

Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 4 2014

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Драчук К.О., Коцюруба А.В., Базілюк О.В., Степаненко Л.Г., Сагач В.Ф.</i> Пропаргілгліцин відновлює ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів	3
<i>Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Kryvdiuk I.V., Hlushchak N.A., Kovalevska O.V., Karbovskiy L.L., Minchenko O.H.</i> Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells	11
<i>Гоженко А.І., Філінець Н.Д.</i> Функціональний стан нирок після активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів при експериментальній гострій гіпоксії	22
<i>Воронич-Семченко Н.М., Гуранич Т.В.</i> Зміни процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків, антиоксидантного захисту у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду й міді	30
<i>Белінська І.В., Линчак О.В., Рибальченко Т.В., Гурняк О.М.</i> Гематологічні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду за 1,2-диметилгідразиніндукованого канцерогенезу товстої кишки щурів	40
<i>Березнякова А.І., Черемісіна В.Ф., Жемела О.Д.</i> Особливості стану гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом	50
<i>Маньковський Б.М., Урбанович А.М.</i> Вміст лептину крові та активність системної запальної відповіді у хворих на цукровий діабет 2-го типу із різною масою тіла та тривалістю процесу	56
<i>Гуніна Л.М., Вінничук Ю.Д.</i> Тканинна гіпоксія і асоційовані з нею метаболічні змі- ни гомеостазу при вібраційних навантаженнях у спортсменів	61
<i>Ференц І.В., Бродяк І.В., Люта М.Я., Кулачковський О.Р., Сибірна Н.О.</i> Вплив продукту декарбоксілювання L-аргініну на морфофункціональні показники еритрону за умов експериментального цукрового діабету у щурів	70

<i>Федотова Ю.О., Фролова Г.О.</i> Вплив агоніста та антагоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на відтворення умовного рефлексу самиць щурів у різні фази естрального циклу	80
<i>Труш В.В., Соколов В.І.</i> Модуляція тироксином ефектів дексаметазону на скелетний м'яз білих щурів	87
<i>Березовський В.Я., Чака О.Г., Літовка І.Г., Левашов М.І., Янко Р.В.</i> Вплив зміненого парціального тиску кисню на резистентність до гіпоксії та експресію киснечутливих генів <i>Drosophila melanogaster</i>	97
<i>Гордієнко Л.П., Берегова Т.В., Непорада К.С., Фалалєєва Т.М.</i> Розвиток оксидативного стресу в тканинах слинних залоз щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння	105
ХРОНІКА	
VIII Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини» (14–17 травня 2014 р., Київ)	108
Інформація про роботу V всеукраїнської науково-практичної конференції «Індивідуальні психофізіологічні особливості людини та професійна діяльність» (16–18 травня 2014 р., Черкаси)	110
ПАМ'ЯТНІ ДАТИ	
Шуба Я.М. П.Г. Костюк – учений, який виявив нові грані «живого» кальцію	112

К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач

Пропаргілгліцин відновлює ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів

Ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) судин забезпечує розвиток фундаментальних судинних реакцій, а його порушення лежить в основі асоційованих зі старінням серцево-судинних захворювань. Вивчали вплив блокади ферменту (de novo) синтезу сірководню – цистатіонін-γ-ліази (CSE) на ендотелійзалежне розслаблення ГМ грудної аорти старих щурів. Встановлено, що додавання до перфузату пропаргілгліцину (ПГ) – інгібітора активності CSE, відновлювало пригнічене у старих щурів ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти. Середнє значення його амплітуди збільшувалось з $13,4 \pm 1,3$ до $49,5 \pm 4,7\%$. Цей ефект знімався блокадою синтезу оксиду азоту (NO). Показано зменшення з віком вмісту внутрішньомітохондріальних пулів H_2S , NO_2^- серця та активності ферменту конститутивного синтезу NO – cNOS. Встановлено, що введення ПГ значною мірою відновлювало пули H_2S (збільшувалися на 112 %) та NO_2^- (збільшувалися на 162 %), а також стимулювало знижену активність конститутивної NO-синтази (збільшувалася майже втричі) у серці. Таким чином, ПГ здатен відновлювати пригнічене ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів за допомогою стимуляції синтезу H_2S та NO.

Ключові слова: пропаргілгліцин, сірководень, цистатіонін-γ-ліаза, ацетилхолін, оксид азоту, ендотелій, гладенькі м'язи, аорта, старіння, окисний стрес.

ВСТУП

Відомо, що при старінні збільшується ризик розвитку серцево-судинних захворювань [1, 2]. Основною причиною цього є те, що з віком розвивається дисфункція ендотелію судин. Остання зумовлена, в т.ч. порушенням синтезу оксиду азоту (NO), що виникає через окисний стрес, якому належить провідна роль у процесі старіння. NO, крім вазодилаторного ефекту має багато інших важливих властивостей: модулює вивільнення вазоактивних медіаторів, пригнічує адгезію лейкоцитів, експресію прозапальних генів, адгезію та агрегацію тромбоцитів, інгібує міграцію та проліферацію гладеньких м'язів (ГМ) [3, 4]. Важливим механізмом порушення NO-синтезувальної функції ендотелію за умов старіння є зниження активності його конститутивної NO-синтази (cNOS) [5, 6].

Останнім часом у літературі з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню (H_2S) [7]. H_2S разом з NO і CO відносять до родини газових трансмітерів. Слід зазначити, що раніше вони розглядалися виключно, як токсичні молекули доки не стало відомо про їх ендегенну продукцію та біологічні ефекти в організмі. Унікальність газових трансмітерів полягає в тому, що вони легко проникають крізь клітинні мембрани, не зв'язуються ні з якими рецепторами на їх поверхні, взаємодіють безпосередньо з внутрішньоклітинними структурами. Молекулярними мішенями для H_2S є ферменти, фактори транскрипції та мембранні іонні канали [8]. Одним із ферментів de novo синтезу H_2S у судинній системі є цистатіонін-γ-ліаза (CSE), яка значною мірою, інгібується пропаргілгліцином (ПГ). Останні дослідження переконливо доводять, що кардіопротекція зумовлена

© К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач

сірководнем, синтезованим в організмі саме CSE-залежним шляхом [9–11].

Великий інтерес викликає питання взаємодії H_2S і NO . Біохімічні її аспекти суперечливі і до кінця не визначені. Деякі автори вказують на стимулювальний вплив кожного із двох газотрансмітерів на продукцію та функцію іншого, а деякі роблять цілком протилежні висновки про їх взаємовплив [11–13].

Метою нашої роботи було дослідити роль CSE-залежного шляху синтезу H_2S у ендотелійзалежному розслабленні гладеньких м'язів (ГМ) судин у старих тварин та встановити особливості дії ПГ на мітохондріальний синтез сірководню та NO .

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 10 дорослих віком 8 міс та 17 старих віком 22–24 міс щурах-самцях лінії Вістар масою 300–350 г з дотриманням усіх вимог щодо робіт з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

Скоротливу активність ГМ аорти досліджували за допомогою спеціальної камери, яка складалася з комірки для перфузії, механоелектричного перетворювача 6MX1С, температурного датчика, нагрівальних елементів, системи перфузійних розчинів.

Для перфузії використовували розчин Кребса такого складу (ммоль/л): $NaCl$ – 133; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; $MgCl_2$ – 1,05; глюкоза – 12; $CaCl_2$ – 2,5. Температура і рН розчинів відповідали фізіологічній нормі. Після декапітації грудну порожнину розтинали та виділяли сегмент грудної аорти довжиною 3–4 см. Його ретельно очищували від сполучної тканини та розрізали на кільцеві препарати товщиною 1–1,5 мм з урахуванням циркуляційної орієнтації гладеньком'язового шару (під кутом приблизно 45° від повздовжньої осі судини). Далі препарат поміщали у комірку для перфузії, фіксуючи за допомогою двох гачків, один

з'єднувався з механоелектричним перетворювачем, а другий – через блок до вантажу. Препарат аорти розтягували з силою 7–8 мН і залишали для стабілізації режиму роботи на 25–30 хв, перфузуючи його розчином Кребса.

Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Стійкий рівень норадреналінзалежного скорочення («плато») приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США).

Активність ферментів CSE та NOS пригнічували за допомогою ПГ (10^{-3} моль/л, "Sigma", США) та L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, "Sigma", США) відповідно, через інкубацію препаратів аорти впродовж 30 хв і додавання блокаторів у перфузійні розчини.

Вивчали мітохондрії серця дорослих і старих щурів, у яких визначали зміни пулів H_2S , вмісту стабільного метаболіту NO – нітрит-аніона (NO_2^-) та активність ферменту конститутивного кальційзалежно синтезу NO – cNOS при внутрішньом'язовому введенні ПГ за 30 хв до декапітації тварин. Після цього у тварин з тканин серця виділяли мітохондрії послідовним центрифугуванням гомогенату. Осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при $4^\circ C$. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій досліджували за методом Лоурі.

Для визначення вмісту H_2S до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при $37,5^\circ C$ протягом 10 хв, далі додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N, N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Після інкубації в темряві на холоді досліджували оптичну густина при $\lambda=670$ нм [14].

Вміст NO_2^- досліджували в безбілкових аліквотах мітохондрій серця в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна в нашій модифікації. Реактив Гріса готували, змішуючи рівні частини

0,1%-го водного розчину нафтилетилендіаміндігідрохлориду ("Sigma", США) з 1%-м розчином сульфаніламіну ("Sigma", США) в 5 % H_3PO_4 (ч.д.а.) безпосередньо перед визначенням. Вміст NO_2^- розраховували за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням NaNO_2 (х.ч.).

Для визначення кальційзалежної активності NOS (використовували комбінацію класичного методу та сучасну його модифікацію, пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції L-цитруліну. Вміст цитруліну досліджували за допомогою високочутливого колориметричного методу [15]. Активність ферменту cNOS виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі [16, 17].

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcal Inc., США). Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліди показали, що додавання ацетилхоліну до буферного розчину Кребса завжди викликало типове розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти дорослих щурів (рис. 1, 2). Середнє значення амплітуди становило $64,9 \pm 3,5$ % ($n=10$). Раніше проведені експерименти на деендотелізованих препаратах ГМ аорти встановили, що таке розслаблення залежить від ендотелію

[18, 19]. У старих щурів ацетилхолін тієї самої концентрації викликав розслаблення ГМ грудної аорти амплітудою майже в 5 разів меншою від контролю ($13,4 \pm 1,3$ %; $n=17$; див. рис. 1, 2).

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у старих щурів порушується ендотеліозалежне розслаблення ГМ аорти. Водночас відомо, що реакції ГМ аорти на агоністи незалежні від ендотелію, наприклад нітропрурид натрію, з віком не втрачаються і відтворюються майже без змін. Отже, порушується саме ендотеліозалежний компонент їх релаксації [18, 20].

Після додавання до буферного розчину ПГ і інкубації в ньому препараті ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв амплітуда розслаблення на дію ацетилхоліну достовірно збільшувалася майже у 4 рази порівняно з такими без блокатора ($49,5 \pm 4,7$ %; $n=10$; рис. 1, 2).

Нами було зроблено припущення, що в основі відновлення ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів за умов H_2S -блокади лежить збільшення секреції ендотеліальними клітинами оксиду азоту. Для підтвердження цього ми провели серію дослідів з одночасним блокуванням синтезу H_2S і NO, а саме додаванням до буферного розчину ПГ та L-NAME (інкубація впродовж 30 хв препараті ГМ аорти старих щурів). При цьому ми спостерігали значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти у відповідь на ацетилхолін ($3,0 \pm 1,8$ %; $n=5$; див. рис. 1, 2; $P < 0,05$).



Рис. 1. Зміна ацетилхолініндукованого розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти під дією пропаргілгліцину (ПГ) та L-NAME: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури при дії ПГ, 4 – старі щури при дії ПГ і L-NAME. Темна лінія під кривими – тривалість дії ацетилхоліну (10^{-5} моль/л). Переривчаста – вихідний рівень (внизу) тонічного напруження ГМ і заданий рівень (зверху) їх активації після введення норадреналіну, що приймається за 100 %. Стрілкою позначено початок активації ГМ

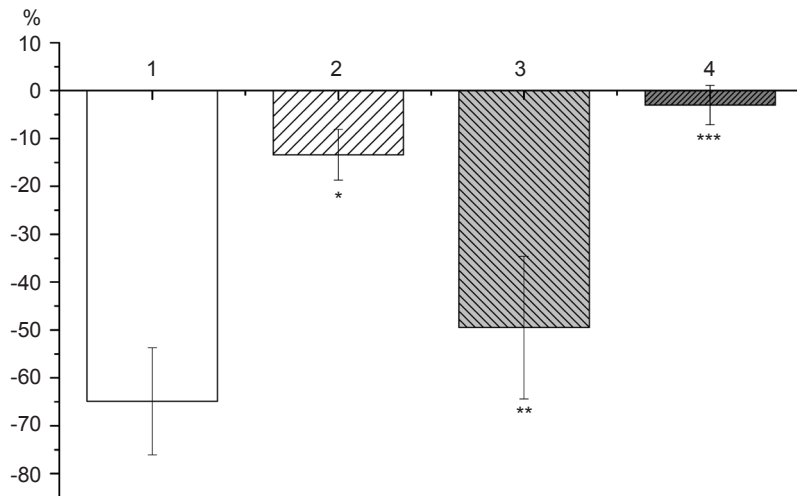


Рис. 2. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) та L-NAME на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти тварин різного віку: 1 – дорослі (контроль), 2 – старі щури (контроль), 3 – старі щури при дії ПГ, 4 – старі щури при одночасній дії ПГ та L-NAME. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно старих тварин. *** $P < 0,05$ відносно старих тварин при дії ПГ

Для встановлення зміни пулів H_2S і NO та активності cNOS була проведена серія біохімічних дослідів. Показано, що в мітохондріях серця суттєво знижується вміст стаціонарних пулів H_2S ($2,35 \pm 0,25$ нмоль/мг білка, $P < 0,05$) Застосування ПГ (10^{-4} моль/л) у досліджах *in vivo* парадоксально змінило досліджувані біохімічні показники у мітохондріях серця. А саме транзиторні внут-

