 0,05$), яке залишалось у діапазоні популяційної норми (1800–3100 клітин/мм²); зменшення на її поверхні кількості ендотеліальних клітин гексагональної форми (на 16,6 %, $P < 0,05$), яке залишалось у діапазоні популяційної норми (30,0–99,0 %). При цьому змін у оптичній щільності рогівки не спостерігалось (табл. 3).

Стан переднього відрізка ока та кришталика. Не було скарг, які б указували на патологічні зміни у передньому відрізку ока чи у кришталику. При об'єктивному огляді передньої камери ока (світлова біомікроскопія, гоніоскопія кута ока) не виявлено ознак її патології.

У разі проведення біомікроскопії кришталика майже в усіх обстежуваних, які повер-

Таблиця 1. Показники якості зору за опитувальником VFQ-25 у членів українських антарктичних експедицій (ум.од.)

| Оціночні шкали | До експедиції | Після експедиції |
|--|---------------|------------------|
| Загальний стан здоров'я | 62,50±19,94 | 64,58±22,51 |
| Загальний рівень бачення | 80,00±12,06 | 75,00±17,32 |
| Очний біль | 91,67±13,41 | 93,75±9,97 |
| Очна працездатність | 93,89±10,72 | 93,22±13,34 |
| Зорова діяльність у даль | 98,33±5,77 | 93,06±14,46 |
| Рольові труднощі, пов'язані із зором | 87,50±14,10 | 85,42±21,21 |
| Соціальна залежність, пов'язана із зором | 100,00 | 98,61±3,24 |
| Обмеження у водінні автомашини | 54,86±42,11 | 39,58±44,26 |
| Кольоровий зір | 100,00 | 97,50±8,66 |
| Периферичний зір | 100,00 | 95,00±11,68 |

Таблиця 2. Морфофункціональні показники стану основних функцій органа зору та рогівки зимівників української антарктичної експедиції

| Показники | Нормативні показники в популяції | До експедиції | Після експедиції | Δ (%) |
|--|----------------------------------|---------------|------------------|-------|
| Гострота зору (з оптичною корекцією), ум.од. | 0,9-1,0 | 0,94±0,06 | 0,98±0,02 | 4,3 |
| Внутрішньоочний тиск, мм рт.ст. | 16,0-22,0 | 16,50±2,72 | 16,00±3,06 | -3,0 |

нулися із експедиції в Антарктику, спостерігалася підсилена дифузна опалесценція всіх його зон. Методом денситометрії зареєстровано значимі морфологічні зміни у кришталику, які свідчать про розвиток субклінічної ядерно-задньокапсулярної катаракти, а саме збільшилися середня (на 10,1 %, $P<0,05$) та

максимальна (на 21,6 %, $P<0,05$) оптична щільність кришталика; оптична щільність заднього відділу кришталика (на 13,1 %, $P<0,05$; табл. 4).

Результати денситометричних профілів кришталика свідчать про розвиток у зимівників помутніть у задніх його відділах – в

Таблиця 3. Динаміка морфологічного стану рогівки у зимівників українських антарктичних експедицій

| Показники | Нормативні показники в популяції | До експедиції | Після експедиції | Δ (%) |
|--|----------------------------------|----------------|------------------|-------|
| Центральна товщина рогівки, мкм | 470,0-620,0 | 534,88±29,84 | 458,46±31,39* | -14,3 |
| Щільність ендотеліальних клітин на/мм ² | 1800-3100 | 2777,58±215,99 | 2497,04±246,85* | -10,1 |
| Гексагональність ендотеліальних клітин, % | 30,0-99,0 | 59,75±4,69 | 49,83±4,33* | -16,6 |
| Оптична щільність рогівки, ум.од. | - | 17,94±1,76 | 18,08±2,31 | 0,8 |

* $P<0,05$.

ядрі та капсулі. У осіб більш молодого віку (до 40 років) спостерігаються переважно задньокапсулярні зміни, а серед осіб після 40 років – ядерні та ядерно-задньокапсулярні.

Стан заднього відрізка ока. Обстежувані не пред'являли скарг, які б указували на патологічні зміни у задньому відрізку ока. При об'єктивному огляді (пряма та зворотна

Таблиця 4. Динаміка морфологічного стану кришталика у зимівників українських антарктичних експедицій (ум.од.)

| Показники | До експедиції | Після експедиції | Δ (%) |
|--------------------------------------|---------------|------------------|-------|
| Оптична щільність кришталика | | | |
| середня | 10,49±1,80 | 11,55±1,82* | 10,1 |
| максимальна | 14,25±5,01 | 17,33±5,42* | 21,6 |
| Оптична щільність відділу кришталика | | | |
| переднього | 8,73±0,78 | 9,13±0,95 | 4,6 |
| заднього | 10,40±2,48 | 11,76±2,09* | 13,1 |
| Оптична щільність ядра кришталика | 8,43±1,98 | 8,62±1,40 | 2,3 |

* $P<0,05$.

офтальмоскопія та офтальмохромоскопія за Водовозовим, світлова біомікроскопія сітківки з макулолінзою) у більш ніж 50 % зимівників виявлено морфологічні ознаки перенесеної гострої сонячної ретинопатії (у вигляді «макулярних рубців» різної інтенсивності).

Результати вивчення стану диска зорового нерва за допомогою Гейдельбергської рети-

нальної томографії не встановили змін до та після повернення із експедиції. Всі показники відповідали популяційній нормі (табл. 5).

Також не було виявлено виражених змін у макулярній ділянці ока із використанням когерентної томографії сітківки. Однак результати комп'ютерної квантитативної периметрії макули на білий колір показали виникнення в учасників Антарктичної екс-

Таблиця 5. Динаміка морфологічного стану диска зорового нерва (ДЗН) у зимівників українських антарктичних експедицій

| Показники | Нормативні показники в популяції | До експедиції | Після експедиції | Δ (%) |
|---|----------------------------------|---------------|------------------|-------|
| Площа ДЗН, мм ² | 1,62-2,43 | 1,89±0,40 | 1,90±0,39 | 0,0 |
| Співвідношення площі екскавації ДЗН до площі ДЗН | 0,07-0,30 | 0,25±0,16 | 0,26±0,14 | 0,0 |
| Форма площі екскавації ДЗН, ум.од. | -0,28 - -0,15 | -0,23±0,06 | -0,22±0,07 | 0,0 |
| Площа нейроретинального обідка ДЗН, мм ² | 1,31-1,96 | 1,33±0,20 | 1,34±0,21 | 0,0 |
| Об'єм нейроретинального обідка ДЗН, мм ³ | 0,30-0,61 | 0,35±0,08 | 0,34±0,09 | 0,0 |
| Висота контуру нервових волокон зорового нерва, мм | - | 0,38±0,05 | 0,37±0,06 | 0,0 |
| Середня товщина нервових волокон зорового нерва, мм | 0,20-0,32 | 0,25±0,04 | 0,25±0,07 | 0,0 |

педиції макулопатії, яка характеризувалася значним зниженням світлочутливості до фотонів ковбчочкових клітин сітківки у 6 разів (P<0,05), що може бути доклінічною ознакою макулодистрофії (табл. 6).

Вищезгадані морфофункціональні зміни вперше у світі показали, що в органі зору (рогівка, кришталік, сітківка) розвиваються інтенсивні патофізіологічні та патоморфологічні процеси, викликані надлишковою

Таблиця 6. Динаміка морфологічного та функціонального стану макули у зимівників українських антарктичних експедицій

| Показники | Нормативні показники в популяції | До експедиції | Після експедиції | Δ (%) |
|--|----------------------------------|---------------|------------------|-------|
| Центральна товщина макули, мкм | 220,5-294,8 | 255,33±17,49 | 254,97±17,87 | 0,0 |
| Об'єм макулярної ділянки, мм ³ | 9,26-10,62 | 10,60±2,12 | 10,64±2,53 | 0,0 |
| Середня товщина макулярної ділянки, мкм | 257,1-295,0 | 282,92±10,20 | 285,96±10,44 | 0,0 |
| Середнє зниження світлочутливості від показника популяційної норми, дБ | ±2,0 | -0,91±0,42 | -6,34±0,77* | 596,7 |

*P<0,05.

експозицію природним УФВ, в основі яких лежить пряме фотохімічне пошкодження тканин ока, а також опосередковані фотохімічні зміни, які зумовили патологічні процеси запалення та дистрофії. Зазначене цілком пояснюється раніш описаними патофізіологічними та патоморфологічними механізмами [7, 18, 19]. Подальші детальні дослідження особливостей цих механізмів можуть стати корисними для розробки фармакологічних заходів профілактики, лікування та реабілітації зорових функцій у осіб, що тривалий час перебувають в екстремальних умовах впливу природного УФВ, а виявлені клінічні зміни є науковим підґрунтям для розробки заходів первинної (гігієнічної) профілактики та раціонального медичного добору осіб для роботи в таких умовах.

Таким чином, проведеним дослідженням з'ясовано, що територію на українській антарктичній станції можна віднести до зони «надвисокого» ризику виникнення патології, зумовленої УФВ. Формування такого ризику серед зимівників спостерігається під час «антарктичного літа» з вересня по лютий, і є найбільш небезпечним з вересня по листопад, коли додатково спостерігається пікове збільшення УФВ, зумовленого формуванням над Антарктикою «озонової дірки». Внаслідок цього працівники можуть отримати максимальну експозиційну дозу УФВ з еритемною та генотоксичною дією.

Результати офтальмологічного дослідження засвідчили, що у зимівників українських антарктичних експедицій під впливом надлишкової експозиції природним УФВ розвиваються зміни в органі зору – паренхиматозно-ендотеліальна кератопатія, ядерно-задньокапсулярна факопатія, макулопатія. Виявлені патологічні стани є до- та субклінічними проявами дистрофії рогівки, катаракти та макулодистрофії.

Встановлені факти та визначені закономірності є основою для розробки диференційованих заходів з комплексної профілактики офтальмологічної патології, зумовленої

УФВ серед працівників, робочі місця яких розташовані на відкритому повітрі як в Україні, так і в умовах української антарктичної експедиції, на що будуть спрямовані подальші дослідження.

Д.В. Варивончик, С.А. Рыков, А.А. Салюков, А.Б. Мишенин, Г.Ю. Пышнов, Е.В. Моисеенко

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНА ЗРЕНИЯ У ЗИМОВЩИКОВ УКРАИНСКОЙ АНТАРКТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «АКАДЕМИК ВЕРНАДСКИЙ»

Исследованием установлено, что территория Антарктики на украинской антарктической станции «Академик Вернадский» относится к зоне «сверхвысокого» риска возникновения офтальмологической патологии, обусловленной ультрафиолетовым излучением (УФИ). Результаты комплексного офтальмологического исследования 24 зимовщиков XVI и XVII украинских антарктических экспедиций (2011–2013 гг.) показали, что у них под воздействием избыточной экспозиции естественным УФИ развиваются специфические изменения в органе зрения – паренхиматозно-эндотелиальная кератопатия, ядерно-заднекапсулярная факопатия, макулопатия. Методом денситометрии роговицы зарегистрированы морфологические изменения: уменьшение центральной толщины роговицы на 14,3 %, уменьшение плотности на 10,1% и количества эндотелиальных клеток гексагональной формы на 16,6 %, ($P<0,05$); в хрусталике зарегистрированы следующие морфологические изменения: увеличение оптической плотности хрусталика: средней зоны на 10,1%, максимальной – на 21,6 %, заднего отдела – на 13,1 %, ($P<0,05$). Результаты денситометрических профилей свидетельствуют о развитии локальных помутнений в задних отделах хрусталика (в ядре и капсуле). Данные компьютерной квантитативной периметрии макулы выявили значительное снижение светочувствительности колбочковых клеток сетчатки в 6 раз ($P<0,05$). У большинства зимовщиков обнаружены морфологические признаки перенесенной острой солнечной ретинопатии. Выявленные патологические изменения являются до-, субклиническими проявлениями дистрофии роговицы, катаракты и макулодистрофии, вызванные специфическим действием естественного УФИ, что требует разработки комплексных мер профилактики.

Ключевые слова: естественное ультрафиолетовое излучение, офтальмологическая патология, Антарктика, зимовщики.

D.V. Varyvonchik, S.O. Rykov, A.O. Salyukov, A.B. Mishenin, G.Y. Pyshnov, E.V. Moiseenko

MORPHOLOGICAL CHANGES OF VISION AMONG WINTERERS IN UKRAINIAN ANTARCTIC STATION «ACADEMICIAN VERNADSKY»

The study revealed that the Antarctic territory in the area of the Ukrainian Antarctic station “Academician Vernadsky” can be referred to the zone of the «super high» risk in developing ophthalmological pathology, caused by ultraviolet radiation. The results of the comprehensive dynamic study of 24 winterers of the XVI and XVII Ukrainian Antarctic expeditions (2011–2013) showed the developing of specific changes in the organ of vision under the exposure to the excessive natural ultraviolet radiation (UVR), such as parenchymatous-endothelial keratopathy, nuclear-posteriorcapsular phacopathy, maculopathy. Morphological changes were recorded using the cornea densitometry method: a decrease of the central cornea thickness by 14,3%, a decrease of the density and the number of endothelial cells of hexagonal type by 10,1% and 16,6 %, respectively ($P<0,05$). Using densitometry method, we detected morphological changes in the lens. Specifically, we found an increase of the optic lens density: in median zone by 10,1 %, in maximal zone by 21,6 %, in posterior part by 13,1 %, $P<0,05$. The results of densitometry recordings point to the development of local opacity in the posterior lens parts (in the nucleus and in the capsule). The data of the computed quantitative macula perimetry showed a significant decrease of light sensitivity of retina conical cells by 6 times ($P<0,05$). The morphological signs of the endured acute solar retinopathy were found in more than 50% winterers. The revealed pathological changes can be considered as pre-, subclinical manifestations of the cornea dystrophy, cataracts and maculodystrophy, caused by specific action of the natural UVR, thus demanding the elaboration of the combined preventive measures.

Key words: natural ultraviolet radiation, ophthalmologic pathology, Antarctic winterers

*Institute of Medicinal Work NAMS of Ukraine, Kyiv;
P.L. Shupyk National Medical Academy of Post-Diploma Education, Kyiv;
National Antarctic Science Center, MPH of Ukraine*

REFERENCES

1. Abraham A., Cox Ch., West Sh. The Differential Effect of Ultraviolet Light Exposure on Cataract Rate across Regions of the Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(8):3919–23.
2. Black A., Gordon M., Heck D., Gallo M. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 2011;81(7):873–80.