рішньомітохондріальні пули H_2S повністю нормалізувалися ($4,98 \pm 0,75$ нмоль/мг білка, $P < 0,05$) після короткочасного введення ПГ, а не ще більше знизилась, як того можна було очікувати (рис. 3). Зниження стаціонарних пулів H_2S у мітохондріях серця, які є місцем як його синтезу, так і, особливо, деградації, вказує як на можливе інгібування ендогенного біосинтезу, так і/або на активацію

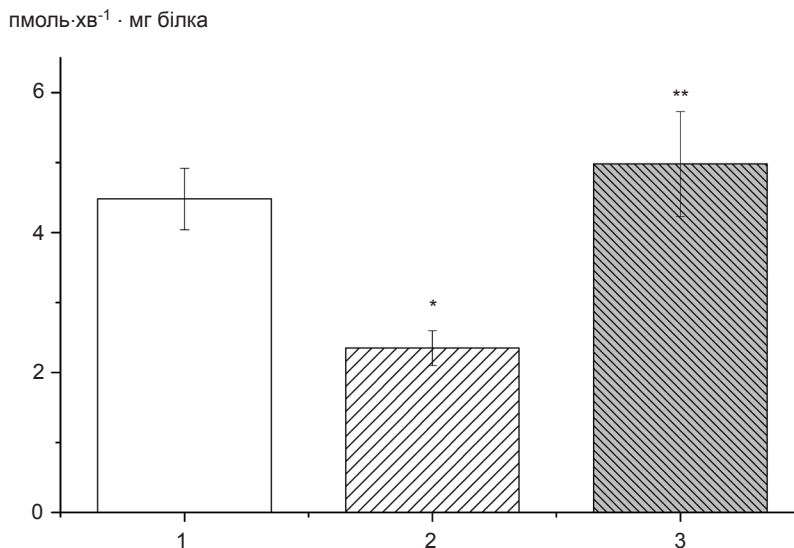


Рис. 3. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на внутрішньомітохондріальні пули сірководню (H_2S): 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. * $P < 0,05$ відносно контролю. ** $P < 0,05$ відносно старих тварин

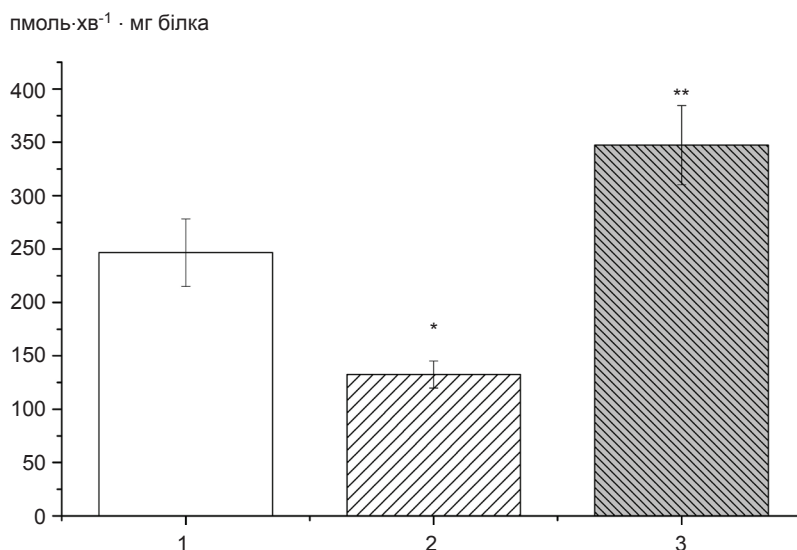


Рис. 4. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на пули NO₂⁻ в мітохондріях тварин різного віку: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. *P<0,05 відносно контролю. **P<0,05 відносно старих тварин

деградації (окиснення до іонів сульфату в мітохондріях ферментом сульфїтоксидазою). Дискусійним залишається питання про причину збільшення продукції H₂S при блокуванні одного з трьох ферментів його (de novo) синтезу в серцево-судинній системі. Можливо, активуються альтернативні шляхи синтезу сірководню або має значення антиоксидантна активність ПГ.

Також нами було показано, що в мітохондріях серця старих щурів знижується активність eNOS (1,84 ± 0,26 пмоль/хв · мг білка, P<0,05) та вміст пулів стабільного метаболіту NO – NO₂⁻ (132,4 ± 12,7 пмоль/мг білка, P<0,05; рис. 4, 5).

Введення ПГ старим тваринам стимулювало активність eNOS (5,44 ± 1,14 пмоль/хв · мг білка, P<0,05; див. рис. 5) та збільшувало внутрішньомітохондріальні пули NO₂⁻ (347,33 ± 37,2 пмоль/мг білка, P<0,05; див. рис. 4).

В основі пошкодження ендотеліоцитів і розвитку їх дисфункції при старінні є окисний стрес, який, очевидно, викликаний гіперпродукцією супероксид-аніона (O₂⁻). З віком у судинах збільшується його продукція та підвищується експресія компонентів НАДФН-оксидази – основного джерела

O₂⁻ в клітині [18, 21–24]. Відомо, що супероксид-аніон може взаємодіяти з NO з утворенням пероксинітриду (ONOO⁻) [25]. Останній є високореакційною сполукою, на відміну від O₂⁻, легко проникає у клітину та спричиняє окиснювальні модифікації макромолекул: ліпідів, білків, ДНК. Вплив пероксинітриду на білки відображає нітротирозин, що є маркером окисного стресу і вміст якого підвищується з віком в ендотеліальних клітинах [26].

Ми вважаємо, що ПГ відновлює ендотеліальну функцію у судинах старих щурів внаслідок збільшення продукції сірководню, яке насамперед зумовлене активацією альтернативних шляхів його синтезу. Двома іншими ферментами синтезу H₂S в організмі є 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза та цистатіонін-β-синтаза. Відомо, що одним із головних механізмів кардіо- і васкулопротекторного ефекту сірководню є його антиоксидантний вплив. Вважають, що цей газ може пригнічувати продукцію, зв'язувати і нейтралізувати супероксид-аніон, пероксинітрид, пероксид водню [27–29]. Пригнічення утворення супероксиду в ендотеліальних і клітинах ГМ відбувається за допомогою інгібування сірководнем експресії та актив-

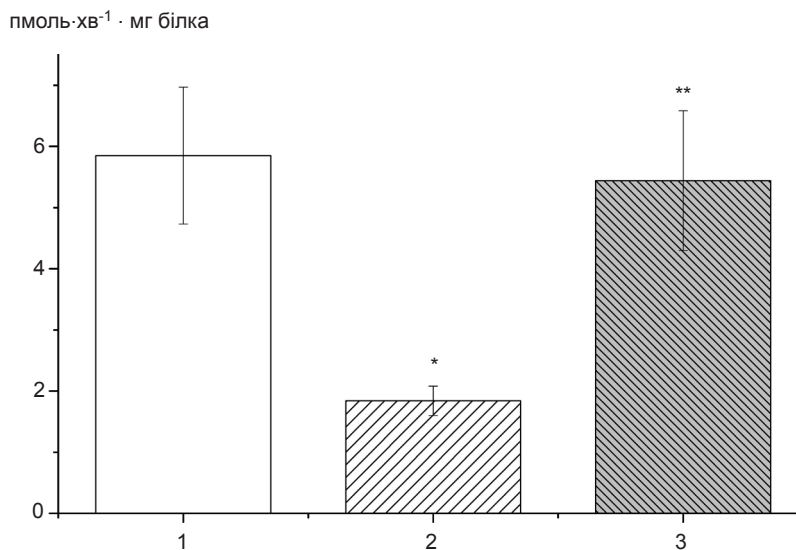


Рис. 5. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на активність ферменту (de novo) синтезу NO cNOS в мітохондріях серця тварин різного віку: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. *P<0,05 відносно контролю. **P<0,05 відносно старих тварин

ності НАДФН-оксидази [30]. З іншого боку, дослідження встановили, що захоплення та/чи утилізація супероксид-аніона значно поліпшували ендотеліальну функцію як у тварин, так і людей відновленням біодоступності NO [23, 24, 31]. Також показано, що H₂S підвищує активність таких власних ендогенних антиоксидантів, як супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза [28, 29, 32].

Цікаво, що сірководень може відновлювати NO-синтезувальну функцію ендотелію не лише завдяки своїм антиоксидантним властивостям, але й внаслідок прямого впливу на ендотеліальні клітини чи безпосередньої активації cNOS. Нещодавно в літературі з'явилися дані про те, що H₂S стимулює фактор росту ендотелію судин. Останній активує в ендотеліальній клітині PI3K/Akt-сигнальний шлях, завдяки чому відбувається фосфорилування і активація ендотеліальної NOS зі збільшенням продукції NO [11]. Дані інших досліджень вказують на те, що CSE-синтезований H₂S може безпосередньо фосфорилувати cNOS і, як наслідок, збільшувати продукцію NO в ендотеліоцитах і відновлювати ендотеліальну функцію [33].

Ми вважаємо, що блокування CSE активує альтернативні шляхи синтезу H₂S, який у свою чергу завдяки власним антиоксидантним властивостям і за допомогою прямого впливу на ендотелій відновлює біодоступність NO і збільшує ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів.

ВИСНОВКИ

1. Блокатор ферменту de novo синтезу сірководню CSE ПГ відновлював ушкоджене у старих щурів ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти.
2. Блокада ферменту синтезу оксиду азоту перешкоджала відновленню ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на дію ПГ.
3. Застосування ПГ викликало збільшення знижених у старих тварин внутрішньомітохондріальних пулів H₂S та NO₂⁻.
4. Введення ПГ стимулювало знижену активність cNOS у старих щурів.
5. ПГ відновлював ендотеліальну функцію у старих щурів. В основі цих ефектів блокатора лежить збільшення вмісту H₂S та NO.

**К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базилук,
Л.Г. Степаненко, В.Ф.Сагач**

ПРОПАРГИЛГЛИЦИН ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ У СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияние блокады фермента (de novo) синтеза сероводорода (H_2S) цистатионин- γ -лиазы (CSE) на эндотелийзависимое расслабление гладких мышц (ГМ) грудной аорты старых крыс. Показано, что блокирование CSE пропаргилглицином (ПГ) восстанавливало поврежденное у старых крыс ацетилхолининдуцированное расслабление ГМ аорты. Данный эффект предотвращался блокадой синтеза оксида азота в эндотелиоцитах. Установлены возрастные изменения внутримитохондриальных пулов H_2S , NO_2^- сердца и активности фермента конститутивного синтеза NO – cNOS. Показано, что введение ПГ увеличивало редуцированные у старых животных внутримитохондриальные пулы H_2S (на 112 %) и NO_2^- (на 162 %) в сердце. Показано, что ПГ стимулировал сниженную у старых крыс активность cNOS. Полученные результаты дают основание полагать, что ПГ путем блокирования одного из трех ферментов (de novo) синтеза сероводорода в организме активизирует альтернативные пути его образования. А синтезированный таким образом сероводород благодаря стимуляции синтеза NO способен восстанавливать эндотелиальную функцию у старых крыс.

Ключевые слова: пропаргилглицин, сероводород, цистатионин- γ -лиаза, ацетилхолин, оксид азота, эндотелий, гладкие мышцы, аорта, старение, окислительный стресс.

**К.О. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, O.V. Bazilyuk,
L.G. Stepanenko, V.F. Sagach**

PROPARGYLGLYCINE RESTORES ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION OF AORTIC SMOOTH MUSCLES IN OLD RATS

In the study we investigated the effect of blockade cystathionine- γ -lyase (CSE), an enzyme of hydrogen sulfide (H_2S) (de novo) synthesis on the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle (SM) in old rats. It has been shown that an inhibition of CSE by propargylglycine (PAG) results in restoration of a decreased ACh-induced relaxation of aorta in old rats. This effect of PAG was removed by blocking nitric oxide (NO) synthesis in the endothelial cells. Age-related changes in the levels of H_2S , NO_2^- and enzyme activity of the constitutive synthesis of NO (cNOS) in the heart, were determined. It has been shown that PAG introduction elevates a decreased levels of H_2S , NO_2^- and stimulates the suppressed activity of cNOS in old rats. These results suggest that PAG activates alternative ways of H_2S synthesis and stimulates the constitutive synthesis of NO. These actions of PAG restore endothelial function in old rats.

Key words: propargylglycine, hydrogen sulfide, cystathionine-

γ -lyase, acetylcholine, nitrogen oxide, endothelium, smooth muscle, aorta, aging, oxidative stress.

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

REFERENCES

1. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003; 107(2):346-54.
2. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE et al. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet*. 2005; 366(9499):1773-83.
3. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000; 190(3): 244-54.
4. Kojda G. Mechanisms of inotropic effects induced by nitric oxide. *Ital Heart J*. 2001; 2 Suppl 3:48S-49S.
5. Sagach VF, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Korcach JuP, Kotsuruba AV. Ace inhibitor enalapril action on nitric oxide synthesis, oxidative metabolism and vascular tone of aging rat. *Fiziol Zh*. 2007; 53(4):15-26.
6. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998;83(3):279-86.
7. Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 120(6):219-29.
8. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine. *Antiox Redox Signal*. 2012; 17(1):119-40.
9. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(39):15560-5.
10. Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, Gundewar S, Jha S, Elrod JW, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation*. 2010; 122:11–19.
11. Kazuhisa Kondo, Shashi Bhushan, Adrienne L. King, Sumanth D. Prabhu, Tariq Hamid, Steven Koenig et al. H2S Protects Against Pressure Overload Induced Heart Failure via Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). *Circulation*. 2013; 127(10):1116–1127.
12. Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S et al. H2S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2013; 127:1116–1127.
13. Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A. Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* 2007; 241:92–97.

14. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem.* 1980; 107:51-55.
15. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* 1980; 107:424-431.
16. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991; 1:145-149.
17. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ et al. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer J Physiol.* 1999; 5:797-804.
18. Tkachenko MN, Sagach VF, Kotsjuruba AV, Baziljuk OV, Buchanevich AM, Meged EF et al. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of free radicals of oxygen of rats in aging. *Fiziol Zh.* 2002; 48(4):3-13.
19. Moibenko OO, Sahach VF, Shapoval LM, Soloviov AI, Baziliuk OV, Zhukova AV et al. The role of the endothelium and of biologically active substances of endothelial origin in regulating blood circulation and cardiac activity. *Fiziol Zh.* 1997; 43(1):3-18.
20. Sagach VF, Baziljuk OV, Kotsjuruba AV, Buchanevich AM. Disturbance of endothelium-dependent vascular responses, arginase and no-synthase pathways of l-arginine metabolism at spontaneously hypertensive rats. *Fiziol Zh.* 2000;46(3):3-13.
21. Fleenor BS, Seals DR, Zigler ML, Sindler AL. Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice. *Aging Cell.* 2012; 11:269-276.
22. Rodriguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8:226-238.
23. Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM, Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress. *Microcirculation.* 2008; 15:225-236.
24. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension.* 2006; 48:1072-1079.
25. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiol.* 2009; 297:H1829-H1836.
26. Donato AJ, Escurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 2007; 100:1659-1666.
27. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: An endogenous peroxynitrite scavenger? *J Neurochem.* 2004; 90: 765-768.
28. Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351:485-491.
29. Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45:1705-1713.
30. Muzaffar S, Shukla N, Bond M, Newby AC, Angelini GD, Sparatore A et al. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2008; 45:521-528.
31. Wray DW, Nishiyama SK, Harris RA, Zhao J, McDaniel J, Fjeldstad AS et al. Acute reversal of endothelial dysfunction in the elderly after antioxidant consumption. *Hypertension.* 2012; 59:818-824.
32. Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2013; 698:463-469.
33. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(8):3182-7.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: 8701dk@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 16.05.2014

D.O. Minchenko, S.V. Danilovskyi, I.V. Kryvdiuk, N.A. Hlushchak, O.V. Kovalevska, L.L. Karbovskyi, O.H. Minchenko

Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells

We have studied the effect of acute L-glutamine deprivation on the expression of tumor protein 53 (TP53)-related genes such as TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase), TP53BP1 (TP53 binding protein 1), TP53TG1 (TP53 inducible gene 1), SESN1 (p53 regulated PA26 nuclear protein), NME6 (NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6), and ZMAT3 (zinc finger, Matrin-type 3) in glioma cells with ERN1 knockdown. It was shown that blockade of ERN1 function in U87 glioma cells is induced the expression of RYBP and SESN1 genes, but decreased the expression of TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, NME6, genes. Moreover, the expression levels of RYBP, SESN1, TP53BP1, and ZMAT3 genes is increased in control glioma cells by L-glutamine deprivation condition but blockade of ERN1 signaling enzyme function significantly enhances this effect on the expression all of these genes. At the same time, the ERN1 knockdown eliminates the response TP53TG1 and TOPORS genes to L-glutamine deprivation condition. Results of this investigation clearly demonstrate that the expression most of genes encoding TP53-related factors depends upon acute L-glutamine deprivation condition as well as upon ERN1, the major signaling system of the endoplasmic reticulum stress.

Key words: glutamine deprivation; endoplasmic reticulum stress, ERN1, RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, NME6, gene expressions.

INTRODUCTION

Malignant tumors use endoplasmic reticulum stress for activation of proliferation [1–3]. Moreover, the endoplasmic reticulum stress response-signalling ERN1 pathway is linked to apoptosis and cell death processes and suppression of ERN1 gene function significantly decreases tumor growth [1, 4, 5]. Malignant gliomas are highly aggressive tumors and are characterized by marked angiogenesis, extensive tumor cell invasion into the normal brain parenchyma and to date there is no efficient treatment available. The very poor prognosis and the moderate efficacy of conventional clinical approaches therefore underline the need for new therapeutic strategies. Ischaemia as well as hypoxia is associated with glioma development and locally induce an adaptive response which confers to tumor cells an enhanced survival and a more aggressive be-

haviour. A better knowledge of tumor responses to hypoxia is required to elaborate therapeutical strategies of cell sensibilization, based on the blockade of survival mechanisms [1, 5].

The endoplasmic reticulum is a key organelle in the cellular response to nutrient deprivation, hypoxia, and some chemicals which activate a complex set of signaling pathways named the unfolded protein response. This adaptive response is activated upon the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum and is mediated by three endoplasmic reticulum-resident sensors named PERK (PRK-like ER kinase), IRE1/ERN1 (Inositol Requiring Enzyme-1/Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1) and ATF6 (Activating Transcription Factor 6), however, ERN1 is the dominant sensor of the unfolded protein response to the accumulation of misfolded proteins and represents a key regulator of the life and death processes [1,

© D.O. Minchenko, S.V. Danilovskyi, I.V. Kryvdiuk, N.A. Hlushchak, O.V. Kovalevska, L.L. Karbovskyi, O.H. Minchenko

6, 7]. Misfolded proteins in the endoplasmic reticulum lumen activate two distinct catalytic domains of ERN1, which display serine/threonine trans-autophosphorylation and endoribonuclease activities, respectively. ERN1-associated endoribonuclease activity is involved in the degradation of a specific subset of mRNA and also initiates the cytosolic splicing of the pre-XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA whose mature transcript encodes a transcription factor that stimulates the expression of unfolded protein response specific genes [2, 8].

The tumor protein 53 (TP53) is one of the best-known tumor suppressors. TP53 responds to diverse cellular stresses to regulate expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism [9, 10]. This protein is involved in cell cycle regulation as a transactivator that acts to negatively regulate cell division by controlling a set of genes required for this process, including an inhibitor of cyclin-dependent kinases, via binding to gene specific response elements, but induction of necrosis by TP53 seems to be largely independent of transcription regulation [11].

Stability as well as activity of TP53 depends upon many factors. Thus, death effector domain-associated factor RYBP (RING1 and YY1-binding protein) also known as YEAF (YY1 and E4TF1-associated factor 1) or DADAF (DAD-associated factor) inhibits ubiquitination and subsequent degradation of TP53, and thereby plays a role in regulating transcription of TP53 target genes. This factor interacts with MDM2 and decreases MDM2-mediated TP53 ubiquitination, stabilizing TP53 and increasing its activity [12]. RYBP is decreased in human cancer tissues and implicated in the regulation of the transcription as a repressor of the transcriptional activity of E4TF1 and promotes apoptosis [12, 13].

There is data that TP53 binding proteins (TP53BP1, TP53BP2, and TP53BP3) modulate p53 function and suppresses tumor growth and promotes susceptibility to apoptosis, but its ac-

tivity depends upon different factors [3, 14–18]. Thus, TP53BP1 has a role in checkpoint signaling during mitosis, enhances TP53-mediated transcriptional activation and plays a role in the response to DNA damage [18, 19]. TP53BP2 is a member of the ASPP (apoptosis-stimulating protein of p53) family of TP53 interacting proteins which are down regulated in tumor tissues and is required for the induction of apoptosis by TP53-family proteins [16]. TP53BP2 protein promotes DNA binding and transactivation of TP53-family proteins on the promoters of pro-apoptotic genes. TP53BP3, also known as SUMO1-protein E3 ligase TOPORS, contains a RING-type zinc finger domain and functions as an ubiquitin-protein E3 ligase. It regulates TP53 stability through ubiquitin-dependent degradation and is involved in cell growth, cell proliferation and apoptosis [3, 21, 22].

There is data that NME6 (non-metastatic cells 6) also known as NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6 inhibits of p53-induced apoptosis and also participates in oncogenesis [23, 24]. SESN1 (sestrin 1 or TP53 regulated PA26 nuclear protein) and ZMAT3 (zinc finger, Matrin-type 3 or TP53 target zinc finger protein) are TP53 target genes and have a role in the TP53-dependent growth regulatory pathway [25–27]. It is known that cell growth is positively regulated by mTOR, whose activity is inhibited by Sestrin1 and sestrin2 [25]. Thus, SESN proteins provide an important link between genotoxic stress, TP53 and the mTOR signaling pathway. Recently was shown that ZMAT3 is an mRNA stability-regulating protein which prevents cellular senescence by regulating p21 mRNA decay through control of RISC recruitment [28]. ZMAT3 can bind different types of double-stranded RNAs, including small interfering RNAs and microRNAs [26, 27].

Because inhibition of ERN1 signaling enzyme function significantly decreases tumor growth [4, 5] and TP53 is one of the best-known tumor suppressors, the aim of this study was investigation of the effect of L-glutamine deprivation on the expression of TP53-related genes

(RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, and NME6), which participate in the regulation of cell proliferation and apoptosis, in glioma cells in relation to knockdown of ERN1. Moreover, using bioinformatics screening we have identified the potential XBP1-response elements in TOPORS and SESN1 genes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The glioma cell line U87 was obtained from ATCC (USA) and grown in high glucose (4.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with glutamine (2 mM), 10% fetal bovine serum (Equitech-Bio, Inc., USA), penicillin (100 units/ml; Gibco) and streptomycin (0.1 mg/ml; Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. In this work we used two sublines of this glioma cell line. One subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of vector (pcDNA3.1), which was used for creation of dominant-negative constructs (dnERN1). This untreated subline of glioma cells (control glioma cells) was used as control 1 in the study of L-glutamine deprivation action on the expression level of RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, and NME6 genes. Second subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of dnERN1 and has suppressed both protein kinase and endoribonuclease activities of this bifunctional sensing and signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress. These cells were obtained from prof. M. Moenner (France) [1]. For creation of acute L-glutamine deprivation condition, control glioma cells and ERN1 knockdown glioma cells were washed in DMEM and then incubated in the medium without glutamine for 16 hrs. The cells which over express dnERN1 were used as control 2 for investigation the effect of L-glutamine deprivation condition on gene expressions under blockade the ERN1 function.

The blockade of both kinase and endoribonuclease enzymatic activity of ERN1 in glioma

cells that over express a dominant-negative construct of endoplasmic reticulum–nuclei-1 (dnERN1) was studied by analysis of mRNA expression of XBP1 alternative splice variant (XBPs), a key transcription factor in ERN1 signaling, using cells treated by tunicamycin (0.01 mg/ml for 2 hours). The proliferation rate of control glioma cells and ERN1 knockdown cells were measured in triplicates after 3 days by using a cell counter (Coultronics, Margency, France).

Total RNA was extracted from glioma cells using Trizol reagent according to manufacturer protocols (Invitrogen, USA). The RNA pellets were washed with 75 % ethanol and dissolved in nuclease-free water. For additional purification RNA samples were re-precipitated with 95 % ethanol and re-dissolved again in nuclease-free water.

QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis according to manufacturer protocol. The expression level of RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, NME6, and ACTB mRNA were measured in glioma cell line U87 and its subline (clone 1C5) by real-time quantitative polymerase chain reaction using „Mx 3000P QPCR” (Stratagene, USA) and Absolute qPCR SYBRGreen Mix (Thermo Fisher Scientific, ABgene House, UK). Polymerase chain reaction was performed in triplicate.

For amplification the cDNA for RYBP (RING1 and YY1-binding protein; ring1 interactor RYBP), which also known as YEAF (YY1 and E4TF1-associated factor 1) and DADAF (DAD-associated factor), we used next primers: forward 5'–TGACATTGCAGTGGTGGTTT–3' and reverse 5'–TACGAGCTTCCCTGCAACT–3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1944–1963 and 2221–2202 of human RYBP cDNA (GenBank accession number NM_012234). The size of amplified fragment is 278 bp. The amplification of cDNA for TP53BP1 (tumor protein p53 binding protein 1) was performed using forward primer (5'–CAGTCCCAGAAAGACCATGT–3') and reverse primer (5'–CTGGGAAGCAGGAGAAACAG–3'). These oligonucleotides correspond to

sequences 3229 – 3248 and 3463 – 3444 of human TP53BP1 cDNA (GenBank accession number NM_005657). The size of amplified fragment is 235 bp. The amplification of cDNA for TP53TG1 (TP53 target 1) also known as tumor protein p53-activated protein 1 or TP53-inducible gene 1 was performed using forward primer (5'–ACGAAGGTACCCAACCCTCT–3') and reverse primer (5'–TGTTCTTTTGC-CAAGACACG–3'). These oligonucleotides correspond to sequences 206 – 225 and 406 – 387 of human TP53TG1 cDNA (GenBank accession number NM_007233). The size of amplified fragment is 201 bp. For amplification the cDNA for TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase) also known as tumor suppressor p53-binding protein 3 was used next oligonucleotide primers: forward – 5'–TTCGCTGTGTACAG-GAGTGG–3' and reverse – 5'–CCGGTG-GAGTTGTTGTTCTT–3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 566 – 585 and 814 – 595 of human USP7 cDNA (GenBank accession number NM_005802). The size of amplified fragment is 249 bp. The amplification of cDNA for NME6 (non-metastatic cells 6) also known as NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6 was performed using forward primer (5'–TTCTATC-CGTGGGAGTTTCG–3') and reverse primer (5'–TAGGCCTCCTGTTCCAGCTA–3'). These oligonucleotides correspond to sequences 409 – 428 and 619 – 600 of human NME6 cDNA (GenBank accession number NM_005793). The size of amplified fragment is 211 bp. The amplification of cDNA for SESN1 (sestrin 1) also known as p53-activated gene 26 and p53 regulated PA26 nuclear protein was performed using forward - 5'–GCATGTTCCAACATTTTCGTG–3' and reverse - 5'–GTTCCAAATTGCC-GTCTAA–3' primers. These primers nucleotide sequences correspond to 1641 – 1660 and 1830 – 1811 of human SESN1 cDNA (GenBank accession number NM_014454). The size of amplified fragment is 190 bp. For amplification of cDNA for ZMAT3 (zinc finger, Matrin-type 3) also

known as p53-activated gene 608 protein and p53 Target Zinc Finger Protein) we used forward 5'–GAATTCCGGCAGCATTTAGA–3' and reverse 5'–ACGTTCTTCACACCCACCTC–3' primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1109 – 1128 and 1396 – 1377 of human ZMAT3 cDNA (GenBank accession number NM_022470). The size of amplified fragment is 288 bp. The amplification of beta-actin (ACTB) cDNA was performed using forward - 5'–GGAAGTTCGAGCAAGAGATGG–3' and reverse - 5'–AGCACTGTGTTGGCG-TACAG–3' primers. These primers nucleotide sequences correspond to 747 – 766 and 980 – 961 of human ACTB cDNA (GenBank accession number NM_001101). The size of amplified fragment is 234 bp. The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity. The primers were received from "Sigma" (USA).

An analysis of quantitative PCR was performed using special computer program "Differential expression calculator" and statistical analysis – in Excel program. The values of RYBP, TP53BP1, TOPORS, TP53TG1, SESN1, NME6, and ZMAT3 mRNA expressions were normalized to the expression of beta-actin mRNA and represent as percent of control (100 %). All values are expressed as mean ± SEM from triplicate measurements performed in 4 independent experiments.