3. Chang J., Koo E., Agryn E., Hallak J. Risk factors associated with incident cataracts and cataract surgery in the Age Related Eye Disease Study (AREDS). *Ophthalmology.* 2011;118(11):2113–19.
4. Coroneo M. Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens.* 2011;37(4):214–24.
5. Cullen A. Ozone depletion and solar ultraviolet radiation: ocular effects, a United nations environment programme perspective. *Eye Contact Lens.* 2011;37(4):185–90.
6. Estey T., Chen Y., Carpenter F. Vasiliou Structural and Functional Modifications of Corneal Crystallin ALDH3A1 by UVB Light. *PLoS One.* 2010;5(12):15218.
7. Guly H. Snow blindness and other eye problems during the heroic age of Antarctic exploration. *Wilderness Environ Med.* 2012;23(1):77–82.
8. Kim S., Koh J., Korean J. Mechanisms of Apoptosis on Human Lens Epithelium after Ultraviolet Light Exposure. *Ophthalmol.* 2011;25(3):196–201.
9. Lugg D. Antarctic medicine, 1775-1975. II. *Med J Aust.* 1975;2(9):335–37.
10. Martirosova V., Moiseyenko Y., Pyshnov G. Prevention of ophthalmological pathology in humans in extreme conditions, Methodical recommendations: NAS of Ukraine, NAMS of Ukraine, MoH of Ukraine. Kyiv, 2008. (in Russian)
11. Meyer-Rochow V. Risks, especially for the eye, emanating from the rise of solar UV-radiation in the Arctic and Antarctic regions. *Int J Circumpolar Health.* 2000;59(1):38–51.
12. Richter G., Torres M., Choudhury F., Azen S. Risk Factors for Cortical, Nuclear, Posterior Subcapsular, and Mixed Lens Opacities. *Ophthalmology.* 2012;119(3):547–54.
13. Salyukov A., Varyvonchik D. Assessment of work-related cancer hazard, caused by natural ultraviolet radiation. *Ukr J Occup Health.* 2012;1:8–20. (in Ukrainian)
14. Salyukov A., Varyvonchik D. Assessment of territorial risks of high exposures to natural ultraviolet radiation for the population and for workers, by the data of satellite observations. *Dovkillya ta zdorov'ya.* 2013;2:54–60. (in Ukrainian)
15. Scientific assessment of ozone depletion: 2002, Global Ozone Research and Monitoring Project. Report № 47. WMO – Geneva. 2003.
16. Varma Sh., Kovtun S., Rajeev-Hegde K. Role of UV Irradiation and Oxidative Stress in Cataract Formation. *Eye Contact Lens.* 2011;37(4):233–45.
17. Varyvonchik D., Pykov S., Salyukov D. Assessment of risks of ophthalmological pathology in the population and in workers, exposed to natural ultraviolet radiation. *Ophthalmological.* 2013;2:68–73. (in Ukrainian)
18. Youn H., McCanna D., Sivak J., Jones, L. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 2011;17:237–46.
19. Youssef P., Sheibani N., Youssef P., Albert D. Retinal light toxicity. *Eye (Lond.).* 2011;25(1):1–14.

*ДУ “Ін-т медицини праці НАМН України”, Київ;
Нац. мед. академія післядиплом. освіти ім. П.Л. Шупика, Київ;
Нац. антарктич. наук. центр МОН України
E-mail: getver1@mail.ru*

Матеріал надійшов до редакції 25.01.2013

О.О. Шандра

Вплив дельтарану та мелатоніну на стан імунної системи щурів за умов експериментального контактного дерматиту

Досліджували активність гуморального і клітинного ланок імунітету, а також показників функціональної стабільності лейкоцитів у щурів з експериментальним контактним дерматитом (ЕКД) в умовах комплексної фармакологічної корекції введенням дельтарану і мелатоніну. Дослідження проводили в умовах хронічного експерименту на моделі хроміндукованого ЕКД. Для комплексної фармакологічної корекції показників гуморального і клітинного ланок імунітету, а також стабільності лейкоцитів використали роздільні та сумісні введення дельтарану й мелатоніну. Отримані результати показали, що за умов хроміндукованого ЕКД у щурів відзначаються виражені порушення гуморального і клітинного ланок імунітету, а також змінюється функціональна стабільність нейтрофілів і лімфоцитів. Виявлені порушення функціональної активності імунної системи корегували в умовах сумісного застосування дельтарану й мелатоніну. При цьому активність лікувального комплексу мала потенціуючий характер.

Ключові слова: експериментальний контактний дерматит, імунологічна реактивність, показник пошкодження нейтрофілів, показник пошкодження лімфоцитів, дельтаран, мелатонін, фармакологічна корекція.

ВСТУП

Встановлено залежність стану імунологічної реактивності від тривалості та характеру сну: активність натуральних кілерів зменшується за умов тривалого безсоння, система прозапальних цитокінів залежно від дози та фази циркадіанного ритму викликає як сомногенний, так і протилежний за характером впливи в експериментальних умовах [7].

Мелатонін, який здатен індукувати сон [10], послаблює спровоковані стресом порушення вмісту інтерлейкінів (ІЛ) – ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-2, інтерферону γ , грануломоноцитарного факторів у щурів [2]. Застосування δ -соніндукуючого пептиду (ДСІП) попереджає імунологічні порушення, які викликані стресорним впливом, супроводжується зменшенням числа еозинофілів крові, а також збільшенням кількості лімфоїдних клітин у структурах слизової оболонки дванадцятипалої кишки щурів [8].

© О.О. Шандра

Зважаючи на те, що в патогенезі контактного дерматиту значне місце посідають механізми порушень стану імунологічної реактивності [4], а також визначено типові порушення циклу сон-неспаня за експериментальних умов [3], доцільним було вивчення проявів експериментального контактного дерматиту (ЕКД) на тлі застосування препаратів, які нормалізують циркадіанні ритми.

Метою нашої роботи було вивчення активності гуморальної та клітинної ланок імунологічної реактивності щурів із ЕКД за умов комплексної фармакологічної корекції введенням дельтарану та мелатоніну.

МЕТОДИКА

Робота виконана за умов хронічного експерименту на 72 щурах самцях лінії Вістар віком 3–6 міс і масою від 250 до 320 г. Експериментальних тварин утримували за стандартних

умов віварію та вільним доступом до їжі та води. Досліди проводили з дотриманням основних нормативних та етичних вимог до проведення лабораторних та інших дослідів. Результати досліджень було схвалено етичним комітетом ОНМедУ.

Для відтворення ЕКД щурів сенсibilізували 0,25%-м розчином біхромату калію протягом 20 діб [5]. Вогнище сенсibilізації відтворювали на бічній ділянці спини щура (3x3 см), з якого завчасно вистригали шерстяний покрив [3, 5]. Розчин біхромату калію втирали в ділянку шкіри спини раз на добу протягом 4,5–5,0 хв, для чого використовували марлеві серветки, змочені в розчині біхромату. Тестову дозу алергену наносили на 21-ту добу від початку сенсibilізації на аналогічну ділянку шкіри контрлатерального боку. Виникнення проявів ЕКД контролювали за ознаками запалення, виразність яких оцінювали за шестибальною шкалою [3].

Виділяли наступні групи тварин: I група – контрольні щури (n=9), II – щури із ЕКД без лікування (n=13), III – інтактні щури (n=9), яким вводили дельтаран (0,1 мг/кг; НДІВС з виробництва бакпрепаратів, РФ), IV – щури із ЕКД (n=15), яким з лікувальною метою вводили дельтаран (0,1 мг/кг), V – інтактні щури (n=9), яким вводили мелатонін (10 мкг/кг), VI – щури із ЕКД, яким з лікувальною метою вводили мелатонін дозою 10 мкг/кг (n=15), VII – щури із ЕКД (n=17), яким вводили дельтаран і мелатонін дозами 0,1 та 10 мг/кг відповідно. Препарати вводили внутрішньо-очеревинно. Більша кількість щурів у IV, VI та VII групах пояснюється виконанням спостережень в двох експериментальних серіях.

Через 24 г з моменту аплікації допустимої дози алергену досліджували активність гуморальної та клітинної ланок імунітету щурів, а також показники пошкодження нейтрофілів і лімфоцитів (ППН і ППЛ відповідно). Як величини, які характеризували функціональний стан гуморального імунітету за умов ЕКД, обирали кількість В-лімфоцитів, а також концентрацію імуноглобулінів А, М та G, що робили згідно з загальноприйнятим методом [6]. Число у крові

Т-лімфоцитів, а також їх субпопуляцій, які виконували функції Т-хелперів та Т-супресорів з визначенням чутливості до теофіліну (клітини, які мають супресорно-кілерні властивості, та теофілінрезистентні клітини, яким притаманні хелперно-індукторні властивості) приймали за характеристику функціональної активності клітинного імунітету та вивчали за методом Чернушенка та Когосова [6]. Визначали ППН і ППЛ, які є інформативними щодо функціональної стабільності лейкоцитів у периферичній крові за умов алергічних захворювань [9].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили із застосуванням методу ANOVA та Newman-Keuls тесту при рівні вірогідності $P < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток ЕКД характеризувався виникненням у зоні нанесення розчину біхромату калію помірної гіперемії (1–2 бали), що спостерігалось на 5-ту добу експерименту. Висока виразність місцевих запальних порушень визначалася наприкінці другого тижня аплікацій алергену, коли у тварин з'являлися ерозивно-виразкові зміни, які протягом наступних п'яти аплікацій розвивались у виразні інфільтративно-виразкові ураження (4–5 балів). Нанесення допустимої дози розчину алергену на шкіру з протилежного боку (до цього не проводили аплікацій), викликало виразні запальні зміни з формуванням ерозивно-виразкових елементів (3–4 бали).

На тлі проявів ЕКД суттєво зростала кількість В-лімфоцитів, яка була на 40,1 % вищою за відповідні значення в контрольній групі тварин ($P < 0,01$; табл. 1). Введення інтактним щурам дельтарану та мелатоніну не впливало на число В-лімфоцитів у крові ($P > 0,05$). Після роздільного їх введення щурам із ЕКД значення досліджуваних показників становили $19,6 \pm 1,7$ та $20,4 \pm 1,8$ % відповідно, що було на 28,9 та на 34,2 % більше, ніж у контрольних спостереженнях ($P < 0,05$) і не відрізнялося від значень у щурів із ЕКД без лікування

Таблиця 1. Вплив комплексної фармакологічної корекції на активність гуморального імунітету в щурів із контактним дерматитом (M±m)

| Група тварин | В-лімфоцити, % | Імуноглобуліни (г/л) | | |
|---|----------------|----------------------|---------------|----------------|
| | | A | M | G |
| Контроль (n=9) | 15,2±1,3 | 1,1±0,1 | 1,3 ±0,2 | 5,4 ±0,4 |
| Експериментальний контактний дерматит (ЕКД), n=13 | 21,3±2,2** | 2,4±0,3*** | 2,7 ±0,3** | 8,1 ±0,6** |
| Введення дельтарану (n= 9) | 14,6±1,2 | 1,0±0,1 | 1,4 ±0,2 | 5,1 ±0,3 |
| ЕКД і введення дельтарану (n=15) | 19,6±1,7* | 1,7±0,2*.# | 2,0 ±0,2*.# | 7,6 ±0,6* |
| Введення мелатоніну (n= 9) | 15,4±1,1 | 1,1±0,1 | 1,1 ±0,1 | 5,2 ±0,3 |
| ЕКД і введення мелатоніну (n=15) | 20,4±1,6* | 1,9±0,3** | 1,9 ±0,2# | 7,7 ±0,6* |
| ЕКД, введення дельтарану і мелатоніну (n=17) | 17,6±1,1#,** | 1,3±0,1#,** | 1,4 ±0,1##,** | 6,6 ±0,3*.#,** |

Тут і в табл. 2 *P<0,05, **P<0,01 – вірогідні розбіжності показників порівняно з відповідними показниками в контрольній групі спостережень; #P<0,05, ##P<0,01 – вірогідні розбіжності показників порівняно з відповідними показниками в групі щурів із ЕКД; ***P<0,05 – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групах щурів із ЕКД і роздільним введенням дельтарану та мелатоніну, відповідно.

(P>0,05). Внаслідок сумісного введення дельтарану та мелатоніну щурам із ЕКД кількість В-лімфоцитів виявилася меншою на 17,0 % (P<0,05) порівняно з показниками в щурів із ЕКД без лікування та зі значеннями у групах щурів із ЕКД, яким роздільно вводили дельтаран (на 10,2 %, P<0,05) – та мелатонін (на 13,7 %, P<0,05, див. табл. 1).

Вміст імуноглобулінів у щурів із ЕКД був в 1,5 (IgG; P<0,01), 2,1 (IgM; P<0,01) та 2,2 рази (IgA; P<0,001) більшим порівняно зі значеннями у крові контрольних щурів. Внаслідок роздільного введення дельтарану та мелатоніну вміст IgA і IgM суттєво зменшувався і був на 29,2 та на 26,0 % (у разі введення дельтарану) та на 20,8 і на 29,6 % (у разі введення мелатоніну) меншим порівняно з відповідними показниками у щурів із ЕКД без лікування (P<0,05). Проте роздільне введення вказаних лікарських сполук не змінювало вміст IgG, який зменшувався при застосуванні дельтарану на 6,2 %; а при застосуванні мелатоніну – на 5,0 % (P>0,05). Сумісне їх введення викликало зменшення вмісту IgA (на 45,8 %, P<0,05), та IgM (на 48,1 %, P<0,01), а також IgG (на 18,5 %, P<0,05)

порівняно зі значеннями в щурів із ЕКД без лікування. При цьому вміст імуноглобулінів був достовірно меншим порівняно зі значеннями у щурів з ЕКД за умов роздільного застосування дельтарану та мелатоніну (P<0,05, табл. 1).

У щурів із ЕКД число Т-лімфоцитів було на 31,2 % зниженим порівняно з контролем (P<0,01; табл. 2). При застосуванні як одного дельтарану, так і мелатоніну цей показник залишався більш низьким порівняно з контрольними значеннями – на 23,7 та на 26,7 % відповідно (P<0,05).

Сумісне введення лікарських сполук підвищувало на 36,6 % число Т-лімфоцитів порівняно зі значеннями у щурів із ЕКД без лікування (P<0,05). При цьому також спостерігалися відмінності цього показника порівняно зі значеннями у групах з ЕКД, в яких застосовували окремо дельтаран (на 18,8 %) та мелатонін (на 22,0 %; P<0,05).

Перебіг ЕКД характеризувався також зменшенням числа (на 33,3 %) теофілінрезистентних Т-лімфоцитів (P<0,05) та збільшенням кількості (на 95,7 %) теофілінчутливих Т-лімфоцитів (P<0,01). Число теофілінрезист-

Таблиця 2. Вплив комплексної фармакологічної корекції на активність клітинного імунітету в щурів із контактним дерматитом (M±m)

| Групи тварин | Показники, які характеризують стан клітинного імунітету | | |
|---|---|--|--|
| | Т-лімфоцити, % | Теофілінрезистентні субпопуляції Т-лімфоцитів, % | Теофілінчутливі субпопуляції Т-лімфоцитів, % |
| Контроль (n=9) | 40,1±3,2 | 23,4±1,8 | 14,1±1,4 |
| Експериментальний контактний дерматит (ЕКД; n=13) | 27,6±2,4** | 15,6±1,4* | 27,6±2,2** |
| Введення дельтарану (n= 9) | 38,6±3,1 | 18,2±1,6 | 15,3±1,3 |
| ЕКД і введення дельтарану (n=15) | 30,6±2,3* | 18,9±1,6*,# | 22,7±2,3** |
| Введення мелатоніну (n= 9) | 36,9±3,1 | 18,6±1,5 | 12,7±1,2 |
| ЕКД і введення мелатоніну (n=15) | 29,4±2,2* | 18,6±1,6*,# | 23,3±2,1** |
| ЕКД, введення дельтарану і мелатоніну (n=17) | 37,7±2,7###,*** | 22,8±1,6###,*** | 18,9±1,6###,*** |

тентних Т-лімфоцитів зростало під впливом роздільного введення дельтарану (на 16,7 %), мелатоніну (в 19,2 %) та їхнього сумісного застосування (на 46,2 %) порівняно з відповідними значеннями в групі щурів з ЕКД без лікування (група II; $P < 0,05$). Досліджуваний показник при сумісному використанні препаратів був вищим від такого при окремому застосуванні дельтарану та мелатоніну на 20,6 % та на 22,6 % відповідно ($P < 0,05$).