RESULTS

We have studied the efficiency of inhibition of enzymatic activity of ERN1 by analysis of mRNA expression of XBP1 and its splice variant (XBP1s) in U87 glioma cells that overexpress a dominant-negative construct of endoplasmic reticulum–nuclei-1 as compared to control glioma cells transfected with a vector. As shown in Fig. 1, inductor of endoplasmic reticulum stress, tunicamycin (0,01 mg/ml), strongly induces the alternative splicing of XBP1 only in control glioma cells, while having no effect on this process

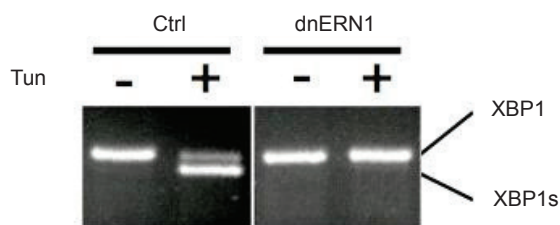


Fig. 1. Effect of tunicamycin (Tun; 0,01 mg/ml) on mRNA level of transcription factor XBP1 and its alternative splice variant (XBP1s) in glioma cell line U87 stable transfected with vector (Ctrl) and its subline stable transfected with dominant-negative construct of endoplasmic reticulum–nuclei-1 (dnERN1)

in cells, transfected by dnERN1. Moreover, inhibition of ERN1 results in suppression of the proliferation rate of cells, expressing dnERN1 (two fold lower after 3 days in culture as compared to control U87 glioma cells; Fig. 2). It is possible that inhibition of ERN1 can result in suppression of malignant cell proliferation possibly though deregulation of TP53 signaling.

As shown in Fig. 3, the blockade of ERN1 enzyme function in U87 glioma cells affects

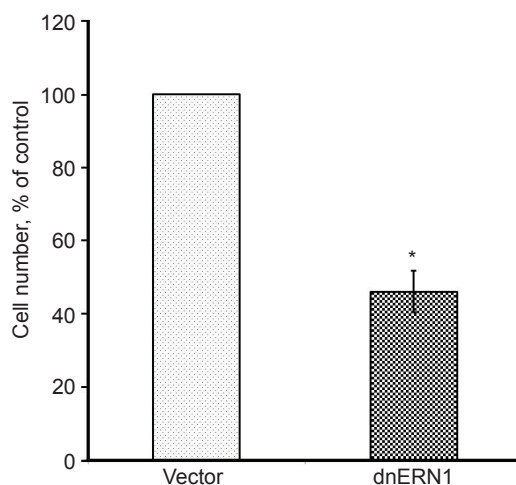


Fig. 2. The proliferation rate of control U87 glioma cells, transfected with vector, (Vector) and ERN1 knockdown cells (dnERN1). Cell number was measured in triplicates after 3 days growing by using a cell counter (Coultronics, Margency, France) and represent as percent of control (100 %); mean \pm SEM; n = 4; *P < 0.05 as compared to control

the expression of several TP53-related genes, being more significant for RYBP, TOPORS, and

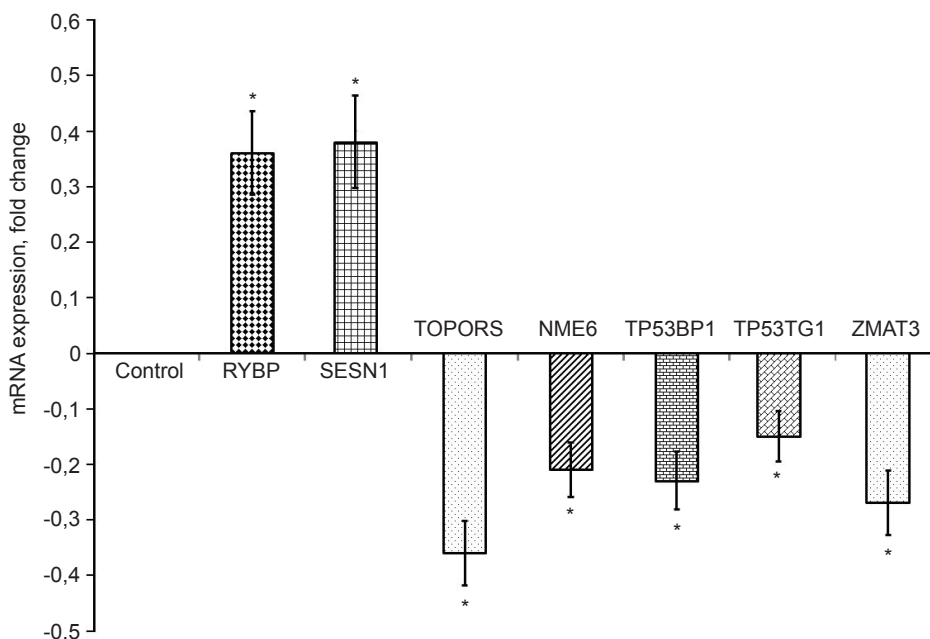


Fig. 3. The expression of RYBP, SESN1, TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53TG1, and ZMAT3 mRNA in glioma cell line U87, transfected with vector, and its subline with knockdown of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1). Values of these mRNA expressions were measured by qPCR, normalized to beta-actin mRNA and represent as fold changes of control (0); n = 4; *P < 0.05 as compared to control

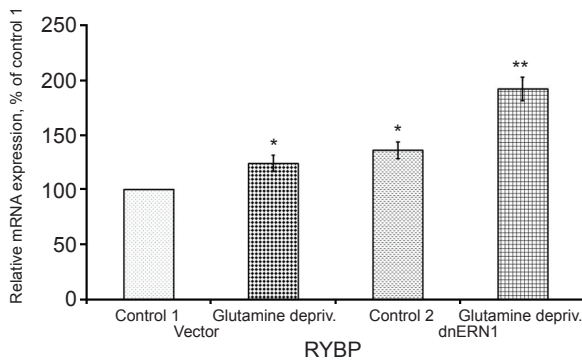


Fig. 4. Expression of RYBP (RING1 and YY1-binding protein; YY1 and E4TF1 associated factor 1) mRNA in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with a deficiency of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1): effect of L-glutamine deprivation (16 hrs). Values of RYBP mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; * - P < 0.05 as compared to control 1; **P < 0.05 as compared to control 2

SESN1 genes. It should be noted that the expression of RYBP and SESN1 genes is increased in glioma cells at this experimental condition. At the same time, the expression of TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53TG1, and ZMAT3 genes is suppressed in glioma cells with ERN1 knockdown (Fig. 3). Thus, the blockade of ERN1 gene function in U87 glioma cells changes the expression of studied TP53-related genes in different ways.

As shown in Fig. 4, the expression level of RYBP (RING1 and YY1-binding protein) mRNA is increased under acute L-glutamine deprivation condition in control glioma cells (stable transfected by vector) as well as in cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme (stable transfected by dnERN1); however, ERN1 knockdown enhance effect of glutamine deprivation on the expression of this gene in U87 glioma cells. Similar results were received with TP53 target gene SESN1, TP53 regulated PA26 nuclear protein. It was shown that the expression of this gene is increased in control and ERN1 knockdown glioma cells treated with L-glutamine deprivation condition, but this effect was more significant in cells with ERN1 knockdown (Fig. 5).

It was also shown that L-glutamine deprivation also increased the expression of TOPORS

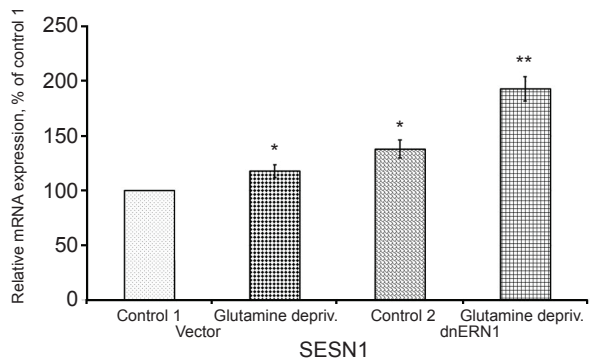


Fig. 5. Expression of SESN1 (sestrin 1; p53 regulated PA26 nuclear protein) mRNA in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with a deficiency of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1): effect of L-glutamine deprivation. Values of SESN1 mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; * - P < 0.05 as compared to control 1; **P < 0.05 as compared to control 2

(topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase) and TP53BP1 (tumor protein TP53 binding protein 1) genes in control glioma cells (Fig. 6 and 7). At the same time, the expression of TOPORS gene did not change significantly by L-glutamine deprivation in glioma cells with suppressed function of ERN1, but expression of TP53BP1 gene is increased in these cells, being more significant in ERN1 knockdown cells as compared to con-

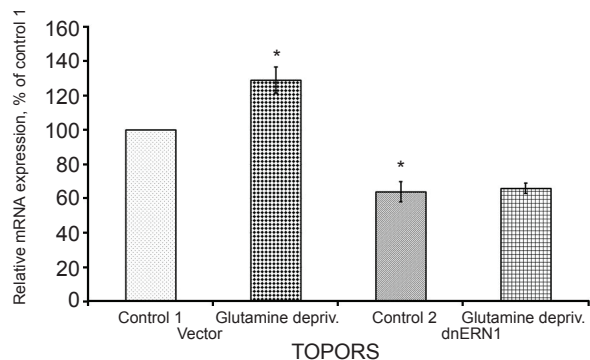


Fig. 6. Effect of L-glutamine deprivation on the expression of TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase; tumor suppressor P53-binding protein 3) mRNA in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with a deficiency of ERN1 (dnERN1). Values of TOPORS mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; *P < 0.05 as compared to control 1

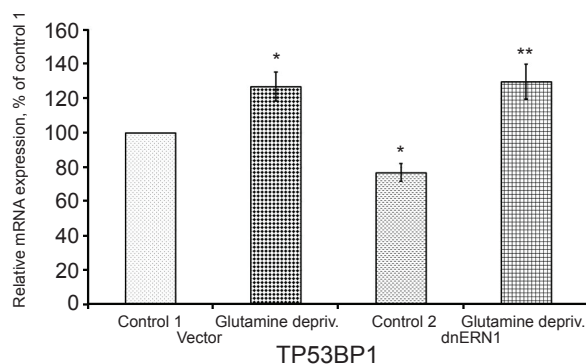


Fig. 7. TP53 binding protein 1 (TP53BP1) mRNA expression in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with knockdown of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1): effect of L-glutamine deprivation. Values of TP53BP1 mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; *P < 0.05 as compared to control 1; **P < 0.05 as compared to control 2

control glioma cells (Figure 6 and 7). Thus, ERN1 knockdown modifies the effect of L-glutamine deprivation on the expression of TOPORS and TP53BP1 genes.

As shown in figure 8, the expression level of tumor protein TP53 target 1 gene (TP53TG1) also known as TP53-activated protein 1 or TP53-inducible gene 1 is increased under L-glutamine deprivation condition in control glioma cells but did not change significantly in cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme. Moreover, the expression of NME6 (NME/

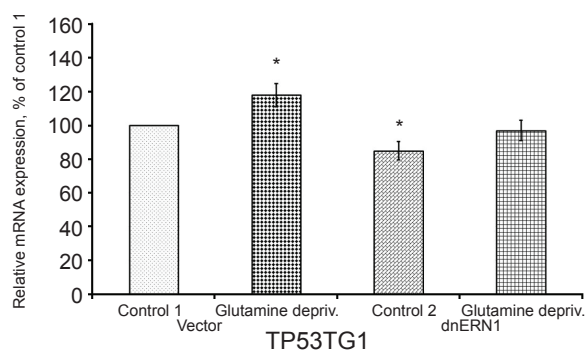


Fig. 8. Effect of L-glutamine deprivation on the expression of TP53 activated protein 1 (TP53TG1; TP53-inducible gene 1 protein) mRNA in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with blockade of ERN1 (dnERN1). Values of TP53TG1 mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; *P < 0.05 as compared to control 1

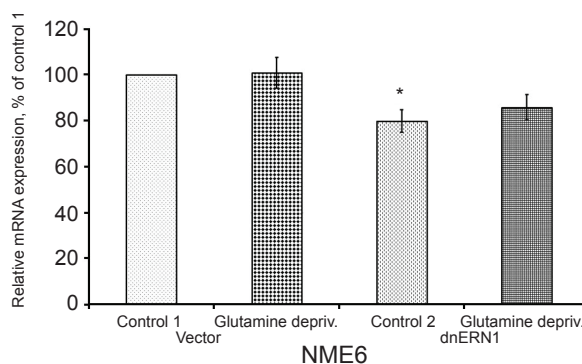


Fig. 9. Non-Metastatic Cells 6 (NME6; NME/NM23 Nucleoside Diphosphate Kinase 6) mRNA expression in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with knockdown of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1): effect of L-glutamine deprivation. Values of NME6 mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; *P < 0.05 as compared to control 1

NM23 nucleoside diphosphate kinase 6) gene is resistant to acute L-glutamine deprivation condition in both types of used glioma cells (Figure 9).

Investigation of ZMAT3 (TP53 target zinc finger protein) gene shown that the expression of its mRNA is increased by L-glutamine deprivation condition in control as well as ERN1 knockdown glioma cells, but this effect was more significant in glioma cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme (Figure 10).