За умов окремого застосування дельтарану та мелатоніну число теофілінчутливих Т-лімфоцитів перевищувало відповідне значення в групі контролю на 61,0 та на 65,2 % відповідно ($P < 0,01$). При сумісному використанні препаратів перевищення досліджуваного показника становило 34,0 % ($P > 0,05$) і одночасно він був меншим порівняно з такими в групах з використанням одного дельтарану та мелатоніну на 16,8 та на 18,9 % відповідно ($P < 0,05$, табл. 2).

У дослідних щурів ППН та ППЛ в 1,6 та в 2,3 раза перевищували відповідні значення в контрольних спостереженнях ($P < 0,001$; рисунок). Досліджувані показники набували значущих розбіжностей порівняно з такими в групі щурів із ЕКД без лікування лише під впливом сумісного введення дельтарану та мелатоніну. За цих

умов спостерігалось перевищення відповідних значень у контролі на 11 та на 37 % відповідно ($P > 0,05$) при одночасному зменшенні порівняно з ЕКД без лікування на 31 та на 40 % відповідно ($P < 0,05$). При цьому ППЛ залишався більшими за відповідні контрольні показники ($P < 0,05$; див. рисунок). ППН і ППЛ були також значно меншими порівняно з такими в групі із застосуванням самого дельтарану (ППН – на 24 % та ППЛ – на 28 %), а також мелатоніну (ППН – на 35 % та ППЛ – на 32 %; $P < 0,05$).

Клінічні прояви ЕКД за умов сумісного застосування дельтарану та мелатоніну не перевищували 2 бали, водночас при самостійному використанні препаратів спостерігались ерозивні елементи на 20-ту добу спостереження (3 бали).

Таким чином, отримані результати засвідчили, що за умов відтворення ЕКД, викликаного нашкірними аплікаціями розчину біхромату калію, у щурів відбуваються виражені зміни імунологічної реактивності з боку гуморального та клітинного захисту, а також порушується функціональна стабільність лейкоцитів. Показано суттєве зростання кількості В-лімфоцитів, а також імуноглобулінів груп А, М та G. Це вказує на недосконалість гуморальної ланки імунного захисту, разом зі зменшенням кількості Т-лім-

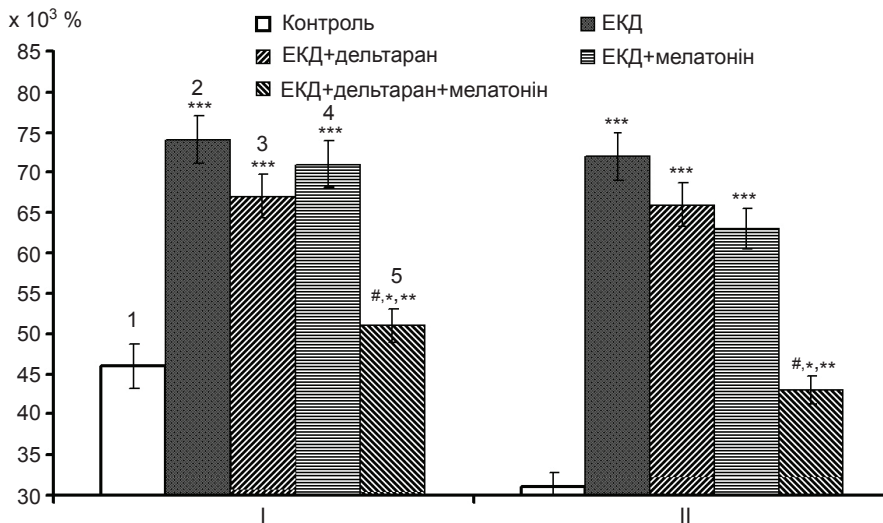
фоцитів і Т-хелперів та зростанням кількості Т-супресорів, що висвітлює недостатню функціональну активність клітинного імунитету. Слід підкреслити, що подібний характер імунологічних зрушень є характерним для ЕКД, викликаного дією сполук хрому [4]. Крім того, встановлено, що функціональна стабільність нейтрофільних лейкоцитів, а також лімфоцитів значно порушена за умов сенсibiliзації до сполук хрому, що також додатково вказує на алергічний компонент відтвореного патологічного стану.

Застосування дельтарану є виправданим через здатність викликати імунокоригувальні впливи, в тому числі за умов формування atopічних алергічних реакцій [1]. Автори зазначають, що ДСП відновлює абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів, а також субпопуляцій $CD3^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ у дітей, які страждають на atopічну бронхіальну астму. Проте в нашому дослідженні роздільне використання дельтарану не супроводжувалося значними позитивними зрушеннями досліджуваних показників імунологічної

реактивності. Разом з тим при його сумісному використанні з мелатоніном спостерігалася виразна коригувальна дія. Подібне потенціювання може пояснюватися комплексним характером впливу мелатоніну [10], в тому числі й при atopічних алергічних станах [11] та його здатністю до корекції хронобіологічних процесів в організмі [10], які мають важливе значення для реалізації ефектів ДСП [1, 8].

Таким чином, експериментальний контактний дерматит призводить до порушень функціональної активності гуморальної та клітинної ланок імунологічного захисту щурів, а також функціональної стабільності лейкоцитів. Зазначені зміни успішно коригуються дельтараном і мелатоніном, що виявляється у потенціюванні їх дії при сумісному використанні.

Результати свідчать про доцільність досліджень ролі центральних механізмів регуляції циклу неспання спання у виникненні ЕКД, а також створюють передумови до використання дельтарану та мелатоніну в комплексному лікуванні хворих на алергічний дерматит.



Вплив комплексної фармакологічної корекції на показники функціональної стабільності лейкоцитів у щурів із експериментальним: I – показники пошкодження нейтрофілів; II – показники пошкодження лімфоцитів; 1 – контроль, 2 – дельтаран, 3 – дерматит і введення дельтарану, 4 – дерматит, введення дельтарану і мелатоніну, 5 – дерматит і введення мелатоніну. * $P < 0,05$ та *** $P < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з відповідними показниками в контрольній групі щурів; # $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з відповідними показниками в групі щурів із ЕКД без лікування; ** $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно зі значеннями у групах щурів із ЕКД та роздільним введенням дельтарану та мелатоніну відповідно

А.А. Шандра

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТАРАНА И МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА

Целью работы было изучение активности гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также показателей функциональной стабильности лейкоцитов у крыс с экспериментальным контактным дерматитом (ЭКД) в условиях комплексной фармакологической коррекции введениями дельтарана и мелатонина. Исследования проводили в условиях хронического эксперимента на модели хроминдуцированного ЭКД. Для комплексной фармакологической коррекции показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также стабильности лейкоцитов использовали отдельные и сочетанные введения дельтарана и мелатонина. Полученные результаты показали, что в условиях хроминдуцированного ЭКД у крыс отмечаются выраженные нарушения гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также нарушается функциональная стабильность нейтрофилов и лимфоцитов. Выявленные изменения функциональной активности иммунной системы регистрировали в условиях совместного применения дельтарана и мелатонина. При этом активность лечебного комплекса имела потенцирующий характер.

Ключевые слова: экспериментальный контактный дерматит, иммунологическая реактивность, показатель повреждения нейтрофилов, показатель повреждения лимфоцитов, дельтаран, мелатонин, фармакологическая коррекция

О.О. Shandra

THE INFLUENCE DELTARAN AND MELATONIN ON IMMUNE SYSTEM IN RATS, WHICH WAS AFFECTED BY EXPERIMENTAL CONTACT DERMATITIS

The aim of the work was investigation of both humoral and cell-mediated immunity together with leukocytes functional stability indexes in rats with the experimental contact dermatitis (ECD) in conditions of complex pharmacological correction using deltaran and melatonin. Experimental trials were performed under conditions of chronic experiment on model chrome-induced ECD. Both deltaran and melatonin either alone or in combination were used for complex pharmacological correction of humoral and cell-mediated immunity and also for stability of leukocytes. The data obtained showed the expressed disturbances of humoral and cell-mediated im-

munity and neutrophils' functional stability damage under conditions of chrome-induced ECD in rats. The revealed alterations in functional activity of the immune system were successfully corrected using the combined administration of deltaran and melatonin. The activity of medical complex had exponential character.

Key words: experimental contact dermatitis, immune reactivity, neutrophil' alteration index, lymphocyte' alteration index, deltaran, melatonin, pharmacological correction.

Odessa National Medical University

REFERENCES

1. Koryakina O. V., Kovtun O. P., Tuzankina I. A. Immunological status of children with epilepsy and the possibility of using delta - sleep inducing peptide with the aim of immunomodulation. System integration in healthcare. 2008; **1** (1): 17-22.
2. Kalinichenko L. S., Pertsov S. S., Koplik E. V. Effect of melatonin on serum cytokine profile in rats with different parameters of behavior in acute emotional stress. Bulletin eksp.biol.med. 2013; **11**: 569-573.
3. Lebedyuk M. N., Shandra A. A. The peculiarities of sleep-wake cycle in rats with modelling contact dermatitis. Integr.Anthropology. 2010; **2** (16): 58 – 62.
4. Mamyrbayev A. A. Toxicology of chromium and its compounds. 2012; Aktobe, Kazakhstan. 284.
5. Raben A. S., Alekseeva O. G., Duyeva L. A. Experimental allergic contact dermatitis. M.: Medical. 1970; 190.
6. Chernushenko E. F., Kogosova L. S. Immunology and Immunopathology of lung diseases. K.: Health. 1981; 208.
7. Irwin M. Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. Brain, Behavior, and Immunity. 2002; **16**: 503–512.
8. Ivanova E. A., Koplik E.V. Changes in duodenal lymphoid structures in rats with different levels of behavioral activity treated with delta sleep-inducing peptide and during acute emotional stress. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2011; **41** (5): 515-519.
9. Favor C. Lytic effect bacterial products on lymphocytes of tuberculous clinics. Z. Immunol. Forsch. 1969; **137**(1-3): 249-254.
10. Mishima K. Melatonin as a regulator of human sleep and circadian systems. Nihon Rinsho. 2012; **70**(7):1139-1144.
11. Lin G.J., Huang S.H., Chen S.J. et al. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. 2013; **14** (6): 11742-11766.

Одеськ. нац. мед. ун-т

E-mail: shandra@tm.odessa.ua

Матеріал надійшов до редакції 19.08.2013

Л.А. Могильницька

Вміст ендотеліального моноцитаактивуєчого пептиду II у сироватці крові при цукровому діабеті 2-го типу

Ендотеліальна дисфункція лежить в основі розвитку макросудинних ускладнень цукрового діабету та атеросклерозу. Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид II (EMAP-II) – це мультифункціональний поліпептид з прозапальною та антиангіогенезною активністю. Виявлено підвищення його вмісту в сироватці крові хворих на цукровий діабет 2-го типу як з ожирінням, так і з нормальною масою тіла, а також у осіб з ожирінням, що не страждають на цукровий діабет. Також цей показник корелював зі вмістом глікозильованого гемоглобіну, глюкози крові, індексом маси тіла, загального холестерину, ліпопротеїдів низької щільності, ліпопротеїдів високої щільності, тригліцеридів. Підвищення вмісту EMAP-II може бути одним з механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.

Ключові слова: EMAP-II, цукровий діабет, ендотеліальна дисфункція.

ВСТУП

Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид II (EMAP-II) – це мультифункціональний поліпептид з прозапальною та антиангіогенезною активністю. Він викликає прокоагулянтні зміни на поверхні ендотеліальних клітин, посилює експресію E- та P-селектину, а також туморнекротичного фактора α , впливає на міграцію моноцитів і нейтрофілів, а також індукує апоптоз в ендотеліальних клітинах [17].

EMAP-II демонструє широкий спектр біологічних функцій. У численних дослідженнях показано протипухлинні та антиангіогенезні його властивості [8, 9]. Окрім того, він блокує рецептори васкулоендотеліального фактора росту, пригнічуючи проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, що також може бути одним з механізмів протипухлинної активності [1]. Одразу після виділення EMAP-II було описано його здатність регулювати прокоагулянтні функції ендотеліальних клітин, імовірно, через вплив на тканинний

фактор, а також хемотаксичний вплив на моноцити, гранулоцити. Ці дослідження *in vitro* підтверджуються прозапальною дією ін'єкцій EMAP-II *in vivo* [3]. Також було показано пряму дію цього поліпептиду на міграцію лейкоцитів і підвищення вмісту внутрішньоклітинного кальцію при активації клітин. Вплив на моноцити та ендотеліальні клітини було проаналізовано більш детально для виявлення всіх молекулярних чинників цього процесу [4]. В ендотеліальних клітинах EMAP-II викликає експресію E- та P-селектину, виділення фактора Віллебранта та продукцію туморнекротичного фактора моноцитами [4].

Крім описання численних функцій EMAP-II, значна увага приділяється механізмам, що лежать в основі цих функцій. Оскільки ендотеліальні клітини є одним з основних органів-мішеней для EMAP-II, то вивчались механізми впливу на ці клітини.

У дослідженнях з використанням інгібіторів ангіогенезу було виявлено можливі мішені для EMAP-II в ендотеліальних клітинах –

протеїни, що беруть участь у перетвореннях актину [5]. В основі здатності ЕМАР-II пригнічувати неоангіогенез, лежить блокування адгезії ендотеліальних клітин і фібронектину в результаті безпосереднього зв'язування ЕМАР-II з інтегрином [11]. Антиангіогенезні властивості цього поліпептиду реалізуються також через пригнічення активності індукованого гіпоксією фактора $\alpha 1$ [12].

Індуковане гіпоксією підвищення вмісту ЕМАР-II дозозалежно впливає на міграцію ендотеліальних прогеніторних клітин і поповнення ними зон ішемії. Так, ЕМАР-II діє на реваскуляризацію та відновлення тканини міокарда при інфаркті. Вихідна його експресія в неушкодженому міокарді мінімальна та переважно локалізується в периваскулярній стромі. Через 6 год після розвитку інфаркту його експресія послідовно підвищується в ділянці запальної клітинної інфільтрації та зберігається протягом тижня. Через 6 тиж експресія ЕМАР-II підвищується в фібробластах, що локалізуються в аваскулярному сполучнотканинному рубці та сприяє реваскуляризації зони ушкодження [13].

Вважають, що вазодилатація, яка відбувається під час ЕМАР-II-індукованого запалення, пов'язана з оксидом азоту. Це було продемонстровано на легеневих артеріях. При блокаді оксиду азоту L-NAME інгібітором NO-синтази, ЕМАР-II-індукована вазодилатація ослаблювалася [15]. Таким чином, його вплив на ендотеліальні клітини може лежати в основі розвитку ендотеліальної дисфункції. Проте в літературі немає даних про роль цього поліпептиду при цукровому діабеті.

Оскільки ендотеліальна дисфункція є однією з основних причин розвитку макрота мікросудинних ускладнень цукрового діабету, а функціональний стан ендотелію характеризується з одного боку ендотеліозалежною релаксацією, а з іншого – вмістом ендотеліальних вазоактивних факторів, то метою нашого дослідження було вивчити вміст ЕМАР-II у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2-го типу.

МЕТОДИКА

Обстежено 108 осіб, 58 жінок і 50 чоловіків, з яких 64 хворих на цукровий діабет 2-го типу, котрі були розподілені на такі групи: 32 хворих з ожирінням і 32 – з нормальною масою тіла, та 44 особи, які не страждають на цукровий діабет, серед них 22 особи з нормальною масою тіла та 22 особи з ожирінням. Усі обстежені були відповідні за віком, статтю та індексом маси тіла. Клініко-лабораторна характеристика хворих представлена в таблиці.