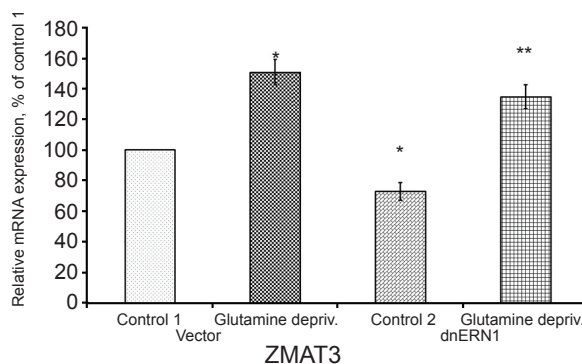


Fig. 10. Expression of ZMAT3 (zinc finger, Matrin-type 3; p53-activated gene 608 protein) mRNA in glioma cell line U87 (Vector) and its subline with a deficiency of the signaling enzyme ERN1 (dnERN1): effect of L-glutamine deprivation (16 hrs). Values of ZMAT3 mRNA expressions were normalized to beta-actin mRNA expression and represent as percent of control (100 %); n = 4; *P < 0.05 as compared to control 1; **P < 0.05 as compared to control 2

DISCUSSION

The TP53 protein coordinates diverse cellular functions through the regulation of the expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest and apoptosis [10, 29]. Despite the intensity of TP53 investigation the molecular mechanisms by which it coordinates diverse cellular functions remain enigmatic. More than 100 physical or genetic interactions with TP53 have been identified to date [29]. In this study we analyzed the expression of several important TP53-associated genes in U87 glioma cells in relation to acute L-glutamine deprivation condition as well as to blockade of ERN1, the major endoplasmic reticulum stress sensor and signaling enzyme, and shown that the blockade of ERN1 gene function in U87 glioma cells changes the expression of all studied TP53-related genes, but in different ways (Fig. 3). Our results clearly demonstrate that the expression of genes which enhance TP53 stability and function (RYBP and SESN1) is increased in glioma cells with ERN1 knockdown and that this increase of RYBP and SESN1 gene expressions may contribute to the suppression of glioma growth in cells without ERN1 functional activity via TP53-dependent growth regulatory pathway [4, 5, 30, 31]. Thus, up-regulation of RYBP, which inhibits ubiquitination and subsequent degradation of TP53, in glioma cells with suppressed ERN1 function (Fig. 4) plays a role in enhancing transcription of TP53 target genes. Moreover, RYBP interacts with MDM2 and decreases MDM2-mediated TP53 ubiquitination, stabilizing TP53 and increasing its activity and promotes apoptosis as well [12, 13]. Thus, increased expression of RYBP gene is associated with suppression of glioma growth [4, 5] and correlates with decreased expression in human cancer tissues [13].

Enhanced expression of TP53 regulated PA26 nuclear protein (SESN1) in glioma cells without ERN1 signaling (Fig. 5) also correlates to the suppression of tumor growth in these cells because this protein mediates TP53 inhibition of cell growth by activating AMP-activated protein

kinase, which results in the inhibition of the mammalian target of rapamycin protein [32]. Thus, increased expression of SESN1 also may contribute in the suppression of glioma growth in cells with ERN1 knockdown by enhancing the TP53 transcriptional activity.

At the same time, the expression of NME6, TOPORS, and ZMAT3 genes is suppressed in glioma cells with ERN1 knockdown (Fig. 6, 9, 10) and this down-regulation of TP53-related genes may also contribute to the suppression of tumor growth which was shown for ERN1 knockdown glioma cells [4, 5]. NME6 is an inhibitor of TP53-induced apoptosis and its down-regulation should enhance TP53 apoptotic function. Moreover, nucleoside diphosphate kinases are evolutionarily conserved enzymes involved in many biological processes such as metastasis, proliferation, development, differentiation, vesicle transport, and apoptosis in vertebrates, but molecular mechanisms of these processes are still largely unknown [33, 34].

Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase TOPORS also functions as an E3 SUMO1-protein ligase and is involved in cell growth, proliferation and apoptosis that regulate TP53 stability through ubiquitin-dependent degradation [35]. TOPORS induced TP53 sumoylation as well as a variety of other cellular proteins [36]. Thus, down-regulation of TOPORS in glioma cells by ERN1 knockdown may increase TP53 transcription activity which is inhibited by this factor and may contribute in the suppression of glioma growth in cells without ERN1 function [4, 5].

Blockade of ERN1 in glioma cells also leads to the decreased expression of ZMAT3 (TP53 target zinc finger protein) gene but molecular mechanisms of this relation is not yet clear. There is data that ZMAT3 participates in the TP53-dependent growth regulatory pathway by regulation of TP53 expression and translocation to the nucleus as well as RNA-mediated gene silencing [26, 28, 35]. At the same time, recently was shown that ZMAT3 as an mRNA stability-regulating protein prevents cellular senescence

[28] and its decrease possibly participate in suppression of ERN1 knockdown of glioma cells proliferation (Fig. 2). Moreover, the ZMAT3 protein can bind different types of double-stranded RNAs, including small interfering RNAs and microRNAs [26, 27] and this binding has a role in ZMAT3-mediated regulation of cell growth. It is possible that ZMAT3 protein also contributes to TP53-mediated apoptosis by regulation of TP53 expression and translocation to the nucleus and nucleolus [27, 37]. At the same time, ZMAT3 knockdown causes a dramatic inhibition of N-MYC expression and triggers differentiation in neuroblastoma cells [27].

We have also shown that L-glutamine deprivation affects the expression of most of the studied TP53-related genes and that these changes in gene expressions are depended upon ERN1 signaling enzyme function. It is interesting to note that acute L-glutamine deprivation induces the expression of genes which were up-regulated in glioma cells without ERN1 signaling (RYBP and SESN1) both in control glioma cells and ERN1 knockdown cells; however, blockade the ERN1 function enhances effect of L-glutamine deprivation on both gene expressions. At the same time, the expression of genes which were down-regulated in ERN1 knockdown glioma cells (TOPORS, TP53BP1, TP53TG1, and ZMAT3) is increased by L-glutamine deprivation condition in control glioma cells, but suppression of ERN1 signaling enzyme function modifies the expression of these genes. Thus, effect of L-glutamine deprivation on the expression of TP53BP1 and ZMAT3 genes was significantly higher in ERN1 knockdown cells and was eliminated on the expression of TP53TG1 and TOPORS genes.

Thus, most of studied TP53-related genes are responsible to L-glutamine deprivation condition in a different ways that can enhance or reduce the TP53 stability as well as functional activity. Moreover, the effect of ERN1 knockdown enhances the effect of L-glutamine deprivation condition on the expression of RYBP, TP53BP1, ZMAT3, and SESN1 genes, but eliminates enhanced its effect on TP53TG1 and TOPORS

gene expressions. It is possible that L-glutamine deprivation condition may increase the effect of the blockade of ERN1 signaling enzyme on TP53 stability and transcriptional activity by changing the expression of RYBP and SESN1 genes and induces TP53-dependent cell growth repression and apoptosis. At the same time, the blockade of ERN1 signaling enzyme increases the effect of L-glutamine deprivation on the expression of TP53BP1 and ZMAT3 genes which have reversible effect on TP53 stability and its functional activity. Thus, endoplasmic reticulum stress as well as nutrient deprivation is necessary component of malignant tumor growth and cell survival; however, between the presence of nutrient deprivation and the regulation of cell death pathways exists a complex relationship [3, 38–40].

Results of this investigation clearly demonstrate that the expression of genes encoding TP53-related factors is mostly depended upon endoplasmic reticulum stress signaling as well as ischemic condition and mostly correlate with suppression of tumor growth in cells with ERN1 knockdown.

**Д.А. Минченко, С.В. Даниловский,
И.В. Кривдюк, Е.В. Губеня, Л.Л. Карбовский,
А.Г. Минченко**

ОСТРЫЙ ДЕФИЦИТ L-ГЛЮТАМИНА НАРУШАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ TP53-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНОВ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87

Мы изучили эффект острого дефицита L-глутамина на экспрессию таких генов, зависящих от протеина опухоли р53 (TP53), как RYBP, TOPORS, TP53BP1, TP53TG1, SESN1, NME6, и ZMAT3 в клетках глиомы с выключенной активностью ERN1. Показано, что блокада функции гена ERN1 в клетках глиомы линии U87 усиливает экспрессию генов RYBP и SESN1, при этом интенсивность экспрессии генов TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, NME6 и ZMAT3 снижается. Более того, уровень экспрессии генов RYBP, SESN1, TP53BP1 и ZMAT3 увеличивается в контрольных клетках глиомы при дефиците L-глутамина в среде, но выключение функции энзима ERN1 существенно усиливает этот эффект на экспрессию всех этих генов. В то же время выключение функции энзима ERN1 снимает зависимость экспрессии генов TP53TG1 и TOPORS от дефи-

цита L-глутаміна. Результати этой роботи указывают на зависимость экспресии большинства ассоциированных с TP53 генов от условий острого дефицита глутаміна в среде, как и от ERN1, основной сигнальной системы стресса эндоплазматического ретикулума.

Ключевые слова: дефицит глутаміна, стресс эндоплазматического ретикулума, RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, NME6, экспресия генов.

**Д.О. Мінченко, С.В. Даніловський,
І.В. Кривдюк, О.В. Губеня, Л.Л. Карбовський,
А.Г. Мінченко**

ГОСТРИЙ ДЕФІЦИТ L-ГЛУТАМІНУ ПОРУШУЄ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ TP53-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87

Ми дослідили ефект гострого дефіциту L-глутаміну на експресію таких генів, залежних від протеїну пухлин p53 (TP53), як RYBP, TOPORS, TP53BP1, TP53TG1, SESN1, NME6, та ZMAT3 у клітинах гліоми з виключеною активністю ERN1. Показано, що блокада функції гена ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 посилює експресію генів RYBP та SESN1, при цьому інтенсивність експресії генів TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, NME6 та ZMAT3 знижується. Більше того, рівень експресії генів RYBP, SESN1, TP53BP1 та ZMAT3 збільшується у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту L-глутаміну у середовищі, але виключення функції ензиму ERN1 істотно посилює цей ефект на експресію всіх цих генів. Водночас виключення функції ензиму ERN1 знімає залежність експресії генів TP53TG1 та TOPORS від дефіциту L-глутаміну. Результати цієї роботи вказують на залежність експресії більшості асоційованих з TP53 генів від умов гострого дефіциту глутаміну у середовищі, як і від ERN1, основної сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулума.

Ключові слова: дефіцит глутаміну, стрес ендоплазматичного ретикулума, RYBP, TP53BP1, TP53TG1, TOPORS, SESN1, ZMAT3, NME6, експресія генів.

REFERENCES

1. Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 2007 Nov 15; 67(22): 10631–4.
2. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar; 65(6): 862–994.
3. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012 Jun 25; 197(7): 857–67.
4. Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, Delugin M, Bouchecareilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in

- malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Aug 31; 107(35): 15553–8.
5. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouchecareilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2007 Jul 15; 67(14): 6700–7.
6. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 739–89.
7. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006 Jan 24; 66(2 Suppl 1): S102–9.
8. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2009 Aug 10; 186(3): 323–31.
9. Dent P. Non-canonical p53 signaling to promote invasion. *Cancer Biol Ther.* 2013 Oct 1; 14(10): 879–80.
10. Golubovskaya VM, Cance WG. Targeting the p53 pathway. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013 Oct; 22(4): 747–64.
11. Lee SK, Kim YS. Phosphorylation of eIF2 α attenuates statin-induced apoptosis by inhibiting the stabilization and translocation of p53 to the mitochondria. *Int J Oncol.* 2013 Mar; 42(3): 810–6.
12. Chen D, Zhang J, Li M, Rayburn ER, Wang H, Zhang R. RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO Rep.* 2009 Feb; 10(2): 166–72.
13. Novak RL, Phillips AC. Adenoviral-mediated Rybp expression promotes tumor cell-specific apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2008 Nov; 15(11): 713–22.
14. Grotsky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, Neumann MA, Yaddanapudi SC, Croke M, Martinez-Alonso M, Redwood AB, Ortega-Martinez S, Feng Z, Lerma E, Ramon y Cajal T, Zhang J, Matias-Guiu X, Dusso A, Gonzalo S. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. *J Cell Biol.* 2013 Jan 21; 200(2): 187–202.
15. Hong S, Li X, Zhao Y, Yang Q, Kong B. TP53BP1 suppresses tumor growth and promotes susceptibility to apoptosis of ovarian cancer cells through modulation of the Akt pathway. *Oncol. Rep.* 2012 Apr; 27(4): 1251–7.
16. Li S, Shi G, Yuan H, Zhou T, Zhang Q, Zhu H, Wang X. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP. *Oncol Rep.* 2012 Jul; 28(1): 133–40.
17. Wang Y, Godin-Heymann N, Dan Wang X, Bergamaschi D, Llanos S, Lu X. ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2013 Apr; 20(4): 525–34.
18. Moudry P, Lukas C, Macurek L, Neumann B, Heriche JK, Pepperkok R, Ellenberg J, Hodny Z, Lukas J, Bartek J. Nucleoporin NUP153 guards genome integrity by promoting nuclear import of 53BP1. *Cell Death Differ.* 2012 May; 19(5): 798–807.
19. Noon AT, Goodarzi AA. 53BP1-mediated DNA double

- strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Oct 10; 10(10): 1071-6.
20. Li X, Xu B, Moran MS, Zhao Y, Su P, Haffty BG, Shao C, Yang Q. 53BP1 functions as a tumor suppressor in breast cancer via the inhibition of NF- κ B through miR-146a. *Carcinogenesis*. 2012 Dec; 33(12): 2593-600.
 21. Yang X, Li H, Zhou Z, Wang WH, Deng A, Andrisani O, Liu X. Plk1-mediated phosphorylation of Topors regulates p53 stability. *J Biol Chem*. 2009 Jul 10; 284(28): 18588-92.
 22. Serão NV, Delfino KR, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics*. 2011 Jun 7; 4: 49.
 23. Desvignes T, Pontarotti P, Fauvel C, Bobe J. Nme protein family evolutionary history, a vertebrate perspective. *BMC Evol Biol*. 2009 Oct 23; 9: 256.
 24. Wang CH, Ma N, Lin YT, Wu CC, Hsiao M, Lu FL, Yu CC, Chen SY, Lu J. A shRNA functional screen reveals Nme6 and Nme7 are crucial for embryonic stem cell renewal. *Stem Cells*. 2012 Oct; 30(10): 2199-211.
 25. Budanov AV, Karin M. p53 target genes *sestrin1* and *sestrin2* connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008 Aug 8; 134(3): 451-60.
 26. Mendez Vidal C, Prah M, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs. *FEBS Lett*. 2006 Aug 7; 580(18): 4401-8.
 27. Vilborg A, Bersani C, Wickstrom M, Segerström L, Kogner P, Wiman KG. Wig-1, a novel regulator of N-Myc mRNA and N-Myc-driven tumor growth. *Cell Death Dis*. 2012 Apr 19; 3: E298.
 28. Kim BC, Lee HC, Lee JJ, Choi CM, Kim DK, Lee JC, Ko YG, Lee JS. Wig1 prevents cellular senescence by regulating p21 mRNA decay through control of RISC recruitment. *EMBO J*. 2012 Nov 14; 31(22): 4289-303.
 29. Mills KD. Tumor suppression: Putting p53 in context. *Cell Cycle*. 2013 Nov 15; 12(22): 3461-2.
 30. Shahbazi J, Lock R, Liu T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis. *Front Genet*. 2013 May 13; 4: 80.
 31. Thomas SE, Malzer E, Ordonez A, Dalton LE, van 't Wout EF, Liniker E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. p53 and translation attenuation regulate distinct cell cycle checkpoints during ER stress. *J Biol Chem*. 2013 Mar 15; 288(11): 7606-17.
 32. Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, Seizinger B, Kley N. PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene*. 1999 Jan 7; 18(1): 127-37.
 33. Apostolidis PA, Lindsey S, Miller WM, Papoutsakis ET. Proposed megakaryocytic regulon of p53: the genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation. *Physiol Genomics*. 2012 Jun 15; 44(12): 638-50.
 34. Perina D, Bosnar MH, Mikoč A, Müller WE, Cetković H. Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011 Oct; 384(4-5): 451-60.
 35. Weger S, Hammer E, Heilbronn R. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 2005 Sep 12; 579(22): 5007-12.
 36. Shinbo Y, Taira T, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int J Oncol*. 2005 Mar; 26(3): 641-8.
 37. Guo W, Zou YB, Jiang YG, Wang RW, Zhao YP, Ma Z. Zinc induces cell cycle arrest and apoptosis by upregulation of WIG-1 in esophageal squamous cancer cell line EC109. *Tumour Biol*. 2011 Aug; 32(4): 801-8.
 38. Malhotra JD, Kaufman RJ. ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Sep 1; 3(9): a004424.
 39. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med*. 2013 Jan; 17(1): 30-54.
 40. Lenihan CR, Taylor CT. The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem Soc Trans*. 2013 Apr; 41(2): 657-63.