Осіб, які отримують препарати, що потенційно здатні впливати на функціональний стан ендотелію, а саме: гіполідемічні засоби, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, блокатори рецепторів до ангіотензину II, блокатори кальцієвих каналів, нітрати, гормональні контрацептивні засоби та препарати замісної гормональної терапії, не обстежували.

Серед хворих на цукровий діабет із ожирінням артеріальна гіпертензія була у 27 (84,4 %) осіб, у пацієнтів з діабетом і нормальною масою тіла – у 14 (43,75 %). У людей без діабету підвищення артеріального тиску спостерігалось у 18 (81,8 %) осіб з ожирінням і у 9 (40,9 %) – з нормальною масою тіла. Непроліферативна ретинопатія була виявлена у 42 (65,62 %), препроліферативна – у 19 (29,68 %), проліферативна – у 3 (4,68 %) осіб; 10 (15,6 %) хворих на цукровий діабет страждали мікроангіопатією судин нижніх кінцівок 1-ї стадії, 36 (56,25 %) – 2-ї стадії, 8 (12,5 %) – 3-ї стадії. Діабетична полінейропатія діагностована у 54 (84,37 %) хворих, у 33 (51,56 %) чоловіків та 21 (32,81 %) жінок. Протеїнурична стадія діабетичної нефропатії була у 5 (15,6 %) хворих на цукровий діабет 2-го типу з ожирінням, у 9 (28,1 %) хворих з нормальною масою тіла.

Мікроальбумінурію діагностували за вмістом альбуміну в сечі 30–300 мг/добу у 16 (50 %) хворих з ожирінням, у 16 (50 %) з нормальною масою тіла та у 7 (31,8 %) осіб з ожиріння без цукрового діабету.

Клініко-лабораторна характеристика обстежених осіб

| Показник | Контрольна група (n = 22) | Цукровий діабет з ожирінням (n = 32) | Ожиріння (n = 22) | Цукровий діабет з нормальною масою тіла (n = 32) |
|---|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|--|
| Вік, роки | 50,81±6,8 | 52,56±7,66 | 51,31±5,42 | 53,25±5,52 |
| Індекс маси тіла, кг/м ² | 22,73±1,85 | 36,51±3,75 | 36,38±3,49 | 23,1±2,41 |
| Глюкоза крові, ммоль/л | 4,65±0,8 | 9,71±2,25 | 4,6±0,89 | 9,61±2,83 |
| Глікозильований гемоглобін, % | 5,25±0,44 | 9,9±1,72 | 5,74±0,34 | 9,41±2,29 |
| Загальний холестерин, ммоль/л | 3,83±0,66 | 6,61±1,66 | 6,13±1,69 | 6,3±1,61 |
| Ліпопротеїди високої щільності, ммоль/л | 1,4±0,2 | 0,98±0,15 | 0,99±0,11 | 1,08±0,2 |
| Ліпопротеїди низької щільності, ммоль/л | 2,3±0,2 | 3,7±0,8 | 3,5±0,4 | 3,2±0,8 |
| Тригліцериди, ммоль/л | 1,66±0,3 | 2,75±0,81 | 2,36±0,57 | 2,34±0,79 |

Глікемію визначали натще безпосередньо в тих зразках венозної крові, що використовували для подальших досліджень. Вміст ЕМАР-II обраховували імуноферментним методом із використанням сорбційних колонок “Amprer” (“Amersham Lifesilence”) та тест-систем “Amersham pharmacia biotech” (Великобританія). Дослідження проводили на площковому ELISA-аналізаторі “Stat Fax-303 Plus” (США).

Результати представлені як середнє ± стандартне відхилення. Статистичну обробку проводили за допомогою стандартного пакета розрахунку даних програми Microsoft Excel 2003. Достовірність відмінностей середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента. Відмінність вважали достовірною при $P < 0,05$. Кореляційний аналіз між рядами показників робили, використовуючи коефіцієнт Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами виявлено, що вміст ЕМАР-II у сироватці крові хворих на цукровий діабет 2-го типу з ожирінням становить $4,85 \pm 2,22$ нг/мл, з нормальною масою тіла – $4,07 \pm 2,4$ нг/мл, а з ожирінням без цукрового діабету – $2,51 \pm 1,56$ нг/мл. У гру-

пі людей без діабету з нормальною масою тіла цей показник становить $1,46 \pm 0,65$ нг/мл (рисунок). При аналізі отриманих результатів нами виявлено його підвищення у хворих на цукровий діабет 2-го типу з ожирінням на 45,31 % ($P < 0,005$) порівняно з особами з ожирінням, що не страждають цією хворобою. Вміст ЕМАР-II у сироватці крові хворих на діабет з нормальною масою тіла статистично достовірно вищий на 64,12 % в порівнянні з групою осіб з нормальною масою тіла без діабету ($P < 0,005$). Отже, цей показник достовірно вищий у хворих як з ожирінням, так і з нормальною масою тіла порівняно з відповідними групами осіб без діабету. Це вказує на те, що цукровий діабет 2-го типу супроводжується підвищенням вмісту ЕМАР-II, а також на можливий вплив гіперглікемії на розвиток указаних зрушень.

Припущення про роль гіперглікемії у підвищенні вмісту ЕМАР-II підтверджується кореляційним аналізом, в результаті якого виявлено статистично достовірний прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та рівнем глікемії у хворих на цукровий діабет 2-го типу: з ожирінням $r = 0,58$ ($P < 0,05$), з нормальною масою тіла $r = 0,69$ ($P < 0,05$).

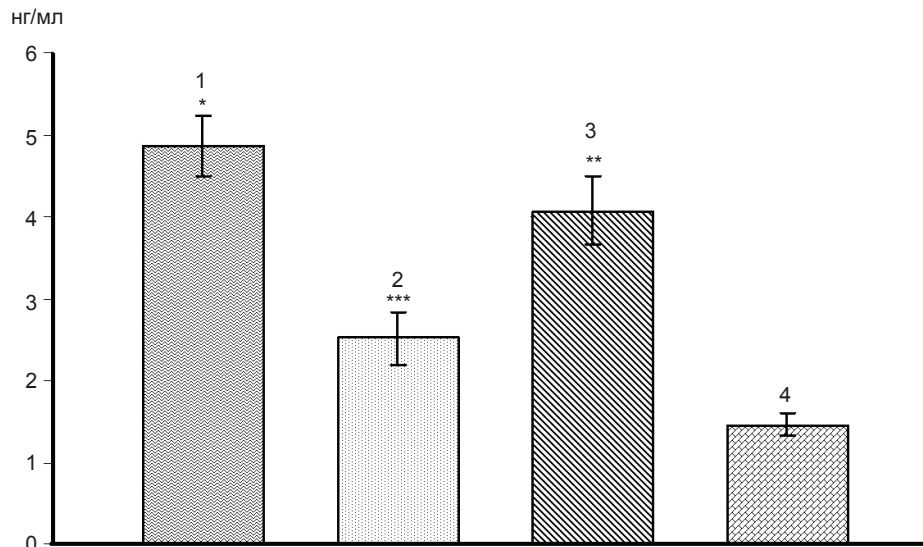
У хворих на цукровий діабет виявлено також статистично достовірний прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та глікозильованого гемоглобіну: з ожирінням $r=0,56$ ($P<0,05$), з нормальною масою тіла $r=0,67$ ($P<0,05$). Також нами встановлено ($P<0,05$) підвищення вмісту ЕМАР-II в сироватці крові осіб з ожирінням порівняно з контрольною групою осіб з нормальною масою тіла без цукрового діабету на 41,83 %. Припущення про вплив ожиріння на підвищення вмісту ЕМАР-II як у хворих з цукровим діабетом 2-го типу, так і без нього підтверджуються даними кореляційного аналізу. Нами виявлено прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та індексом маси тіла у хворих на цукровий діабет 2-го типу з ожирінням та в осіб з ожиріння без діабету. Коефіцієнт кореляції становив 0,5 ($P<0,05$) та 0,87 ($P<0,05$) відповідно. Вказані зміни можуть бути пов'язані з порушеннями ліпідного обміну у осіб з ожирінням як з діабетом, так і без нього. Припущення про роль дисліпідемії у підвищенні вмісту ЕМАР-II підтверджується даними кореляційного аналізу.

Нами виявлено також статистично достовірний прямий кореляційний зв'язок між

вмістом ЕМАР-II та загального холестерину у хворих з ожирінням $r=0,43$ ($P<0,05$), з нормальною масою тіла $r=0,54$ ($P<0,05$). У обстежених встановлено також статистично достовірний прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та тригліцеридів у сироватці крові: з ожирінням $r=0,76$ ($P<0,05$), з нормальною масою тіла $r=0,47$ ($P<0,05$). Показано статистично достовірний зворотний кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та ліпопротеїдів високої щільності: з ожирінням $r=-0,57$ ($P<0,05$), з нормальною масою тіла $r=-0,22$ ($P<0,05$).

Таким чином, результати кореляційного аналізу вказують на зв'язок між дисліпідемією та вмістом ЕМАР-II в сироватці крові хворих з ожирінням і з нормальною масою тіла.

У групі осіб з ожирінням, що не хворіють на цукровий діабет, виявлено прямий кореляційний зв'язок між вмістом загального холестерину та ЕМАР-II в сироватці крові. Коефіцієнт кореляції при цьому був відповідно $r=0,7$ ($P<0,05$), а також між вмістом ЕМАР-II та тригліцеридів ($r=0,91$; $P<0,05$). Зворотний кореляційний зв'язок був між вмістом ЕМАР-II та ліпопротеїдів низької щільності ($r=0,47$; $P<0,05$).



Вміст моноцитарноактивного пептиду II в сироватці крові: 1 – цукровий діабет 2-го типу з ожирінням, 2 – ожиріння без діабету, 3 – цукровий діабет 2-го типу з нормальною масою тіла, 4 – контроль. * $P<0,005$ – статистично достовірна відмінність між хворими на цукровий діабет з ожирінням та з ожирінням без діабету; ** $P<0,005$ – з нормальною масою тіла та з нормальною масою тіла без діабету; *** $P<0,005$ – між особами з ожирінням без діабету та контролем

Таким чином, результати кореляційного аналізу вказують на зв'язок між дисліпідемією та вмістом ЕМАР-II в сироватці крові у осіб з ожирінням, що не страждають на цукровий діабет.

У результаті нашого дослідження виявлено підвищення вмісту ЕМАР-II у хворих як з ожирінням, так і з нормальною масою тіла, а також у осіб з ожирінням, що не страждають на цукровий діабет. Встановлено, що ушкодження ендотелію відіграє головну роль у розвитку атеросклеротичного ураження артерій [14].

In vivo зміна концентрації циркулюючих ендотеліальних продуктів може вказувати на ендотеліальну активацію та дисфункцію на доклінічній стадії [10]. Так, концентрація циркулюючого фактора Віллебранда підвищується у осіб із різними ризиками серцево-судинної патології [40]. Вміст таких циркулюючих продуктів, як адгезивні молекули Р- та Е-селектину, міжклітинні адгезивні молекули та CD-31, може бути раннім провісником ендотеліальної активації ще до розвитку атеросклеротичного процесу [14].

Фактор Віллебранда необхідний для ініціації адгезії тромбоцитів у ділянці ендотеліального пошкодження. Разом з тим спонтанний синтез туморнекротичного фактора має тісний регресивний зв'язок з концентрацією фактора Віллебранда, а структурні зміни ендотеліальних клітин при інкубації з туморнекротичним фактором можуть негативно впливати на їх бар'єрну функцію [2, 14].

З іншого боку, ЕМАР-II потужно впливає на ендотеліальні клітини. Він здатний регулювати їхні прокоагулянтні функції, а також має хемотаксичну дію на моноцити, гранулоцити. [6], викликає експресію Е- та Р-селектину, виділення фактора Віллебранта та продукцію туморнекротичного фактора [7], апоптоз ендотеліальних клітин, пригнічує проліферацію, васкуляризацію та неоангіогенез. Тим самим може сприяти порушенню функціонального стану ендотелію.

Таким чином, підвищення вмісту ЕМАР-

II, яке було виявлено в результаті нашого дослідження у хворих на цукровий діабет 2-го типу як з ожирінням так і з нормальною масою тіла, а також при ожирінні без діабету, може бути одним з чинників розвитку ендотеліальної дисфункції та активації при згаданих патологічних станах і вказувати на роль гіперглікемії у розвитку досліджуваних зрушень.

Жирова тканина відіграє важливу роль у патогенезі метаболічного синдрому, провокуючи запалення, гіпертензію та дисліпідемію, які в свою чергу призводять до цукрового діабету 2-го типу, атеросклерозу, тромбозу [14]. Абдомінальна жирова тканина, що асоціюється з центральним ожирінням, є характерною ознакою метаболічного синдрому та основним джерелом надмірного надходження вільних жирних кислот, що сприяє розвитку інсулінорезистентності та порушенню функції β -клітин [10].

Нами виявлено підвищення вмісту ЕМАР-II у осіб з ожирінням як хворих на цукровий діабет 2-го типу так і без цукрового діабету, що може вказувати на роль ожиріння в розвитку цих зрушень. Такі припущення підтверджуються даними кореляційного аналізу, що виявив прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II в сироватці крові та індексом маси тіла.

Можливо, підвищення вмісту ЕМАР-II у сироватці крові у осіб з ожирінням без діабету пов'язане з дисліпідемією, що виявляється в цій групі. Адже порушення ліпідного обміну відіграє важливу роль у ініціюванні та прогресуванні атеросклерозу, а також розвитку ендотеліальної дисфункції [16]. Дисліпідемію виявляли і в інших людей з підвищеним вмістом ЕМАР-II, а саме у хворих на цукровий діабет 2-го типу з ожирінням та з нормальною масою тіла.

Проведений нами кореляційний аналіз підтверджує ці припущення та вказує на зв'язок між вмістом загального холестерину, тригліцеридів та підвищенням вмісту ЕМАР-II у хворих на цукровий діабет 2-го типу з

ожирінням і з нормальною масою та у осіб з ожирінням без діабету.

Л.А. Могильницкая

СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО МОНОЦИТАКТИВИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА II В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

Эндотелиальная дисфункция лежит в основе развития макрососудистых осложнений сахарного диабета и атеросклероза. Эндотелиальный моноцитаактивирующий полипептид II (EMAP-II) – это многофункциональный полипептид с провоспалительной и антиангиогенезной активностью. Выявлено повышение его содержания в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2-го типа как с ожирением, так и с нормальной массой тела, а также у пациентов с ожирением без сахарного диабета, которое коррелировало с содержанием гликозилированного гемоглобина, глюкозы крови, индексом массы тела, общего холестерина, липопротеидов низкой плотности, липопротеидов высокой плотности, триглицеридов. Повышение содержания EMAP-II может быть одним из механизмов развития эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете 2-го типа.

Ключевые слова: EMAP-II, сахарный диабет, эндотелиальная дисфункция.

L.A. Mogylnytska

SERUM LEVELS OF ENDOTHELIAL MONOCYTE-ACTIVATING POLYPEPTIDE-II IN TYPE 2 DIABETES

Endothelial dysfunction is implicated in the pathogenesis of macrovascular complications of diabetes and atherosclerosis. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II) is a multifunctional polypeptide with proinflammatory and antiangiogenic activity. The aim of this study was to investigate the serum level of EMAP-II in obese and non-obese patients with type 2 diabetes. We found an increase of serum level of EMAP-II in obese diabetic patients compared to obese subjects without diabetes. Similar alterations were observed also in non-obese diabetic patients compared to control subjects. Moreover, it was significant elevation of serum EMAP-II in obese patients without diabetes compared to control subjects. In obese and non-obese patients with diabetes it was a significant correlation between HbA_{1c}, blood glucose, body mass index and levels of EMAP-II, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides and EMAP-II. In obese non-diabetic patients it was significant correlation between BMI, triglycerides, total cholesterol and EMAP-II. The revealed change of EMAP-II serum level reflects an endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Hyperglycemia, dyslipidemia and obesity appear to be significant factors

contributing to elevation of EMAP-II level.

Key words: EMAP-II, diabetes, endothelial dysfunction.

Regional Hospital, Khmelnytsky

REFERENCES

1. Awasthi N., Schwarz M.A., Verma V., Cappiello C., Schwarz R.E. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Lab Invest.* 2009; **89**(1): 38-46.
2. Fajardo L.F., Kwan H.H., Kowalski J., Prionas S.D., Allison A.C. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1992; **140**: 539-544.
3. Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S.K., Kayton M.L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrad R., Greenberg S., et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem.* 1994; **269**(40):25106-19.
4. Kao J., Fan Y.G., Haehnel I., Brett J., Greenberg S., Clauss M., Kayton M., Houck K., Kiesel W., Seljelid R., et al. A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyteactivating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1994; **269**(13):9774-82.
5. Keezer S.M., Ivie S.E., Krutzsch H.C., Tandle A., Libutti S.K., Roberts D.D. Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin. *Cancer Res.* 2003; **63**(19):6405-12.
6. Nührenberg T.G., Langwieser N., Schwarz J.B., Hou Y., Frank P., Sorge F., Matschurat S., Seidl S., Kastrati A., Schömig A., Clauss M.A., Zohlnhöfer D. EMAP-II downregulation contributes to the beneficial effects of rapamycin after vascular injury. *Cardiovasc Res.* 2008; **77**(3): 580-589.
7. Park S.G., Kang Y.S., Ahn Y.H., Lee S.H., Kim K.R., Kim K.W., Koh G.Y., Ko Y.G., Kim S. Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem.* 2002; **277**(47):45243-48.
8. Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I., Grygorenko V.N. Cooperative antitumor effect of endothelial-monocyte activating polypeptide II and flutamide on human prostate cancer xenografts. *Exp Oncol.* 2011; **33**(4):231-34.
9. Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. *Exp Oncol.* 2007; **29**(4):267-71.
10. Schror K. Blood vessel wall interactions in diabetes. *Diabetes.* 1997; **46**(2):115-8.
11. Schwarz M.A., Zheng H., Liu J., Corbett S., Schwarz R.E. Endothelialmonocyte activating polypeptide II alters fibronectin based endothelial cell adhesion and matrix assembly via alpha5 beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 2005; **311**(2):229-239.

12. Tandle A.T., Calvani M., Uranchimeg B., Zahavi D., Melillo G., Libutti S.K. Endothelial monocyte activating polypeptide-II modulates endothelial cell responses by degrading hypoxia-inducible factor-1-alpha through interaction with PSMA7, a component of the proteasome. *Exp Cell Res.* 2009; **315**(11):1850-59.
13. Thompson J.L., Ryan J.A., Barr M.L., Franc B., Starnes V.A., Schwarz M.A. Potential role for antiangiogenic proteins in the myocardial infarction repair process. *J Surg Res.* 2004; **116**(1):156-64.
14. Tooke J.E. Possible pathophysiological mechanisms for diabetic angiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2000; **14**(4):197-200.
15. Tsai B.M., Wang M., Clauss M., Sun P., Meldrum D.R. Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: a novel effect for a proinflammatory cytokine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; **287**(4):767-71.
16. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J.* 1997; **18**(E):19-29.
17. Van Horssen R., Eggermont A.M., ten Hagen T.L. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; **17**(5):339-48.

Хмельницька обласна лікарня
E-mail: mliliya@list.ru

Матеріал надійшов до
редакції 10.04.2013

К.І. Богуцька, Ю.І. Прилуцький, Д.М. Ноздренко

Використання алюмінію та його сполук у біомедичних дослідженнях

Враховуючи нанорозмірність функціональних компонентів живих клітин, застосування нанотехнологій у біомедичних дослідженнях наразі актуальне завдання. Одним з таких напрямків є використання наночастинок алюмінію для молекулярної діагностики, адресної доставки лікарських засобів, розробки нових фармпрепаратів. Розглянуто дію хлориду алюмінію на регуляторні механізми скорочення гладеньких і скелетних м'язів, а також вплив іонів алюмінію на АТФазну активність і суперпреципітацію актоміозину різних типів м'язів.

Ключові слова: алюміній, скорочення, м'язи.

ВСТУП

Відомо, що алюміній та його сполуки виявляють токсичну дію на живі організми завдяки їх надходженню та акумуляції в органах і тканинах, що супроводжується порушенням нормальних обмінних процесів і розвитком патології [17, 22, 23, 31]. Джерелом надходження алюмінію до організму можуть бути його комплекси з поліфенолами рослинного походження, питна вода, їжа, різні косметичні засоби, фармацевтичні препарати (адсорбівні, антацидні, захисні та знеболювальні) та вакцини. Так, алюміній входить до складу медичних препаратів, зокрема алмагелю, фосфалюгелю, смекти, маалоксу, гасталу, гастралюгелю, алюгастрину, антациду, алюмагу, які мають антацидну активність (знижують кислотність шлункового соку) та обволікаючий ефект, сприяючи захисту слизової оболонки шлунка. Наприклад, силікат алюмінію (біла глина, каолін) і палений галун застосовують зовнішньо, як правило, у вигляді присипок, мазей і паст у лікуванні шкірних захворювань. Гідроксид алюмінію застосовують внутрішньо як антацидний

засіб за виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки, гострих і хронічних гіперацидних гастритах і харчових отруєннях. У складі вакцин алюміній, у вигляді фосфату або гідроксиду, використовують як ад'ювант, що сприяє підсиленню та подовженню імунної відповіді на введення антигенів [6, 34].

Для деяких регіонів України комбінована дія на організм малих доз опромінення та інтоксикації алюмінієм є актуальною проблемою [28]. Значна увага, наприклад, приділяється дослідженню впливу на організм людини і тварин фосфіду алюмінію, який широко використовують у складі пестицидів, зокрема інсектицидів і родентицидів (зооцидів), що може призводити до отруєння організму загалом [12, 26].

Нині важливим залишається вивчення молекулярних механізмів впливу алюмінію на центральну нервову, кісткову, скоротливу та серцево-судинну системи організму людини. В літературі описано деякі патології, викликані дією алюмінію [16, 22, 23]: легеневий алюміноз, алюмінієва діалізна енцефалопатія, алюмінієва остеодистрофія, його нако-

© К.І. Богуцька, Ю.І. Прилуцький, Д.М. Ноздренко

пичення в центральній нервовій системі та відкладання при хворобі Альцгеймера тощо. Також до патології, зумовленої підвищеним вмістом алюмінію в організмі людини, відносять накопичення його в серці, внаслідок чого порушується ритмічна діяльність [19]. Останніми роками можна прослідкувати зв'язок між зростанням кількості злоякісних новоутворень та виробництвом і застосуванням алюмінію: жодна речовина чи хімічний елемент не дає таких статистично достовірних даних, як алюміній та його похідні. Так, значно збільшилася захворюваність на рак легенів – у золі однієї сигарки вміст алюмінію сягає 100 мг, а у димі – близько 1 мг. Тому наразі його розглядають як універсальний канцероген. Механізм виникнення лімфо- та ретикулосарком пов'язують з блокуванням паратгормону, завдяки накопиченню алюмінію у клітинах парацитоподібної залози, що призводить до втрати кальцію і початку остеомалачії. Взагалі, з віком у курців, працівників асбесто-цементних та алюмінієвих заводів алюміній накопичується у слизовій оболонці шлунка, легенях, печінці, нирках та інших органах, що також може призвести до розвитку злоякісних пухлин. Високі концентрації цього металу можуть затримуватись у кістках і м'язах у вигляді нерозчинних фосфатів. Його відкладення може стати причиною хронічних болей у м'язах (міалгій), які важко піддаються лікуванню і, можливо, є одним з факторів у розвитку розсіяного склерозу. Що стосується впливу іонів алюмінію на механізми м'язового скорочення, то з аналізу літературних даних можна зробити припущення, що його дія може бути спрямована як на нервово-м'язову передачу, так і безпосередньо на скоротливий апарат м'язів.

Використання наночастинок алюмінію у біомедицині. Нині інтенсивно розвивається новий напрямок біомедичного використання наночастинок металів, зокрема і алюмінію, які характеризуються унікальними фізико-хімічними та фармакологічними властивостями, відмінними від звичайних сполук цих ме-

талів [1, 17]. Так, у травматології та ортопедії застосовують розроблені сполуки Al-C-O, які мають алюмінієву матрицю з рівномірно розподіленими у ній наночастинками Al_4C_3 і Al_2O_3 . Передбачається, що завдяки високій чистоті матеріалу та інертності до кісткових і м'язових тканин оксиду і карбиду алюмінію, цей матеріал є прийнятним для зовнішнього і внутрішнього остеосинтезу [30].

Нанодротинки Al_2O_3 , нанесені на поверхню медичних імплантатів, сприяють адгезії остеобластів та підвищують їх біосумісність з тканинами людини. Нанорозмірні мембрани з анодованого оксиду алюмінію можуть бути заселені живими клітинами з обох боків. При цьому прямого контакту між клітинами не відбувається, однак вони обмінюються молекулами, розмір яких корелює з розміром пор у мембрані. Застосування таких мембран у медицині для вирощування шарів клітин дуже зручне, оскільки вони є світлопроникними і можуть бути досліджені із застосуванням оптичного мікроскопа. Наразі ці нанорозмірні мембрани успішно застосовують для вирощування клітин шкіри. Живу тканину з мембрани легко видаляють і переносять безпосередньо на рану. Можна також не відділяти клітини від мембрани, а розміщувати імплантат мембраною назовні. Алюмінієва підкладка не заважає обміну речовин між повітрям і тканиною, проте захищає рану від проникнення мікроорганізмів [24].

Також відомо, що деякі фоточутливі сполуки алюмінію можуть пригнічувати розмноження штамів деяких мікроорганізмів [7]. Частинки Al_2O_3 розміром 30–103 нм здатні послаблювати синтез мРНК, викликати проліферацію клітин і порушення функцій мітохондрій [2].

Таргентна доставка лікарських засобів – один з напрямків застосування наночастинок гідроксиду алюмінію [17, 35]. Досліджено емнісні характеристики наносфер $-AlO(OH)$, що утворюються змішуванням двох рідинних фаз (води і жиру) з формуванням міцел. Основним у формуванні наносфер є ядро, на

якому надалі наростає оболонка преципітату наноелементів, переважно алюмінію. Надалі ядерна основа вилучається, утворюються порожнисті сфери діаметром 30 нм і завтовшки 5–6 нм. У разі наповнення таких сфер діючою речовиною (лікарськими засобами) подальше їх звільнення відбувається зі зміною осмотичного тиску. Дослідження методом фотолюмінесценції показали, що такі сфери – стійкий засіб транспорту діючої речовини, що витримує центрифугування. Така речовина вивільнюється у разі впливу на міцелу органічних кислот [5]. На основі сполук наноалюмінію створено каркасні таблетки з пролонгованою дією, що забезпечують точне, тривале та контрольоване дозування хімічних реагентів і каталізаторів для доставки в організм. Неорганічний нанопористий адсорбент Neusilin US2 (Fuji Chemical Industries Co. Ltd.) – це сполука оксидів алюмінію та магнію; порошок нетоксичний і складається з високопористих сферичних елементів із середнім розміром 110 нм і площею поверхні 370–420 м². Такий матеріал можна спресовувати у формі таблеток [29].

Наночастинки алюмінію мають властивість візуально, кількісно й якісно виступати як біомаркери за допомогою концентрування та посилення сигналу від них. Вони захищають біомолекули від деградації [10]. Підтверджено, що магнітні наночастинки, вкриті «липкими» фрагментами (антитілами, ділянками ДНК), отримують сигнал від незначної кількості біомолекул, який можна реєструвати для діагностики захворювання. На одну наночастинку можна «посадити» кілька таких фрагментів, що дає змогу одночасно виявляти декілька захворювань [18].

Контрастні речовини у медицині застосовують для візуалізації таких органів, які при звичайному рентгенологічному дослідженні не дають достатньої щільності тіні і тому погано диференціюються від органів і тканин, що їх оточують. Наночастинки алюмінію, міді, заліза, які залучаються в обмінні процеси організму, посилюють ефективність кон-

трастних речовин. Завдяки своїм розмірам, формі, площі поверхні та її стабільності такі наночастинки можуть накопичувати контраст саме там, де це необхідно для діагностики патологічного процесу. Їх можна візуалізувати за допомогою різних методів: магнітного резонансу, ультразвуку, флюоресценції, комп'ютерної та ядерної томографії [35].

Проте використання наночастинок алюмінію у біомедичних цілях можливе лише за умов всебічного дослідження токсикологічних аспектів їх впливу на організм людини і тварин. Особливо це стосується вмісту сполук алюмінію у питній воді та зростання споживання харчових продуктів, які забруднені цим металом [11, 13, 36]. Нині існують дані, інколи навіть протилежні, щодо токсичності наночастинок сполук алюмінію для клітин різних біооб'єктів [14, 18, 27, 32, 33, 37, 38].

Розчинні у воді сполуки алюмінію всмоктуються на рівні дванадцятипалої кишки та шлунка і, зв'язуючись з білками, через 24 год після прийому їжі потрапляють у кров. До 40–50 % введеного алюмінію затримується в організмі упродовж близько 300 діб. При прийомі всередину токсичний вплив на людину деяких сполук цього металу спостерігається за таких доз: ацетат алюмінію – 0,2–0,4 мкг/кг, гідроксид алюмінію – 3,7–7,3 мг/кг, алюмокалієві галуни – 2,9 мг/кг. Для людини летальною вважається доза 1,3–6,2 г/добу.

Модульовальна дія хлориду алюмінію на регуляторні механізми скорочення гладеньких м'язів. Вивчали дію розчину хлориду алюмінію на регуляторні процеси скорочення гладеньких м'язів саесум та вивільнення Ca²⁺ з ріанодинчутливого депо саркоплазматичного ретикулума гладеньком'язових клітин [8, 9, 20]. Встановлено, що хлорид алюмінію підсилює порівняно з контролем фазний компонент гіперкалієвої (60 ммоль/л) контрактури гладеньком'язових смужок. За концентрації цієї речовини 10⁻⁵ моль/л показник скорочення перевищував контроль більше ніж у 1,5 раза, а за концентрації 10⁻⁶ – більше ніж удвічі. Відмивання нормальним розчином Кребса

м'язових препаратів відновлювало фазний компонент скорочення гладеньком'язових смужок, викликаного гіперкалієвим розчином. Отримані результати свідчать про модулювальну дію хлориду алюмінію на потенціалкерований вхід іонів кальцію з позаклітинного середовища до цитоплазми міоцитів.