Department of Molecular Biology, Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, 9 Leontovycha St., 01601, Kyiv, Ukraine;
Departments of Pediatrics, Bogomolets National Medical University, 13 Shevchenka Blvd., 01601, Kyiv, Ukraine
E-mail: ominchenko@yahoo.com

Received 14.11.2013

А.І. Гоженко, Н.Д. Філіпець

Функціональний стан нирок після активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів при експериментальній гострій гіпоксії

В експериментах на нелінійних білих щурах із моделлю гострої гіпоксії вивчено зміни функціонального стану нирок після разового внутрішньошлункового введення оригінального фторвмісного активатора аденозинтрифосфатзалежних калієвих ($K_{ATФ}$) каналів флокаліну в дозі 5 мг/кг на тлі водного індукованого діурезу. Показано, що під впливом флокаліну за умов дії прогіпоксичних факторів: нітриту натрію (в дозі 50 мг/кг, підшкірно) та динітрофенолу (в дозі 3 мг/кг, внутрішньоочеревинно), активуються воломорегульовальна, іонорегульовальна та екскреторна функції нирок. Ренальні ефекти після активації $K_{ATФ}$ -каналів у щурів із гістогемічною гіпоксією були спричинені змінами каналцевих та, переважно, клубочкових процесів. Підвищення швидкості клубочкової фільтрації, відновлення енергозалежної дистальної реабсорбції іонів натрію, зменшення їх втрати з сечею, зниження протеїнурії після введення флокаліну за умов розвитку гострої гіпоксії доповнюють спектр протективних ефектів вітчизняного активатора $K_{ATФ}$ -каналів.

Ключові слова: нирки, аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, гостра гіпоксія, флокалін.

ВСТУП

У механізмах відновлення порушеного кисневого гомеостазу особливу роль відіграють аденозинтрифосфатзалежні калієві ($K_{ATФ}$) канали. Їх відкриття, у відповідь на зниження внутрішньоклітинного пулу АТФ, адаптаційно стабілізує енергетично залежні процеси, активує функціональні відповіді та фізіологічну реакцію організму на гіпоксію. Унікальна здатність $K_{ATФ}$ -каналів забезпечувати взаємозв'язок метаболічних процесів й електрофізіологічного стану клітин зумовлює їх використання як мішеней для дослідження засобів медикаментозної корекції поліорганних патологічних змін, що спричинені різними формами гіпоксії. Встановлення ефекторної ролі цих каналів у реалізації кардіопротекторного впливу переривчастої гіпоксії – феномену «ішемічного прекодиціонування», найбільш ефективного способу зменшення розмірів

інфаркту міокарда, спонукало до інтенсивного пошуку і вивчення фармакологічних активаторів калієвих каналів. Про високий потенціал представників цього класу переконливо свідчать дані експериментальних досліджень кардіопротективних механізмів оригінального вітчизняного фторвмісного активатора $K_{ATФ}$ -каналів флокаліну [1–4]. Відповідність виявлених енерготропних, антигіпоксичних і антиоксидантних ефектів ендогенним механізмам захисту серця при гіпоксії, які опосередковані активацією $K_{ATФ}$ -каналів сарколемальних і мітохондріальних клітинних мембран, а також остаточно не встановлена функціональна їх значимість для більшості тканин викликають інтерес щодо розширення уявлень про фармакодинаміку флокаліну.

Відсутність вираженої нозології та специфічних системних порушень при неадекватному забезпеченні киснем передбачає вплив флокаліну на інші органи-мішені гіпоксії, які

потребують корекції. Істотний енергодефіцит спричинює мембранодеструктивні процеси у нефроцитах, значні зміни структурно-функціональної організації і розвиток хронічної хвороби нирок. $K_{ATФ}$ -канали ідентифіковані у каналцевою відділі нефрону, у кортикальних збірних трубочках [5]. Однак значення калієвих каналів у ренопротекції та вплив модуляторів їх активності на діяльність нирок при переважній недостатності кисню у патогенезі розвитку нефрологічних захворювань практично не вивчені.

Згідно з даними наших останніх досліджень, встановлено низку нефротропних ефектів нового фторвмісного активатора $K_{ATФ}$ -каналів. Так, виявлено здатність флокаліну після функціональних водно-сольових навантажень організму щурів активувати водо-, іоно- та кислоторегулювальну функції нирок унаслідок впливу як на клубочкові, так і на каналцеві енергозалежні процеси. Наступні експерименти продемонстрували коригуючий вплив вітчизняного відкривача калієвих каналів на прямі маркери розвитку та прогресування патології нирок: суттєве підвищення швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) та антипротеїнуретична дія засвідчили потенційну здатність флокаліну сповільнювати формування токсичної сулемової нефропатії [6–8]. Отже, відповідність отриманих ефектів флокаліну стратегії сучасної нефропротекції, яка спрямована на збереження ниркових реакцій, попередження зниження ШКФ, реверсію протеїнурії стала підґрунтям для припущення захисної дії активатора $K_{ATФ}$ -каналів при ренальній дисфункції, індукованої швидким зниженням доставки кисню до нефроцитів.

Метою нашої роботи було вивчення змін функціонального стану нирок у щурів після разової активації $K_{ATФ}$ -каналів за умов розвитку гострої гіпоксії та оцінка кардіопротективної ефективності флокаліну при ренальному пошкодженні гіпоксичного генезу.

МЕТОДИКА

Досліди виконували на 30 лабораторних нелінійних білих щурах масою 0,15–0,17 кг, яких утримували у звичайних умовах віварію на гіпонатрієвому раціоні харчування (зерно пшениці) з вільним доступом до відстояної водопровідної води. Роботу з експериментальними тваринами проводили відповідно до національних вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2011), узгоджених із положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Для моделювання гострої гіпоксії підшкірно щурам I групи вводили 1%-й розчин метгемоглобінутворювача нітриту натрію (НН) у дозі 50 мг/кг і через 30 хв – внутрішньо-оочередивно 0,1%-й розчин 2,4-динітрофенолу (ДНФ) у дозі 3 мг/кг. Після введення НН розвивалася гемічна гіпоксія середнього ступеня важкості. ДНФ є класичним агентом, який викликає розвиток тканинної гіпоксії внаслідок розщеплення процесів окиснення і фосфорилування [9]. Отже, за умов нашої модифікації виникає комбінована гемічна і гістотоксична гіпоксія. Щурам II групи перед ДНФ внутрішньошлунково через металевий зонд вводили субстанцію флокаліну в дозі 5 мг/кг на 1 % слизу крохмалю в об'ємі 5 мл/кг. Функціональний стан нирок досліджували за умов індукованого водного діурезу: інтактним (контрольна група) і дослідним щурам внутрішньошлунково через металевий зонд вводили підігріту до 37°C водопровідну воду в кількості 5 % від маси тіла. Через 2 год від початку експерименту під легким ефірним наркозом проводили евтаназію щурів. У сечі та в плазмі крові визначали концентрацію іонів натрію і калію методом полум'яної фотометрії на ФПЛ-1, креатинін у сечі визначали на КФК-2 за методом Фоліна, у плазмі крові – за методом Поппера в модифікації Мерзона за реакцією з пікриновою кислотою із наступним колориметруванням на спектро-

фотометрі СФ-46 [10]. Концентрацію білка в сечі досліджували сульфосаліциловим методом [11]. Показники, які характеризували функціональний стан нирок, розраховували за загальноновизнаними формулами. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "Statgrafics" з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених експериментів було встановлено, що після разового введення флокаліну в дозі 5 мг/кг щурам знижений

за умов розвитку гострої гіпоксії на 17,5 % показник діурезу сягав контрольного значення (табл. 1). Під впливом прогіпоксичних чинників НН і ДНФ підвищувалася проникність стінки ниркових каналців і відносна реабсорбція води достовірно зростала. Знижувалося виділення води, необхідної для розчинення речовин, що екскретуються нирками і на 18,2 % зменшувався кліренс вільної від іонів натрію води. Після активації K_{ATP} -каналів зберігався підвищений рівень відносної реабсорбції води, але виділення осмотично вільної води знижувалося до контрольних значень. Під впливом флокаліну транспорт іонів натрію у проксимальному

Таблиця 1. Показники функцій нирок після разового внутрішньошлункового введення флокаліну (5 мг/кг) щурам за умов розвитку гострої гістогемічної гіпоксії при водному індукованому діурезі в об'ємі 5% від маси тіла ($\bar{x} \pm Sx$; $n=10$)

Показники	Інтактні щури (контроль)	Гостра гіпоксія (I група)	Гостра гіпоксія і введення флокаліну (II група)
Діурез, мл/2 год·100г	3,26 ± 0,147	2,69 ± 0,164 P<0,05	3,25 ± 0,260
Концентрація креатиніну у сечі, ммоль/л	0,82 ± 0,106	1,65 ± 0,085 P<0,01	1,40 ± 0,139 P<0,01
Екскреція креатиніну, мкмоль/2 год·100г	2,65 ± 0,268	4,39 ± 0,140 P<0,001	4,72 ± 0,820 P<0,05
Концентрація креатиніну у плазмі крові, ммоль/л	36,0 ± 8,00	31,5 ± 3,75	25,5 ± 4,00
Кліренс вільної від іонів натрію води, мл/2 год·100г	3,25 ± 0,148	2,66 ± 0,159 P<0,05	3,24 ± 0,258
Відносна реабсорбція води у каналцях, %	95,41 ± 1,003	98,11 ± 0,159 P<0,05	98,21 ± 0,135 P<0,05
Концентраційний індекс ендogenous креатиніну, од.	28,26 ± 6,091	55,49 ± 4,835 P<0,01	57,52 ± 4,201 P<0,01
Клубочкова фільтрація, мкл/хв·100г	752,2 ± 157,93	1146,3 ± 68,95 P<0,05	1560,0 ± 166,04 P<0,01; P ₁ <0,05
Концентрація білка у сечі, г/л	0,017 ± 0,0018	0,043 ± 0,0034 P<0,001	0,020 ± 0,0022 P ₁ <0,001
Екскреція білка, мг/2год·100г	0,056 ± 0,0062	0,115 ± 0,0084 P<0,001	0,067 ± 0,0107 P ₁ <0,01
Екскреція білка, /100 мкл КФ	0,008 ± 0,0012	0,012 ± 0,0023	0,004 ± 0,0004 P<0,01; P ₁ <0,01

Примітка. Тут і надалі: P – достовірність різниць порівняно з контролем; P₁ – достовірність різниць порівняно з нелікованими щурами; КФ – клубочковий фільтрат.

відділі нефрону (табл. 2) зростав на 35,4 % у порівнянні з I групою і на 109,3 % порівняно з контролем, що супроводжувалось еквівалентним збільшенням каналцевої дифузії води, стабілізацією водорегулювальної функції нирок і діурезу (див. табл. 1).

Разом із тим рівень діурезу, як і кількість реабсорбованої у каналцях води, залежать від функціонального стану клубочкового сектора. Після поєднаної дії потужних факторів гемічної та гістотоксичної гіпоксії у щурів I групи підвищувалася ШКФ на 52,4 % (див. табл. 1). Посилення фільтраційних процесів

за умов розвитку гострого гіпоксичного впливу – адаптаційна реакція організму у відповідь на нестачу кисню. Одним із важливих регуляторних механізмів є збільшення потужності гомеостатичних функцій нирок внаслідок збільшення ШКФ – включення функціонального ниркового резерву (ФНР) [12]. Зростання останнього у пошкоджених нефронах віддзеркалилося підвищенням клубочкової фільтрації на початковій стадії розвитку гострої гіпоксичної нефропатії.