Дію розчину хлориду алюмінію на гладенькі м'язи саесум суттєво, як було встановлено у дослідях, модулюють флавоноїди, зокрема кверцетин. Під його впливом ефекти іонів алюмінію на гіперкалієву контрактуру проявлялися вже за концентрації 10^{-11} моль/л. За цих умов сила фазного компонента скорочення, викликаного гіперкалієвим розчином Кребса, порівняно з контролем збільшувалась більше ніж у 2,5 раза. Спостерігали збільшення кофеїнвикликаних скорочень гладеньком'язових смужок. Зростання концентрації комплексу до 10^{-7} моль/л викликало пригнічення сили кофеїнової контрактури. Відмивання м'язових препаратів нормальним розчином Кребса повністю не відновлювало як фазний компонент гіперкалієвої контрактури, так і силу кофеїнового скорочення [9, 20]. Ці результати свідчать про здатність хлориду алюмінію у комплексі з кверцетином проникати в міоцити і модулювати механізми вивільнення іонів кальцію з внутрішньоклітинних депо.

Вплив хлориду алюмінію на динамічні показники скорочення скелетних м'язів. Вивчали дію хлориду алюмінію у діапазоні концентрацій 10^{-2} – 10^{-6} моль/л для встановлення значення доз, які викликають зміни динамічних показників скорочення [15]. Доведено, що розчини хлориду алюмінію за концентрацій, нижчих від 10^{-4} моль/л не впливали на функціонування скелетно-м'язових препаратів. Внаслідок дії на м'язові волокна розчинів хлориду алюмінію сила та довжина м'язових волокон у досліджуваному діапазоні концентрацій поступово зменшувались, однак у концентраціях 10^{-2} , 10^{-3} і 10^{-4} моль/л спостерігали нелінійний характер цих характеристичних кривих. Зміни силової відповіді та амплітуди довжини м'язового скорочення

за дії хлориду алюмінію дають можливість стверджувати про вибіркового характер його впливу на скоротливі елементи. Припускається, що використання $AlCl_3$ викликає оборотні реакції в ланцюзі генерації сили актоміозиним комплексом.

Оскільки, як зазначалось вище, комбінації флавоноїдів з металами характеризуються кращою проникністю через мембрани, були проведені дослідження їх впливу на скорочення скелетних м'язів. Зокрема, встановлено, що суміш розчинів 10^{-5} моль/л кверцетину та 10^{-6} моль/л $AlCl_3$ викликала помітне зменшення сили та довжини м'язового скорочення [15]. При дослідженні впливу суміші 10^{-3} моль/л рутину та 10^{-4} моль/л $AlCl_3$ виявлено поступове зменшення сили та зміни довжини м'язового скорочення, а для суміші розчину 10^{-3} моль/л рутину та 10^{-3} моль/л $AlCl_3$ встановлено суттєве зменшення змін м'язового скорочення.

Отже, комплекси іонів алюмінію з флавоноїдами характеризуються значною синергетичною інгібуючою дією щодо динаміки м'язового скорочення.

Вплив іонів алюмінію на АТФазну активність і суперпреципітацію (СПП) актоміозину серцевого, гладеньких і скелетних м'язів. Встановлено [3, 4, 21], що іони алюмінію за певних концентрацій значною мірою пригнічують перебіг АТФазної реакції міозину серцевого м'яза. Для АТФазної реакції міозину гладеньких м'язів виявлено подвійний ефект, а саме активацію і гальмування [2].

СПП пов'язана з функціонуванням актоміозинової АТФази. Враховуючи, що гідроліз АТФ здійснюється міозином, можна очікувати, що структурні перебудови, які спостерігаються в період утворення інтермедіатів міозину, будуть проявлятися і при СПП актоміозину.

Вивчали кінетичні криві реакції СПП актоміозину серцевого м'яза за наявності різних концентрацій іонів алюмінію [3, 4]. Так, при додаванні до реакційної суміші АТФ реєстрували реакцію СПП, яка характеризувалася поступовим зростанням оптичної

щільності актоміозину з подальшим виходом на плато. Додавання 10^{-5} моль/л $AlCl_3$ не призводило до помітної зміни швидкості та ступеня СПП, яка спостерігалася при додаванні до актоміозину лише АТФ. При підвищенні концентрації іонів алюмінію до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л перебіг реакції СПП змінювався: на кривих СПП актоміозину з'являлася рефрактерна фаза (це досить сповільнена фаза незначного зростання оптичної щільності актоміозину без помітних преципітуючих структур), яка переходила у швидку фазу зростання оптичної щільності. Остання в свою чергу завершувалася виходом кінетичних кривих реакції СПП на плато. За концентрації іонів алюмінію 10^{-3} моль/л реакція СПП пригнічувалася повністю.

При взаємодії іонів алюмінію з актоміозини скелетних м'язів також відслідковувалася певна залежність показників СПП від концентрації згаданих катіонів [3, 21]. При додаванні до актоміозину АТФ реакція СПП проходила порівняно швидко. У тому разі, коли реакційна суміш містила 10^{-4} моль/л іонів алюмінію, спостерігалася значне зростання ступеня СПП і зменшення швидкості її реакції. Преципітат, що утворювався під час реакції, був нестійким і здатним до зсідання. Подальше підвищення концентрації іонів алюмінію до $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л супроводжувалося значним зниженням швидкості реакції СПП актоміозину та утворенням стійкого до зсідання преципітату. За більш високих концентрацій іонів алюмінію швидкість реакції СПП знову збільшувалася, але її ступінь значно зменшувався. При взаємодії актоміозину з Al^{3+} у концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л і більше реакція СПП повністю пригнічувалася, на користь чого свідчив той факт, що оптична щільність актоміозину впродовж досліду залишалася на вихідному рівні.

Отже, СПП актоміозину серцевого м'яза була більш сповільненого характеру порівняно зі скелетними м'язами. Разом з тим характер впливу іонів алюмінію на СПП актоміозину серцевого м'яза подібний до того,

який проявлявся у разі актоміозину скелетних м'язів, а саме: за певних значень концентрацій іони алюмінію сповільнювали реакцію СПП актоміозину та зменшували її ступінь, а за більш високих концентрацій вона пригнічувалася. Таким чином, іони алюмінію можуть суттєво впливати на скоротливий комплекс білків скелетних і серцевого м'язів.

Отже, літературні дані доводять, що малі концентрації алюмінію та його сполук можуть бути біомаркерами, контейнерами для транспортування ліків, компонентами нових фармпрепаратів. Вони здатні значною мірою впливати на скорочення м'язів, зокрема пригнічувати реакцію СПП актоміозину серцевого та скелетних м'язів, а також активувати/інгібувати АТФазну реакцію міозину різних типів м'язів. Ці ефекти мають важливе значення у подальших дослідженнях впливу алюмінію та його сполук на функціональний стан тих чи інших органів і тканин організму для корекції викликаних ними патологій.

**Е.И. Богуцкая, Ю.И. Прилуцкий,
Д.Н. Ноздренко**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЮМИНИЯ И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Учитывая наноразмерность функциональных компонентов живых клеток, применение нанотехнологий в биомедицине сейчас актуальная задача. Одним из таких направлений является использование наночастиц алюминия для молекулярной диагностики, адресной доставки лекарственных средств, разработки новых фармпрепаратов. Рассмотрено действие хлорида алюминия на регуляторные механизмы сокращения гладких и скелетных мышц, а также влияние ионов алюминия на АТФазную активность и суперпреципитацию актомиозина различных типов мышц.

Ключевые слова: алюминий, сокращение, мышцы.

K.I. Bogutska, Yu.I. Prylutsky, D.M. Nozdrenko

THE USE OF ALUMINUM AND ITS COMPOUNDS IN THE BIOMEDICAL PURPOSES

Taking into consideration the nanodimension of functional components of living cells, the application of nanotechnology

in the biomedical purposes is currently an urgent task. One of these directions is the use of aluminum nanoparticles for molecular diagnostics, targeted delivery of drugs, the development of new pharmaceuticals. The action of aluminum chloride on the regulatory mechanisms of smooth and skeletal muscle contraction and also the effect of aluminum ions on the ATPase activity and superprecipitation of actomyosin of different types of muscles is discussed.

Key words: aluminum, contraction, muscles.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

REFERENCES

- Andrusishina I.N. Metal nanoparticles: ways of receiving, physical and chemical properties, methods of research and toxicity assessment. *Modern Problems Toxicol* 2011; **3**: 5-14.
- Bogutska K. Comparative studies of modulating ion aluminum ATP-ase activity of cardiac myosin and smooth muscle. *Bulletin of Kiev National Taras Shevchenko University. Biology* 2012; **60**: 25-7.
- Bogutska K.I., Danilova V.M., Minchenko P.G., Sheremet L.P., Miroshnichenko M.S. Influence of aluminium ions on superprecipitation of the cardiac and skeletal muscle actomyosin. *Biopolymers and cell* 2003; **19**(4): 362-6.
- Bogutska K.I., Prylutskyi Yu.I., Sklyarov Yu.P. The influence of aluminum ions on actomyosin superprecipitation and myosin ATPase activity in cardiac muscle. *Ukrainica Bioorganica Acta* 2011; **9**(2): 41-5.
- Buchold D.H., Feldmann C. Nanoscale gamma-AIO(OH) hollow spheres: synthesis and container-type functionality. *Nano Lett* 2007 Nov; **7**(11): 3489-92.
- Clapp T., Siebert P., Chen D., Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J Pharm Sci* 2011 Feb; **100**(2): 388-401.
- Dastjerdi R., Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010 Aug 1; **79**(1): 5-18.
- Davidovskaya T.L., Bogutska K.I. Modulatory effect of aluminum ions on smooth muscle contraction. *Neurophysiology* 2003; **35**(3/4): 342.
- Davidovskaya T.L., Bogutska K.I., Minchenko P.G., Miroshnichenko N.S. Modulatory effect of aluminium and its complex with quercetin of muscle contractile regulatory mechanisms. *Biopolymers and cell* 1998; **14**(6): 534-9.
- Geho D.H., Lahar N., Ferrari M., Petricoin E.F., Liotta L.A. Opportunities for nanotechnology-based innovation in tissue proteomics. *Biomed Microdevices* 2004 Sep; **6**(3): 231-9.
- Gura K.M. Aluminum contamination in products used in parenteral nutrition: has anything changed? *Nutrition* 2010 Jun; **26**(6): 585-94.
- Gurjar M., Baronia A.K., Azim A., Sharma K. Managing aluminum phosphide poisonings. *J Emerg Trauma Shock* 2011 Jul; **4**(3): 378-84.
- Hernández-Sánchez A., Tejada-González P., Arteta-Jiménez M. Aluminium in parenteral nutrition: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2013 Mar; **67**(3): 230-8.
- Kim I.S., Baek M., Choi S.J. Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2010 May; **10**(5): 3453-8.
- Kotsan I.Ya., Miroshnichenko M.S., Makarchuk M.Yu., Nozdrenko D.M., Melnichuk O.M. Influence of aluminium compounds on the muscle fiber contraction. «*Biomaterials-2008*». *Conf materials* 2008: 101-106.
- Kumar V., Gill K.D. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Arch Toxicol* 2009 Nov; **83**(11): 965-78.
- Loomba L., Scarabelli T. Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates. *Ther Deliv* 2013 Sep; **4**(9): 1179-96.
- Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharm* 2007 Mar; **150**(5): 552-8.
- Mehrpour O., Jafarzadeh M., Abdollahi M. A systematic review of aluminium phosphide poisoning. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012 Mar; **63**(1): 61-73.
- Miroshnichenko M.S., Davidovskaya T.L., Nuryshchenko N.E., Bogutska K.I. Influence of aluminium compounds on the smooth muscles functioning and skeletal muscle contractile proteins. «*Biomaterials-2008*». *Conf materials* 2008: 97-101.
- Miroshnichenko M.S., Minchenko P.G., Shuba M.F. Aluminium impact on actomyosin precipitation. *DAN of Ukr* 1993; **6**: 78-81.
- Nayak P. Aluminium: impacts and disease. *Environ Res* 2002 Jun; **89**(2): 101-15.
- Peto M.V. Aluminium and iron in humans: bioaccumulation, pathology and removal. *Rejuvenation Res* 2010 Oct; **13**(5): 589-98.
- Poinern G.E.J., Ali N., Fawcett D. Progress in nano-engineered anodic aluminum oxide membrane development. *Materials* 2011; **4**(3): 487-526.
- Prabhakar P.V., Reddy U.A., Singh S.P., Balasubramanyam A., Rahman M.F., Indu Kumari S. et al. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2012 Jun; **32**(6): 436-45.
- Proudfoot A. Aluminium and zinc phosphide poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 2009 Feb; **47**(2): 89-100.
- Radziun E., Dudkiewicz Wilczyńska J., Książek I., Nowak K., Anuszczyńska E.L., Kunicki A. et al. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicol In Vitro* 2011 Dec; **25**(8): 1694-700.
- Rudenko S.S., Ozerova I.O., Ribitzka M.M., Voloshchuk K.O. The influence of aluminum intoxication and γ -irradiation on the state of body's antioxidant system and the possibility of its managing. *Ukr Biokhim Zh* 1998; **70**(2): 84-8.

29. Ruhland T., Nielsen S.D., Holm P., Christensen C.H. Nanoporous magnesium aluminometasilicate tablets for precise, controlled, and continuous dosing of chemical reagents and catalysts: applications in parallel solution-phase synthesis. *J Comb Chem* 2007 Mar-Apr; **9**(2): 301-5.
30. Shalunov E.P., Matrosov A.L., Shvedov M.A. Granulated aluminum nanocomposition materials in extreme conditions of operation. II Russ Conf Nanomatter «NANO 2007»; 2007: 406-7.
31. Skalniy A.V., Rudakov I.A. Bioelements in medicine. Moscow: «Onix 21 Century», 2004: 272 p.
32. Stanley J.K., Coleman J.G., Weiss C.A., Steevens J.A. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. *Environ Toxicol Chem* 2010 Feb; **29**(2): 422-9.
33. Sun J., Wang S., Zhao D., Hun F.H., Weng L., Liu H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles. *Cell Biol Toxicol* 2011 Oct; **27**(5): 333-42.
34. Tomljenovic L., Shaw C.A. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem* 2011; **18**(17): 2630-7.
35. Wickline S.A., Lanza G.M. Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. *Circulation* 2003 Mar 4; **107**(8): 1092-5.
36. Willhite C.C., Ball G.L., McLellan C.J. Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water. *Crit Rev Toxicol* 2012 May; **42**(5): 358-442.
37. Yamamoto Y., Katoh Y., Sato T. Determination of aluminum in various biological materials using instrumental neutron activation analysis. *Leg Med (Tokyo)* 2009 Apr; **11** Suppl 1: S440-2.
38. Zhang X.Q., Yin L.H., Tang M., Pu Y.P. ZnO, TiO₂, SiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci* 2011 Dec; **24**(6): 661-9.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: biophys@univ.kiev.ua

Матеріал надійшов
до редакції 10.04.2013

Т.В. Романюк, І.Я. Дзюбановський, О.В. Кузів

Патофізіологічні механізми формування синдрому портальної гіпертензії

В огляді літератури наведено сучасні уявлення про провідні патофізіологічні механізми формування синдрому портальної гіпертензії, а також про етіопатогенетичні фактори розвитку таких основних ускладнень, як варикозне розширення вен стравоходу, кардії шлунка з кровотечею з них, асцити, гіперспленізму.

Ключові слова: патогенез, синдром портальної гіпертензії, ускладнення синдрому портальної гіпертензії.

Синдром портальної гіпертензії (ПГ) супроводжує цілу низку захворювань різної етіології, об'єднаних єдиним патофізіологічним фактором – стійким збільшенням портосистемного градієнта тиску понад 10 мм рт.ст., що проявляється стійким підвищенням портального тиску та зниженням швидкості кровотоку у ворітній вені, а відтак – розвитком портокавальних шунтів (ПКШ) з варикозним розширенням вен стравоходу та шлунка, кровотечею з них, спленомегалією і гіперспленізмом, набряково-асцитичним синдромом, гепаторенальним синдромом і портосистемною енцефалопатією, вторинним гемороєм з ректальною кровотечею [15].

Вважається, що збільшення печінкового судинного опору зумовлене (теорія backward flow) функціональним станом синусоїдів (дисбаланс таких місцеводіючих вазоактивних речовин, як оксид азоту (NO), ендотелін-1 (ET-1), норадреналін, ангіотензин II (А II), тромбоксан А2, фактор активації тромбоцитів, лейкотрієни тощо) і статичним фактором – порушення архітекτονіки печінки (фіброз і формування вузлів регенерації) [9, 10].

Ініціювальними факторами збільшення печінкового судинного опору є пошкодження гепатоцитів; сенсibilізовані макрофаги, що продукують прозапальні цитокіни, хемокі-

ни, активація тромбоцитів; ендотеліальні клітини, які синтезують ET-1. За участю цих факторів відбувається адгезія нейтрофілів на поверхні гепатоцитів і синусоїдальних клітин з формуванням мононуклеарних інфільтратів у паравазальному просторі. Щодо сенсibilізації макрофагів і ендотеліоцитів до вторинних індукторів запалення і насамперед до ендотоксину грамнегативної мікрофлори, то саме віруси гепатитів В, С, а також алкоголь, інші токсичні речовини відіграють основну роль, даючи поштовх до хронізації процесу. Вважається, що джерелом ендотоксинемії, як правило, є кишечник, а ендотоксин – звичний компонент нормального складу портальної крові [9, 10].

Іншим таким фактором є дисфункція ендотелію синусоїдів, пов'язана з дисбалансом між вазоактивними медіаторами (в основному, між ET-1 і NO). Вміст ET-1 збільшується, як і кількість ендотеліальних рецепторів (ET_a і ET_b). Норадреналін і ET-1 викликають скорочення безпосередньо зірчастих клітин, що значно збільшує портальний судинний опір. У ранні фази активації зірчастих клітин печінки рецептори ET_a – провідні, але в подальшому більш значущими стають рецептори ET_b. Власне стимуляція перших призводить до скорочення і проліферації клітин Іто, тоді

як збудження рецепторів ET_B сприяє їх антипроліферативної активності та розслаблення. NO як місцеводіючий вазодилатор зменшує судинний опір. Так, показано, що активність NO-синтази (NOS) при цирозі печінки зменшується, що сприяє нестачі NO [9, 10, 29].

Доведена патогенетична роль недостатньої продукції клітинами Купфера монооксида вуглецю (CO), оскільки вплив CO на зірчасті та ендотеліальні клітини викликає розширення синусоїдів і зменшення печінкового судинного опору. Поряд з CO і NO, сірководень (H_2S) – третій газ, який регулює мікроциркуляцію в печінці. Його продукція за участю ферментів цистатіонін-у-ліази і цистатіонін- β -синтази розслаблює зірчасті клітин печінки. При цирозі печінки вироблення цих ферментів (і, відповідно, H_2S) знижується, що сприяє скороченню синусоїдів [10, 12, 26].

Важливу роль у патогенезі ПГ відіграє АП, що призводить до скорочення синусоїдів печінки. Джерелом АП є зірчасті клітини, активність і кількість яких підвищена в результаті збільшеної експресії ангіотензинперетворювального ферменту [10, 22]. Підтверджено патогенетичне значення уротензину II, який окрім потужного судинозвужувального ефекту, має мітогенний і фіброгенний потенціал. Експресія як уротензину II, так і його рецептора GPR14 на ендотеліальних клітинах при цирозі печінки підвищена [10, 21]. Вазоконстрикторний вплив на мікроциркуляцію печінки має активація тромбоцитів, продукція яких клітинами Купфера при цирозі печінки також збільшена [5, 10]. Цьому впливу сприяє продукція клітинами Купфера простагландину F2, тромбоксану A2 і лейкотрієну D4 [10, 14]. Загальновідома системна судинопресорна дія катехоламінів, що забезпечує ефект, зв'язуючись з α -, β -рецепторами. Локальну судинопресорну дію має синтезований зірчастими клітинами печінки норадреналін, впливаючи на α 1-адренорецептори ворітної вени [10, 28].

У результаті зміни структури мембрани і під впливом цитокінів росту (трансфор-

муючого фактора росту- β 1 (TGF- β 1) і тромбоцитарного фактора росту (PDGF), що виділяються мононуклеарами, рухливість зірчастих клітин збільшується. Це ремодулює синусоїди, стимулює їхню фіброгенну активність, що призводить до гіперпродукції позаклітинного матриксу в зоні мононуклеарного інфільтрату [9, 10, 20]. За участю фібробластів, попередниками яких у печінці є клітини Іто, синусоїдальний простір проростає сполучною тканиною. Накопичення колагенів I, III і IV типів у просторі Діссе «капіляризує» фіброгенез і порушує мікроциркуляцію печінки. Ці зміни – основа розвитку ПГ [9, 10].

Отже, зміна архітектури печінки внаслідок дифузного фіброзу та формування вузлів регенерації, а також порушення метаболізму місцеводіючих вазоактивних речовин, зокрема NO та ET-1, підвищують порталний судинний опір [3, 15].

Портальний кровотік формується між двома капілярними системами (мікроциркуляторне русло кишечника та синусоїди печінки) і тому дуже залежить від опору у них [8, 9]. Гемодинамічне перевантаження в спланхнічному судинному руслі порушує мікроциркуляцію в стінці тонкої кишки, де відбувається перерозподіл кровотоку у напрямку від слизової оболонки до м'язової. Гіпоксія слизової оболонки стимулює вироблення VEGF і активацію ендотеліальної NOS (eNOS) [10]. Це може бути раннім молекулярним сигналом, який запускає каскад реакцій, що призводить до розвитку гіпердинамічного циркуляторного статусу [9, 16, 23]. Гіпердинамічний циркуляторний статус внутрішньоорганного кровотоку відповідає другій теорії формування ПГ (forward flow), коли збільшується серцевий викид і зменшується периферичний судинний опір, що сприяє легеневій гіпертензії, лівошлуночкової недостатності кровообігу, хронізації і прогресуванню ПГ [16, 18, 23].

Подальше підвищення вмісту eNOS і збільшення активності білка теплового шоку (Hsp90) призводить до системної вазоди-

латації і внутрішньоорганного венозного застою. Крім того, гіперпродукція VEGF і NO за участю NADPH-оксидази, NO-1 і фактора індукваного гіпоксією, сприяє індукції спланхнічного ангіогенезу [2, 10, 20, 24]. Останній відіграє провідну роль у розвитку портосистемного колатерального кровообігу, який є компенсаторним механізмом, спрямованим на декомпресію підвищеного портального тиску [4, 10]. Характерно, що формування ПКШ мало впливає на зниження портального тиску, оскільки через гіпердинамічний циркуляторний статус кровотоку, що супроводжується посиленням серцевого викиду, зменшенням периферичного судинного опору, розкриваються артеріо-венозні комунікації [10, 13]. Внаслідок розвитку артеріо-портальних шунтів формується синусоїдальний блок з артеризацією кровотоку в печінці. Останнє утруднює приплив портальної крові та підвищує портальний тиск [1].

Однією із патогенетичних ланок цих порушень є надходження через мережу ПКШ судинорозширювальних речовин, які зазвичай метаболізуються печінкою (зокрема, глюкагон, передсердний натрійуретичний пептид, ендоканабіноїди, ендотоксин), збільшення вироблення ендотелієм місцеводіючих вазодилаторів (простацикліну, NO, CO, аденомедуліну, H₂S тощо) [10, 13, 18].

Спланхнічне повнокров'я внаслідок вазодилатації і внутрішньоорганного венозного застою знижує ефективний об'єм крові. Розвивається тенденція до артеріальної гіпотонії, що викликає активацію ренін-ангіотензин-альдостеронової та симпатичної нервової системи. Однак, незважаючи на підвищений вміст ендогенних вазоконстрикторів (норадреналіну, ET-1, AT II), чутливість до них судин значно знижена, що зумовлено зменшенням активності протеїнкінази C при гіперпродукції NO [5, 6, 10].

Встановлено, що при ПГ спостерігається істотна атрофія симпатичної нервової системи по всьому брижовому судинному басейні, що викликає прогресування спланх-

нічної вазодилатації. Можливим поясненням цього може бути локальне зниження функції таких нейротропінів, як фактор росту нервів і нейротропін-3 [7, 10]. До того ж підвищена експресія нейрональної NOS за участю Hsp90 у периваскулярних нейронах брижових артерій може бути додатковим чинником релаксації гладеньких м'язів судин брижі при ПГ [10, 25].

Важливим патогенетичним фактором виникнення ПГ є недостатня пропускна здатність нижньої порожнистої вени при формуванні колатерального кровотоку як за рахунок фіксації її в ригідному діафрагмальному кільці, так і внаслідок здавлення печінкового сегмента вузлами-регенератами. Збільшення об'єму відтоку по нижній порожнистій вені з одночасним звуженням її печінкового сегмента призводить до розвитку кавальної гіпертензії, яка ще більше ускладнює транспечінковий кровотік [1]. Велике патогенетичне значення у прогресуванні ПГ має функціональний стан непарної вени, оскільки її функціональна неспроможність з ретроградним кровотоком у всіх випадках викликає варикозне розширення вен езофагогастрального сегмента [31]. Причиною такої неспроможності є застій крові в її системі, особливо при хронічній серцевій недостатності [17].

При ПГ формуються 4 основні групи ПКШ, однак клінічно визначальним залишається гастроєзофагальний колатеральний шлях. Підвищений портальний тиск передається на функціонуючі гастроєзофагальні колатералі, викликаючи варикозне розширення вен. Відтік крові з варикозного розширення вен здійснюється в основному в непарну і напівнепарну вени, а через венозні комуніканти перфорується м'язовий шар стравоходу до вен підслизової основи. Вважають, що саме в зоні комунікантів кровотік з вен стравоходу зустрічає перешкоду, яка спричинює недостатність пропускної спроможності цих вен. З розвитком захворювання та формуванням колатерального кровообігу може з'явитися гіпертензія в системі непарної вени і виражений венозний застій поширюється грудний

відділ стравоходу [9, 11, 17, 30].

Механізм формування варикозного розширення вен проксимального відділу шлунка інший. При порушенні відтоку по селезінковій вені її функцію починають виконувати короткі вени шлунково-селезінкової зв'язки, значно розширюючись (іноді до 10–11 мм). Перетікання між зазначеними двома венозними зонами здійснюється в ділянці великої кривизни через вени м'язового шару стінки шлунка, що вважається перешкодою для їх розширення і пропускної здатності. Пройшовши цей бар'єр, кров спрямовується з підслизових судин в напрямку малої кривизни шлунка, де зустрічає другий бар'єр у вигляді м'язового шару малої кривизни шлунка. Саме це лежить в основі варикозного розширення вен проксимального відділу шлунка, які в свою чергу анастомозують з підсерозними венами шлункової стінки, що пов'язані в цьому відділі з лівою шлунковою веною [9, 11, 17, 30].

Безпосередньо розриву венозної стінки передують трофічні розлади слизової оболонки над варикозним розширення вен. У результаті утворюються ерозії та оголюється ділянка стінки варикозного розширення вен. Пусковим механізмом розриву стінки є порталний гіпертонічний криз, зумовлений збільшенням артеріального і портального притоку крові до шлунка та стравоходу після прийому їжі, фізичного навантаження або безпосередньо внаслідок її прямого механічного пошкодження [9, 11, 30]. Цей факт, а також неможливість спадіння стінок варикозного розширення вен стравоходу внаслідок склерозу паравазальної клітковини, локального порушення гемокоагуляції в зоні джерела кровотечі пояснює тривалість геморагії з варикозного розширення вен стравоходу та шлунка [17].

У механізмі розвитку спленомегалії основну роль відіграє порушення відтоку крові із селезінки, утворення артеріо-венозних шунтів, спрямованих на артеризацію крові в селезінковій вені, і як наслідок зменшення гіпоксії в печінці. Застій крові в селезінці

призводить до гіперплазії і гіпертрофії ретикулоендотеліальних елементів, гіпоксії органа і розростанню сполучної тканини. При порушенні венозного відтоку від селезінки роль венозної системи беруть на себе лімфатичні судини органа. Застійна лімфа дифундує в навколелімфатичний простір, що ще більшою мірою сприяє проліферації сполучної тканини в органі. Нерідко спленомегалію супроводжує цитопенічний синдром (гіперспленізм). У його патогенезі першорядне значення надають підвищеному депонуванню і руйнуванню клітин крові в селезінці, а також її пригнічувальний вплив на кістковий мозок [17, 19]. З прогресуванням захворювання явища гіперспленізму поглиблюються приєднанням аутоімунного компонента [11]. Тому найбільш часто гіперспленізм проявляється переважним зниженням одного або двох типів клітин периферичної крові [4, 31].

Патогенез асцити асоціюють із посиленим функціонуванням лімфатичної системи, яка сприяє розвантаженню венозної мережі печінки, але в подальшому призводить до динамічної недостатності лімфообігу і «пропотіванню» рідини з поверхні печінки в черевну порожнину. Важливу роль у патогенезі асцити відіграє гіпоальбумінемія, з якою пов'язують зниження колоїдно-осмотичного тиску плазми крові і трансудацію рідини в зоні венозного стазу. Асцит пов'язують із затримкою натрію та води через їх реабсорбції в канальцях нирок, що зумовлено дією альдостерону. Гіперальдостеронізм при цирозі печінки виникає внаслідок підвищеної секреції альдостерону, пов'язаної з надлишковою активацією ренін-ангіотензинової системи, і зменшеною інактивацією гормону через печінково-клітинну недостатність [17].

Варто відмітити, що асцит сприяє збільшенню внутрішньочеревного тиску, що прямо пропорційно погіршує показники ворітно-печінкової гемодинаміки, циркуляцію крові в системі нижньої порожнистої вени, в органах черевної порожнини і, зокрема, в ниркових

венах. Разом з цим обмежується функція діафрагми і, відповідно, дихальна екскурсія легень, утруднюється серцева діяльність. Підвищення внутрішньочеревного тиску, що виникає, викликає гастроєзофагальний рефлюкс, який у свою чергу може провокувати кровотечу з варикозного розширення вен стравоходу [27].

Отже, сучасне розуміння патофізіологічних механізмів синдрому ПГ дає змогу визначити діагностичні критерії відповідно періоду його перебігу і більш ґрунтовно вибрати патогенетично обґрунтований метод лікування виявлених порушень.

Т.В. Романюк, И.Я. Дзюбановский, О.В. Кузив

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИНДРОМА ПОРТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

В обзоре литературы приведены современные представления о ведущих патофизиологических механизмах формирования синдрома внутрипеченочной портальной гипертензии, а также о этиопатогенетических факторах развития таких основных осложнений, как варикозное расширение вен пищевода, кардии желудка с кровотечением из них, асцита, гиперспленизма.

Ключевые слова: патогенез, синдром портальной гипертензии, осложнения синдрома портальной гипертензии.

T.V. Romanyuk, I.Ya. Dzyubanovskiy, O.V. Kuziv.

MAIN PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF INTRAHEPATIC PORTAL HYPERTENSION SYNDROME

This review presents modern understanding of the pathophysiological mechanisms which lead to intrahepatic portal hypertension syndrome, as well as the development of main complications, such as esophageal varices, cardiac bleeding, ascites, hypersplenism.