На особливу увагу заслуговує гломерулярна реакція, яка спричинена фарма-

Таблиця 2. Показники транспорту іонів натрію і калію після разового введення флокаліну (5 мг/кг) щурам за умов розвитку гострої гістогемічної гіпоксії при водному індукованому діурезі в об'ємі 5% від маси тіла ($\bar{x} \pm Sx$; n=10)

Показники,	Інтактні щури (контроль)	Гостра гіпоксія (I група)	Гостра гіпоксія і введення флокаліну (II група)
Концентрація Na^+ у сечі, ммоль/л	0,61 ± 0,088	1,20 ± 0,258 P<0,05	0,86 ± 0,131
Концентрація Na^+ у плазмі крові, ммоль/л	139,58 ± 4,027	142,08 ± 3,958	141,25 ± 1,250
Фільтраційна фракція Na^+ , мкмоль/хв · 100г	107,19 ± 25,208	162,90 ± 9,493 P<0,05	220,24 ± 22,584 P<0,01; P ₁ <0,05
Екскреція Na^+ , мкмоль/2 год · 100г	1,97 ± 0,287	3,25 ± 0,392 P<0,05	2,77 ± 0,453
Екскреторна фракція Na^+ , мкмоль/хв	0,016 ± 0,0023	0,026 ± 0,0039 P<0,05	0,023 ± 0,0037
Абсолютна реабсорбція Na^+ , мкмоль/хв · 100г	107,17 ± 25,211	162,96 ± 10,559 P<0,05	220,21 ± 22,586 P<0,01; P ₁ <0,05
Концентраційний індекс Na^+ , ум.од.	0,004 ± 0,0007	0,008 ± 0,0006 P<0,01	0,006 ± 0,0009
Кліренс Na^+ , мл/2год · 100г	0,014 ± 0,0024	0,022 ± 0,0027 P<0,05	0,019 ± 0,0031
Дистальна реабсорбція Na^+ , мкмоль/2год · 100г	455,94 ± 34,084	380,53 ± 15,340 P<0,05	457,95 ± 38,658
Проксимальна реабсорбція Na^+ , мкмоль/2год · 100г	12,40 ± 3,012	19,17 ± 1,103 P<0,05	25,96 ± 2,684 P<0,01; P ₁ <0,05
Концентрація K^+ у плазмі крові, ммоль/л	9,37 ± 0,268	13,91 ± 0,277 P<0,001	12,29 ± 0,687 P<0,01; P ₁ <0,05
Концентрація K^+ у сечі, ммоль/л	13,08 ± 1,541	28,5 ± 6,750 P<0,05	23,66 ± 0,944 P<0,001
Екскреція K^+ , мкмоль/2 год · 100г	42,35 ± 4,892	75,18 ± 12,012 P<0,05	77,91 ± 8,607 P<0,01

кологічною активацією K_{ATP} -каналів. За гіпоксичних умов після введення флокаліну ШКФ збільшилася на 36,1 % у порівнянні з щурами I групи і на 107,4 % – з контрольними. Інтегральними механізмами збільшення клубочкової фільтрації плазми під впливом флокаліну можна вважати потужну системну вазодилатацію [13], покращення фібринолітичної активності та гемореологічних властивостей [14]. При підвищенні ниркового кровотоку відновлюється функціонування судин мікроциркуляторного русла. У свою чергу зменшується пошкодження особливо чутливої до гіпоксії юктагломерулярної зони, пригнічуються вазоконстрикторні впливи ренін-ангіотензинової системи (РАС) на приносні артерії нирок, гідростатичний тиск крові та інтенсивність ШКФ зростають.

Зміни клубочкових процесів відображалися на виділенні електролітів, за якими оцінюють функції нирок (див. табл. 2). Активація ренальної гемодинаміки та компенсаторне посилення ШКФ у щурів з моделлю гіпоксичної нефропатії призвели до підвищення на 52 % фільтраційної фракції іонів натрію. Суттєве зростання гломерулярної перфузії і фільтрації під впливом флокаліну спричинило збільшення фільтраційного натрієвого завантаження на 105,5 % щодо контролю і на 35,2 % порівняно з щурами I групи. Абсолютна реабсорбція іонів натрію забезпечувалася пасивним транспортом і збільшувалася відповідно до змін фільтраційного навантаження катіоном каналцевого відділу нефрону.

Незважаючи на відсутність у дослідних щурів достовірних відмінностей концентрації іонів натрію в плазмі крові, зміни транслюбарного їх транспорту у I та II групах не були одноманітними. Під впливом НН і ДНФ у щурів I групи дистальна реабсорбція іонів натрію знижувалася на 16,6 %. Реабсорбція іонів натрію у дистальному відділі нефрону здійснюється щодо значного електролітичного градієнта і є найбільш енергозалежним каналцевим процесом. За умов тканинної гіпоксії істотний енергодефіцит призводив

до гальмування дистальної реабсорбції іонів натрію, що спричинювало підвищення концентрації іонів натрію в сечі на 96,7 % та збільшення натрійурезу на 64,9 %. Пригнічення транспорту іонів натрію у дистальних каналцях відобразилося дворазовим збільшенням концентраційного індексу катіона і підвищенням на 62,5 % екскреторної фракції іонів натрію.

Введення флокаліну при гострій гіпоксії спричинило відновлення контрольного рівня дистальної реабсорбції іонів натрію (див. табл. 2). Концентрація іонів натрію сечі, його концентраційний індекс та екскреція у II групі статистично не відрізнялися від значень у інтактних щурів. Після відкриття K_{ATP} -каналів активувалися компенсаторні метаболічні реакції, можливо, зростала перитубулярна мікроциркуляція, покращувалось енергетичне забезпечення каналцевої реабсорбції іонів натрію у дистальному відділі нефрону. За умов дії прогіпоксичних чинників і формування нефропатії зазнають пошкоджувального впливу і проксимальні каналці, на що вказують підвищені значення концентраційного індексу і кліренсу іонів натрію. Найбільш чутлива до гіпоксії зовнішня частина мозкової речовини і S3-сегменти проксимальних каналців цієї ділянки [15]. Перевага пасивного транспорту при виникненні енергозалежної каналцевої дисфункції спричинила підвищення проксимальної реабсорбції іонів натрію у щурів I групи на 54,6 %, що пов'язано з розвитком прихованого ушкодження каналців. Після введення флокаліну цей показник збільшився значною мірою завдяки реалізації відновленого механізму клубочково-каналцевого балансу.

На початковій стадії розвитку гострої гіпоксичної нефропатії на 48,4 % зростала концентрація іонів калію в плазмі крові (див. табл. 2). У сечі цей показник збільшився на 118 %, калійурез підвищувався на 77,5 %. Нині не існує доказів існування в організмі чітких механізмів гомеостатичної регуляції іонів калію у відповідь на його зміни у плаз-

мі крові чи у тканинних депо. Однак відомо, що концентрація іонів калію у біологічних рідинах змінюється при порушенні ниркових функцій (ниркова недостатність) і кислотно-основної рівноваги. Тому причинами вказаних змін слід вважати метаболічний ацидоз після введення НН, та активацію альдостеронозалежної апікальної калієвої провідності під впливом РАС при гіпоксичному пошкодженні каналців [15]. Після активації $K_{AT\Phi}$ -каналів досліджувані показники також були вищими за контроль: концентрація іонів калію у плазмі крові – на 31,1 %, у сечі – на 81 %, калійурез – на 83,9 %. Покращення енергозалежних функцій дистального каналця під впливом разового введення флокаліну забезпечує як активну реабсорбцію калію, так і компенсаторну каналцеву секрецію катіона у відповідь на гіперкаліємію за умов гострої гіпоксії.

Подальший аналіз функціонального стану нирок свідчить (див. табл. 1), що за умов формування гострої гіпоксичної нефропатії концентрація креатиніну сироватки крові, за яким діагностують ураження паренхіми нирок (загибель нефронів), достовірно не змінювалася. Сповільнювали прогресування ретенційної азотемії активація ФНР і адаптаційне зростання ШКФ під час початкової стадії розвитку гіпоксичної нефропатії. Тому в сечі концентрація креатиніну зростала на 101,2 %, а його екскреція – на 65,6 %. Під впливом флокаліну вміст креатиніну в сечі був на 70,7 % вищий за контроль. У порівнянні з інтактними щурами виділення креатиніну з сечею у щурів II групи збільшувалося вже на 78,1 %. Переважне збільшення ШКФ, відсутність креатинінемії, збільшення кліренсу (концентраційного індексу) ендogenous креатиніну дає змогу зробити припущення про активацію екскреторної функції нирок під впливом флокаліну.

Оцінка динаміки протеїнурії показала (див. табл. 1), що за умов розвитку гострої гіпоксії концентрація білка в сечі збільшується на 152,9 %, екскреція за 2 год – на 105,4 %. Після

активації $K_{AT\Phi}$ -каналів показники практично сягали контрольного рівня. Порівняно з I групою концентрація білка в сечі під впливом флокаліну знижувалася на 53,5 і на 41,8 %, зменшувалося його виділення. Розрахована на 100 мкл клубочкового фільтрату екскреція білка у II групі була на 66,7 % нижчою, ніж у I. Враховуючи те, що в I групі спостерігалося зростання ШКФ, виражена протеїнурія була пов'язана зі зниженням проксимального транспорту білка під впливом прогіпоксичних факторів, які пошкоджували клітини каналців та інтерстицію. Не виключно, що внаслідок покращення внутрішньониркової гемодинаміки та компенсаторних антигіпоксичних реакцій після застосування флокаліну стабілізувались як селективність гломерулярного фільтраційного бар'єра, так і проникність каналцевого відділу нефрону для білка.

Таким чином, в експериментах на щурах показано, що флокалін за умов розвитку гострого гіпоксичного ураження чинить нефротропну дію, яка проявляється активацією волюмо-, іонорегулювальної та екскреторної функцій нирок, зменшенням втрати іонів натрію з сечею, суттєвим антипротеїнуретичним ефектом. У регуляції ниркових гомеостатичних функцій під впливом фторвмісного активатора $K_{AT\Phi}$ -каналів провідну роль відіграє клубочковий фактор, який виключно залежить від змін системної і, власне, ниркової гемодинаміки. Відкриття сарколемальних $K_{AT\Phi}$ -каналів після введення флокаліну підтримує функціонування гломерулярних судин, що має домінуюче значення для збільшення ШКФ, зниження протеїнурії, попередження втрати нефронів і сповільнення прогресування ниркової недостатності. З іншого боку, активація цих каналів у нирках покращує роботу перитубулярних капілярів із забезпечення киснем каналцевих і інтерстиціальних клітин. Стабілізація найбільш енергозалежного дистального транспорту іонів натрію на тлі поєднаного впливу потужних прогіпоксичних чинників НН і ДНФ є ваго-

ним фактом підтвердження енерготропних властивостей флокаліну. Отже, відновлення дистальної натрієвої реабсорбції та, насамперед, вплив на прямі маркери оцінки розвитку ниркової недостатності, який характеризується збільшенням ШКФ і зменшенням протеїнурії після разового введення флокаліну за умов розвитку гострої гіпоксії, розширюють спектр протективних ефектів вітчизняного активатора K_{ATP} -каналів.

А.И. Гоженко, Н.Д. Филипец

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАН ПОЧЕК ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

В экспериментах на нелинейных белых крысах с моделью острой гипоксии изучены изменения функционального состояния почек после однократного внутривенного введения оригинального фторсодержащего активатора аденозинтрифосфатчувствительных калиевых (K_{ATP}) каналов флокалина в дозе 5 мг/кг на фоне водного индуцированного диуреза. Показано, что под влиянием флокалина при воздействии прогипоксических факторов: нитрита натрия (50 мг/кг, подкожно) и динитрофенола (3 мг/кг, внутривенно), активируется волюморегулирующая, ионорегулирующая и экскреторная функции почек. Ренальные эффекты после активации K_{ATP} -каналов у крыс с гистогемической гипоксией были вызваны изменениями канальцевых и, преимущественно, клубочковых процессов. Повышение скорости клубочковой фильтрации, восстановление энергозависимой дистальной реабсорбции ионов натрия, уменьшение потери ионов натрия с мочой, снижение протеинурии после однократного введения флокалина в условиях развития острой гипоксии дополняют спектр протекторных эффектов отечественного активатора K_{ATP} каналов.

Ключевые слова: почки, аденозинтрифосфатчувствительные калиевые каналы, острая гипоксия, флокалин.

A.I. Gozhenko, N.D. Filipets

THE FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS AFTER ADENOSINE TRIPHOSPHATE-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS ACTIVATION IN EXPERIMENTAL ACUTE HYPOXIA

In the experiments on non-linear white rats with the model of acute hypoxia we have studied the changes of the functional state of kidneys after a single intravenous administration

of the original fluorine-containing K_{ATP} -sensitive potassium channels activator flocalin at the dose of 5 mg/kg on the background of induced water load. It has been shown that under the influence of prohypoxic factors: sodium nitrite (50 mg/kg, subcutaneously) and dinitrophenol (3 mg/kg, intraperitoneal) flocalin activates volume-regulating, ion-regulating and excretory functions of kidneys. Renal effects after activation of K_{ATP} -sensitive potassium channels in the rats with histohemic hypoxia were induced by the changes of tubular and predominantly glomerular processes. The increase of glomerular filtration rate, restoration of volatile distal reabsorption of potassium channels, decrease of sodium loss with urine, decrease of proteinuria after a single administration of flocalin under conditions of acute hypoxia complement the range of protective effects of K_{ATP} -sensitive potassium channels activator flocalin.

Key words: kidneys, adenosine triphosphate sensitive potassium channels, acute hypoxia, flocalin.

State Enterprise «Ukrainian Research Institute of Transport Medicine» of Ukrainian Ministry of Health Care, Odessa;

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

REFERENCES

1. Moibenko AA, Strutynskiy RB, Yagupolskii LM, Mohort MA, Shalamai AS. Organization of industrial production of Flokalin – new myotropic spasmolytic and cardioprotector. *Science and Innovation*. 2009; 5(1): 80-84 [Ukrainian].
2. Strutynskiy RB, Kotsuruba AV, Neshcheret AP, Shysh AN, Rovenets RA, Moibenko AA. Cardioprotective Effects of ATP-Sensitive Potassium Channels Activation in Experiments *in Vivo*: Influence on Biochemical Parameters of Blood Following Ischemia-Reperfusion of Myocardium. *Int J Phys Pathophys*. 2010; 1(4): 305-313
3. Strutynskiy RB, Neshcheret AP, Tumanovska LV, Rovenets RA, Moibenko AA. Cardioprotective effects of flocalin *in vivo* experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion. *Int J Phys Pathophys*. 2010; 1(3): 211-218
4. Voitychuk OI, Strutynskiy RB, Yagupolskii LM, Tinker A, Moibenko OO, Shuba YM. Sarcolemmal cardiac K_{ATP} channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin. *Brit J Pharmacol*. 2011; 162(3): 701-711
5. Shieh C, Coghlan M, Sullivan J, Gopalakrishnan M. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases and Therapeutic Opportunities. *Pharm. Rev*. 2000; 52(4): 557-594
6. Gozhenko AI, Filipets ND. The renotropic effects of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activation depending on the functional state of kidneys in rats. *Nephrology*. 2013; 17(2): 87-90 [Russian].
7. Filipets ND, Filipets OO. The state of homeostatic function of the kidneys after repeated activation of potassium channels with flokalin at salt load. *Medicine of Ukraine*. 2012; (1-2): 66-69 [Ukrainian].