Key words: pathogenesis, portal hypertension syndrome, complications of portal hypertension.

Gorbachevsky Medical University, Ternopil.

REFERENCES

1. Andreev G.N. Pathogenesis, diagnosis, treatment and organization of care for patients with chronic liver diseases. V. Novgorod; 2004.
2. Angermayr B., Fernandez M., Mejias M. NAD(P)H oxidase

modulates angiogenesis and the development of porto-systemic collaterals and splanchnic hyperaemia in portal hypertensive rats. *Gut*. 2007; **56**(4):560-564.

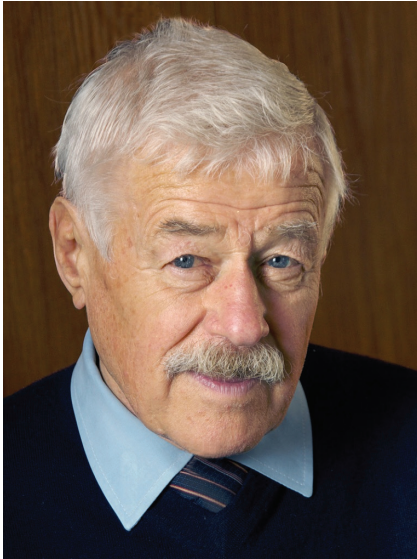
3. Assela T., Boyer N., Gimont M.K. In chronic hepatitis C liver fibrosis is associated with the severity of necrosis and inflammation, but not with steatosis. *Hepatology*. 2003; **6**:50-55.
4. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med*. 2004; **255**(5):538-561.
5. Chen Y., Wang C.P., Lu Y.Y. Hepatic stellate cells may by potential effectors of platelet activating factor induced portal hypertension. *World J. Gastroenterol*. 2008; **14**(2):218-223.
6. Cichoż-Lach H., Celinski K., Slomka M., Kasztelan-Szczerbinska B. Pathophysiology of portal hypertension. *J. Physiol. Pharmacol*. 2008; **59**(2):231-238.
7. Coll M., Martell M., Raurell I. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver Int*. 2010; **30**(4):593-602.
8. Garbuzenko D.B. Possibility of reducing portal pressure by small bowel resection in experimental and clinical. In: Collection scientific works department Surgical Clinic of Chelyabinsk Medical Institute: "Topical Issues surgery of abdominal and thoracic cavity"; 1992. P. 40-45.
9. Garbuzenko D.B. Bleeding from esophageal varices and gastric patients with liver cirrhosis: pathogenesis, prevention and treatment. Chelyabinsk: Publishing house «Eastern Gate»; 2004.
10. Garbuzenko D.B. Pathophysiological mechanisms and new directions therapy of portal hypertension in liver cirrhosis. *Clinical. Gastroenterol., Hepatol. Prospects*. 2010; **6**:11-20.
11. Garbuzenko D.B., Bordunovsky V.N., Shadryncev A.N., Burulev A.L. Causes of bleeding varices of the esophagus in patients with liver cirrhosis. *Hieroglyph*. 1999; **6**:28-30.
12. Fiorucci S., Antonelli E., Morelli A. Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. *Dig. Liver Dis*. 2003; **35**(2):61-69.
13. Gatta A., Bolognesi M., Merkel C. Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Mol. Aspects Med*. 2008; **29**(1-2):119-129.
14. Graupera M., Garcia-Pagan J.C., Abraldes J.G. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology*. 2003; **37**(1):172-181.
15. Hernandez-Guerra M., Garcia-Pagan J.C., Turnes J. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology*. 2006; **43**:485-491.
16. Kinoshita K., Iimuro Y., Otagawa K. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut*. 2007; **5**:706-714.
17. Kulesha V.F. Portal hypertension. Blagoveshchensk: Amursk Stat. Med. Academy; 2011.
18. Kushnir I.E. Portal hypertension: from pathophysiology to treatment. *Modern gastroenterology*. 2009; **1**(45):86-92.

19. Lazutkin M.V. Surgical correction of hypersplenism in patients with portal hypertension. Sergei Kirov Military Medical Academy, 2006. 131.
20. Lee J.S., Semela D., Iredale J., Shah V.H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte?. *Hepatology*. 2007; **45**(3):817-825.
21. Liu D., Chen J., Wang J. Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Int. J. Mol. Med.* 2010; **25**(6):845-851.
22. Lugo-Baruqui A., Munoz-Valle J.F., Arevalo-Gallegos S., Armendariz-Borunda J. Role of angiotensin II in liver fibrosis-induced portal hypertension and therapeutic implications // *Hepatology Res.* 2010; **40**(1):95-104.
23. Majid S., Azam Z., Shah H.A. Factors determining the clinical outcome of acute variceal bleed in cirrhotic patients. *Indian J. Gastroenterol.* 2009; **28**(3):93-95.
24. Martell M., Coll M., Ezkurdia N. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J. Hepatol.* 2010; **2**(6):208-220.
25. Moleda L., Jurzik L., Froh M. Role of HSP-90 for increased nNOS-mediated vasodilation in mesenteric arteries in portal hypertension. *World J. Gastroenterol.* 2010; **16**(15):1837-1844.
26. Ozatli D., Koksai A.S., Haznedaroglu I.C. Anemias in Chronic Liver Diseases. *Hematology*. 2000; **5**(1):69-76.
27. Rusin A.V. Integrated staged treatment of portal hypertension complicated by ascitic syndrome. Kharkiv National Medical University. 2005.
28. Sancho-Bru P., Bataller R., Colmenero J. Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006; **291**(5):877-884.
29. Schogolev A.A., Al Sabanchi O.A., Miziano S.A., Grooms D. New technologies in treatment of bleeding varices esophagus and stomach. *Russian Journal of Medicine*. 2002; **4**:41-43.
30. Sherlock Sh. July J. Diseases of the liver and biliary tract. Moscow: GEOTAR Medicine; 1999.
31. Turmahanov S.T. Role azygos vein in pathogenesis varices and bleeding stomach varices in patients with portal hypertension. Novgorod State University. Medical Education Institute; 2002.

*ДВНЗ „Терноп. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського
МОЗ України”
E-mail: 666sir999@gmail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 08.04.2013*

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



Ігор Сильвестрович Магура
(до 85-річчя з дня народження)

22 листопада 2013 р. виповнилося 85 років з дня народження академіка НАН України, професора, доктора біологічних наук, заслуженого діяча науки і техніки України, Соросовського професора, лауреата Державної премії СРСР та України в галузі науки і техніки Магури Ігоря Сильвестровича.

І.С. Магура народився у м. Києві у родині науковця. Після закінчення в 1953 р. з відзнакою військово-морського факультету 1-го Ленінградського медичного інституту Ігор Сильвестрович працював старшим ординатором госпіталю навчального загону Північного флоту. У 1955 р. його переведено до Чорноморського флоту як фахівця у галузі підводної медицини та фізіології. Після звільнення з військової служби у 1958 р. Ігоря Сильвестровича було зараховано на посаду молодшого наукового співробітника відділу електрофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Академії наук УРСР, де під керівництвом академіка Д.С. Воронцова він досліджував фізико-хімічні властивості механізмів вибіркової проникності плазматичної

мембрани до іонів і вплив на них фармакологічних препаратів, які модулюють механізми збудливості. У 1963 р. І.С. Магура захистив кандидатську дисертацію з цієї теми і почав працювати у відділі загальної фізіології нервової системи, де вивчав механізми електричної збудливості соми нервової клітини.

Ігор Сильвестрович зі співробітниками досліджували фізико-хімічні показники різних типів калієвої провідності соматичної мембрани. Зокрема, зроблена оцінка термодинамічних характеристик потенціалзалежних процесів, що керують «швидкими» калієвими каналами. Проаналізовано та кількісно описано фізико-хімічні механізми блокувальної дії іонів лужних металів на різні типи потенціалкереної калієвої провідності, які відіграють важливу роль в електричній активності соми нейрона і його інтегративній функції. Вперше встановлено, що взаємодія різних типів проникних іонів з каналом неоднаково впливає на його властивості.

Результати досліджень І.С. Магури викладено у докторській дисертації, яку було захищено у 1973 р. За матеріалами досліджень видано монографію «Проблеми электрической возбудимости нейрональной мембраны». Разом з публікаціями П.Г. Костюка, О.О. Кришталя і В.І. Підоплічка праці І.С. Магури, присвячені вивченню іонних механізмів збудливості соми нервової клітини, було відзначено у 1983 р. Державною премією СРСР у галузі науки і техніки.

З 1982 до 1996 р. І.С. Магура був науковим керівником низки робіт, що виконувались у відділі загальної фізіології Інституту фізіології при Київському університеті ім. Тараса Шевченка. Головним напрямком досліджень було вивчення механізмів, що контролюють внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію у гладеньких м'язах, зокрема натрій-кальцієвого обміну, ролі саркоплазматичного ретикулула у скоротливій

активності. Значне місце займало вивчення фармакологічних впливів на ці механізми. Зокрема, показано роль позаклітинних іонів натрію у заповненні та спустошенні кальцієвих депо, що реагують на активацію М-холінорецепторів, проаналізовано дію різних типів місцевих анестетиків на електричну і скоротливу активність гладеньких м'язів, отримано нові відомості відносно механізмів впливу на них кофеїну.

Були проведені спільні теоретичні дослідження І.С. Магури з академіком К.Б. Яцимирським і кандидатом хімічних наук П.С. Стрижаком із застосуванням нелінійної динаміки для виявлення феномена детермінованого хаосу, щоб оцінити інформативність осцилюючих кальцієвих сигналів у секреторних клітинах. Такий підхід дає змогу відрізнити детерміновану поведінку біологічної системи від стохастичного шуму.

В останні роки І.С. Магура керує роботами, пов'язаними з дослідженням імуномодулятора α -інтерферону і вторинних посередників його дії (олігоаденілатів) на нервові клітини. Разом із співробітниками вивчає нейронно-імуноні взаємодії. Відомо, що інтерферони належать до гетерогенної групи поліпептидних медіаторів цитокінів, які відіграють важливу роль у зв'язках нервової системи з імунною. Були отримані результати, що показують наявність у клітинах ІМР-32 нейробластоми людини рецепторів α -інтерферону. Встановлено, що взаємодія рецепторів клітин нервового походження з рекомбінантним інтерфероном $\alpha 2\beta$ людини викликає істотні зміни збудливості й активного транспорту іонів. Такий ефект розглядається як наслідок активації генів «ранньої відповіді». Ігор Сильвестрович у 2010 р. отримав премію імені О. О. Богомольця НАН України (спільно з М. Я. Співаком та І.М. Трахтенбергом) за серію праць «Проблеми вродженої імунорезистентності та вікової фізіології і токсикології».

Ігор Сильвестрович бере участь у дослідженні алостеричних впливів на ворітні

механізми потенціалкерованих каналів, які здійснюються сигналами штучного і природного походження, викликаючи модуляцію механізмів електричної збудливості. Нині І.С. Магура вивчає молекулярні механізми регуляції клітинної збудливості, зокрема пластичність цих процесів і роль калієвих каналів.

З 1965 р. Ігор Сильвестрович плідно займається педагогічною роботою. Багато років він читав лекції на кафедрі біофізики, а останнім часом займається викладацькою роботою на кафедрі медичної радіофізики Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. З 1983 р. працює на посаді професора базової кафедри молекулярної фізіології та біофізики Київського відділення Московського фізико-технічного інституту а також у Національному технічному університеті України «КПІ». І.С. Магура як співавтор підручника «Биофизика» у 1992 р. отримав Державну премію України в галузі науки і техніки. У 2001 та 2008 рр. за редакцією академіка П.Г. Костюка здійснено перевидання підручника українською мовою, ґрунтовно переробленого з урахуванням сучасного стану науки.

Академік І.С. Магура – автор декількох сотень наукових праць, надрукованих як у вітчизняних, так і закордонних виданнях. Результати праць були представлені на численних вітчизняних і міжнародних конференціях, конгресах і симпозиумах. Його монографія «Проблеми электрической возбудимости нейрональной мембраны» отримала високу оцінку наукової громадськості. За свою багаторічну діяльність Ігор Сильвестрович нагороджений медаллю ім. М.Д. Стражеска «За заслуги в охороні здоров'я» АМН України.

Багато його учнів досягли визначних успіхів і міжнародного визнання, деякі з них працюють зараз за кордоном у відомих світових лабораторіях.

Наукова громадськість, колеги та колектив Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України поздоровляють ювіляра і бажають йому здоров'я, щастя, плідної праці і подальших успіхів.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| G.V. Dumanska, O. V. Rikhalsky, N. S. Veselovsky. Characteristics of quantal release of glutamate and GABA in synapses between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in coculture | 3 |
| N.D. Nosenko, N.M. Zholobak, L.I. Polyakova, P.V. Sinitsyn, A.A. Limareva, A.B. Sherbakov, N.Ya. Spivak, A.G. Reznikov. Morphofunctional state of reproductive system of ageing male rats in case of use of nanocerium | 11 |
| O.S. Panasiuk, A.M. Shysh, A. A. Moibenko. The influence of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on functional parameters of myocardial mitochondria during isopreterenol-induced heart injury | 18 |
| A.A. Tykhomyrov, D.D. Zhernosekov, Y.M. Roka-Moya, S.I. Diordieva, T.V. Grinenko. Effects of LYS-form of plasminogen on reconstruction of platelet actin cytoskeleton | 25 |
| A.M. Khoma, D.A. Zavodovskiy, D.M. Nozdrenko, O.V. Dolgoplov, M.S. Miroshnichenko A.P. Motuzjuk. Dynamics of ischemic skeletal soleus muscle contraction of the rat | 34 |
| I.V. Leschenko, V.G. Shevchuk, O.A. Savchenyuk, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova. Exocrine function of pancreas in rats under experimental obesity | 41 |
| O.I. Savchuk, V.S. Melnyk, S.V. Goncharov, V.Yu. Shandyuk, D.O. Stroi, V.E. Dosenko, L.I. Sokolova, G.G. Skibo. Frequency of allelic polymorphism of proteasome subunits psm α 6 and Imp2 in patients with ischemic stroke | 49 |
| B.V. Dons'koi, V.P. Chernyshov, V.Y. Sirenko, G.V. Strelko, D.V. Osypchuk. Effect of hypo- and hyper- accentuated NK cell activity on embryo implantation | 56 |
| A.I. Bondarenko. Single channel recordings reveal distinctive characteristics of Ca ²⁺ -permeable channels in the inner mitochondrial membrane | 64 |
| D.V. Varyvonchyk, S.O. Rykov, A.O. Salyukov, A.B. Mishenin, G.Y. Pyshnov, E.V. Moiseenko. Morphological changes of vision among winterers in ukrainian antarctic station «Academician Vernadsky» | 70 |
| O.O. Shandra. The influence of dexamethasone and melatonin on immune system in rats, which was affected by experimental contact dermatitis | 78 |
| L.A. Mogylnytska. Serum levels of endothelial monocyte-activating polypeptide-II in type 2 diabetes | 84 |

REVIEWS

| | |
|---|----|
| K.I. Bogutska, Yu.I. Prylutsky, D.M. Nozdrenko. The use of aluminum and its compounds in the biomedical purposes | 91 |
| T.V. Romanyuk, I.Ya. Dzyubanovskiy, O.V. Kuziv. Main pathophysiological mechanisms of intrahepatic portal hypertension syndrome | 98 |