8. Filipets ND. The effect of ATP-sensitive potassium channels activator floccalin on acid-regulatory function of kidneys under conditions of load with 0,45% solution of sodium chloride. Tavr Med-Biol Vestnik. 2012; 15 (3 Pt 1): 358-36 [Ukrainian].
9. Putilina FYe, Eschenko ND. Effect of hypoxia and 2,4-dinitrophenol on lactate dehydrogenase activity in brain, liver, kidneys. Issues Med Chem. 1971; 17(2): 161-165 [Russian].
10. Berhyn YeB, Ivanov YuI. Methods of experimentally studies of kidney and water-salt metabolism. Barnaul: Book publishing house of Altaysk; 1972: 47-79 [Russian].
11. Mikheeva AI, Bogodarova IA. Methods of determination of the total protein in the urine on the FEC-H-56. Laboratory Business. 1969; (7): 441-442 [Russian].
12. Gozhenko AI, Gozhenko YeA. Functional renal reserve in renal physiology and pathology. Bukov Med Herald. 2012; 16(3 Pt 2): 18-25 [Russian].
13. Strutynskiy RB. The vazodilatatory effects of floccalin, a fluorine-containing K_{ATP} channel opener. Fiz Zh. 2010; 56(4): 59-65 [Ukrainian].
14. Boychuk TN, Rohovoy YuYe, Popovich GB. Pathophysiology of hepatorenal syndrome in hemic hypoxia. Chernivtsi: Medical University; 2012: 123-151 [Ukrainian].
15. Filipets ND, Olenovych OA, Filipets OO, Kmet OG. Influence of floccalin on the indices of proteolytic and fibrinolytic activity at the initial stage of experimental acute renal failure. Ukr J Nephrol and Dial. 2012; (3 Suppl 1): 41-43 [Ukrainian].

*ДП «Укр. наук.-дослід. ін-т медицини транспорту», Одеса;
Буковин. мед. ун-т, Чернівці
E-mail: natalya.dmi@gmail.com.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 01.11.2013*

Н.М. Воронич-Семченко, Т.В. Гуранич

Зміни процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків, антиоксидантного захисту у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду та міді

В експериментах на щурах із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі монодефіциту йоду (ГЩЗ) та комбінованого дефіциту йоду й міді (ГЩЗ_{I+Cu}) вивчали тиреоїдний статус, баланс міді, співвідношення процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), білків (ПОБ), антиоксидантного захисту (АОЗ). Установлено, що комбінований дефіцит мікроелементів супроводжується перерозподілом вмісту міді між різними тканинами (збільшення в еритроцитарній масі та головному мозку, зменшення у міокарді), суттєвими змінами показників гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі, киснезалежного метаболізму, протирадикального захисту, потенціюючи негативний вплив на організм кожного із них. З'ясовано, що ГЩЗ_{I+Cu} зумовлює пригнічення киснезалежних процесів, про що свідчить зменшення вмісту дієнових кон'югатів (ДК) на 69,70 % у щитоподібній залозі, продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту (ТБК-РП) на 47,72 % у проміжному мозку, продуктів окиснювальної модифікації білків на 37,10–98,98 % у проміжному мозку, щитоподібній залозі та печінці на тлі вибіркової активації пероксидації у сироватці крові (зростання ТБК-РП у 7,11 раза) та у міокарді (збільшення ДК – на 48,15 %, продуктів окиснювальної модифікації білків – у 2,64 раза) щодо аналогічних показників у інтактних тварин. Одержані результати (маніфестація процесів ПОЛ, ПОБ, зменшення вмісту міді у міокарді дослідних тварин) дають змогу припустити вагому роль мікроелементного дисбалансу та метаболічних механізмів у патогенезі кардіологічної патології за умов тиреоїдної дисфункції. Розвиток ГЩЗ_{I+Cu} виснажує ресурси АОЗ: знижується активність каталази (на 47,05 %), супероксиддисмутази (на 33,13 %) та насиченість трансферину залізом (на 56,76 %) щодо контролю. Тривалі порушення антиокиснювального захисту можуть стати причиною потенціювання киснезалежних процесів та розвитку патологічних змін з боку окремих фізіологічних систем організму.

Ключові слова: гіпофункція щитоподібної залози, мікроелементний дисбаланс, вільнорадикальне окиснення ліпідів, перекисне окиснення білків, антиоксидантна система

ВСТУП

Однією із пріоритетних медико-соціальних проблем є організація належної профілактики, пошук нових можливостей ранньої діагностики та забезпечення ефективного лікування гіпотиреозу. Незважаючи на значні успіхи у вивченні патогенезу цієї патології, тенденція до прогресування захворювань щитоподібної залози є наслідком складної взаємодії ендо- та екзогенних чинників

[1, 2]. Етіологічна роль йоду у виникненні ендемічного зобу доведена давно [3, 4]. Проте формування гіпофункції щитоподібної залози (ГЩЗ) відбувається також на тлі впливу неспецифічних чинників довкілля, що сприяють розвитку зобу. До них, зокрема, належать сполуки міді, надлишок або дисбаланс якої може зумовити розвиток тиреоїдної дисфункції [5]. З іншого боку, цей мікроелемент необхідний для ефективного функціонування щитоподібної залози, адже є ком-

© Н.М. Воронич-Семченко, Т.В. Гуранич

понентом ферментів (йодидпероксидази, тирозинази, тиреопероксидази та інших протеїназ), що забезпечують утворення тироніну, оксидацію йодиду в процесі синтезу тироксину [6, 7]. Мідь також залучена в процес синтезу тиреотропного гормону аденогіпофіза (ТТГ) як компонент протеїнази [8]. Тому можна припустити, що комбінований дефіцит цих мікроелементів може потенціювати негативний вплив на організм кожного із них, зокрема, супроводжуватися вираженими змінами тиреоїдного гомеостазу. Актуальність дослідження зумовлена вірогідністю природно-метаболического дефіциту йоду та міді в ендемічних регіонах.

Відомо, що універсальною ланкою патогенезу захворювань, у тому числі патології щитоподібної залози, є зміни характеру клітинного окисного метаболізму, що визначається співвідношенням про- та антиокиснювальних процесів [8]. Проте дані про стан процесів ліпопероксидації та антиоксидантного статусу за умов ГЩЗ трактується неоднозначно і містять окремі протиріччя [9]. При цьому маніфестація процесів пероксидації ліпідів і білків (підвищення їх окиснювальної деструкції) зумовлює порушення структури і функції клітинних мембран [10, 11, 12]. Слід акцентувати, що мідь входить до складу каталази, супероксиддисмутази (СОД), церулоплазміну, які нейтралізують дію вільних радикалів [13, 14].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу йодної депривації та комбінованого дефіциту йоду й міді на процеси вільнорадикального окиснення ліпідів і білків, систему антиоксидантного захисту у тварин із гіпофункцією щитоподібної залози.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 60 нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 120-180 г, яких протягом експерименту утримували на

йододефіцитній дієті [15]. Усім тваринам моделювали ГЩЗ додаванням до питної води тиреостатичного препарату мерказолілу (7,5 мг/100 г маси тіла) впродовж 14 днів [16]. Після цього тварини були розділені на дві дослідні групи. Щурів 1-ї групи продовжували утримувати на йододефіцитній дієті (ГЩЗ₁, n=30) [15]. Щурам 2-ї групи моделювали дефіцит міді за умов їх перебування на йододефіцитній дієті (ГЩЗ_{1+Cu}, n=30). Дефіцит міді відтворювали щоденним додаванням до питної води d-пеніциламіну (препарат купреніл, "Polfa" Kutno Pharmaceutical Company, Польща) у дозі 100мг/100 г маси тіла протягом 21 дня [17]. Тварин декапітували на 36-ту добу дослідження під кетаміновим наркозом (100 мг/кг маси тіла). Для порівняння аналогічні показники визначали у 30 інтактних тварин (контрольна група), яких утримували за стандартних умов віварію. Матеріал для дослідження забирали одразу після декапітації тварин. Утримання, вигодовування та евтаназія відповідали чинним міжнародним вимогам щодо гуманного відношення до тварин (Страсбург, 1986) і загальноприйнятим національним нормам біоетики (Київ, 2001).

Тиреоїдний статус оцінювали визначенням вмісту вільних трийодтироніну (fT₃), тироксину (fT₄) та ТТГ у сироватці крові методом імуноферментного аналізу. Щоб охарактеризувати баланс у тиреоїдній системі розраховували індекс fT₃/fT₄ [1, 18]. Для з'ясування стану йодного забезпечення тварин у разових порціях сечі, яку збирали методом обмінних кліток, визначали концентрацію йоду за методом Dunn та співавт. [19]. Щоб оцінити баланс міді в організмі тварин вміст мікроелемента визначали в еритроцитарній масі, гомогенатах головного мозку, щитоподібної залози, міокарда та печінки за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії [8, 18].

Стан вільнорадикального окиснення ліпідів оцінювали за накопиченням дієнових кон'югатів (ДК) поліненасичених жирних

кислот та продуктів, що реагують на тіо-барбітурову кислоту (ТБК-РП) у сироватці крові, тканинах проміжного мозку, щитоподібної залози, міокарда й печінки. Рівень перекисного окиснення білків (ПОБ) встановлювали у всіх досліджуваних тканинах за кількістю продуктів їх окиснювальних модифікацій за допомогою спектрофотометрії при довжинах хвилі 356, 370, 430, 530 нм. Систему антиоксидантного захисту характеризували за активністю каталази, СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, церулоплазміну, насиченістю трансферину залізом сироватки крові.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакета математичних програм Statistic Soft 7,0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро–Вілка. За цим критерієм визначали чи розподіл цих вибірок відповідає розподілу Гауса. У разі двох нормальних розподілів перевіряли рівність генеральних дисперсій, застосовуючи критерій Левена, після чого порівнювали вибірки за допомогою критерію *t* Стьюдента. Статистично достовірною вважали різницю при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті експерименту було виявлено зміни тиреоїдного гомеостазу у тварин обох дослідних груп (табл. 1). Зокрема, у сироватці крові щурів 1-ї групи (ГЩЗ₁) спостерігали суттєве зменшення на 63,62 % ($P < 0,05$) вмісту fT_3 порівняно з контролем. У щурів 2-ї групи (ГЩЗ_{1+Cu}) встановлено зменшення вмісту fT_3 на 52,41 % ($P < 0,05$), fT_4 – на 64,70 % ($P < 0,05$) на тлі збільшення вмісту ТТГ у сироватці крові – у 2,29 раза ($P < 0,05$) щодо контрольних значень. Такі зміни показників тиреоїдної системи у тварин із ГЩЗ_{1+Cu} можуть бути наслідком негативного впливу дефіциту міді на функціональну здатність щитоподібної залози, що може бути особливо небезпечним за умов йодної депривації. У результаті проведеного аналізу показників тиреоїдного статусу тварин обох дослідних груп у щурів із комбінованим дефіцитом мікроелементів виявлено виражену тенденцію до зростання індексу fT_3/fT_4 . Проаналізовані показники характеризують функціональну здатність щитоподібної залози та відображають можливість конверсії T_4 у T_3 на периферії [1]. Правомірним здається припущення про те, що визначення індексу fT_3/fT_4 може допомогти виявити тиреоїдну дисфункцію

Таблиця 1. Зміни показників тиреоїдної системи у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі йодної депривації та комбінованого дефіциту йоду й міді ($M \pm m$; $n=30$)

Група тварин	Трийодтиронін (fT_3), пмоль/л	Тироксин (fT_4), пмоль/л	Тиреотропний гормон (ТТГ), мМО/л	fT_3/fT_4	Вміст йоду в сечі, мкг/л
Контроль (інтактні тварини)	7,67±1,62	32,69±9,65	0,14±0,07	0,25±0,12	100,30±8,10
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі					
дефіциту йоду (1-ша група)	2,79±0,62*	14,18±3,09	0,18±0,06	0,20±0,08	1,50±0,02*
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	3,65±1,20*	11,54±3,64*	0,32±0,07*	0,33±0,09	15,29±0,13*

Примітка. Тут і в табл. 2–5 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ порівняно з інтактними тваринами.

на ранній стадії, з'ясувати доклінічні зміни ГЩЗ, а також конкретизувати ймовірний характер порушень гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі [20, 21].

Обмеження йодного забезпечення супроводжувалося значним зменшенням вмісту йоду в сечі усіх дослідних щурів (див. табл. 1). Цей показник не залежав від балансу міді в організмі тварин.

У щурів із ГЩЗ₁ вміст міді у досліджуваних тканинах (табл. 2) не відрізнявся від контролю, крім щитоподібної залози, де спостерігали його зменшення на 14,63 % ($P<0,01$). У тварин із ГЩЗ_{1+Cu} виявили перерозподіл міді у досліджуваних тканинах: суттєве збільшення мікроелемента у еритроцитарній масі у 3,55 раза ($P<0,05$) та гомогенаті головного мозку на 61,05 %, ($P<0,01$), зменшення у гомогенаті міокарда на 28,87 % ($P<0,05$) щодо контролю. Слід зазначити, що введення тваринам d-пеніциламіну зумовило зменшення вмісту міді у гомогенаті міокарда щурів 2-ї дослідної групи на 34,05 % ($P<0,01$) та збільшення у гомогенаті щитоподібної залози на 20,0 % ($P<0,001$) порівняно з аналогічними показниками у тварин 1-ї групи.

При розвитку ГЩЗ змінювався киснезалежний метаболізм. Аналіз показників вільнорадикального окиснення ліпідів показав розбіжності вмісту продуктів ПОЛ у досліджуваних тканинах (табл. 3). Зокрема,

вміст проміжного продукту ліпопероксидації ДК у сироватці крові тварин 1-ї групи зменшився на 53,66 % ($P<0,001$), а у тканині щитоподібної залози – збільшився у 2,25 раза ($P<0,05$) порівняно з контролем. У щурів 2-ї групи спостерігали зменшення вмісту ДК у сироватці крові на 43,91 % ($P<0,05$) та гомогенаті щитоподібної залози на 69,70 % ($P<0,01$) щодо контролю. Наведені значення загалом узгоджуються із результатами даних літератури про сповільнення реакцій ПОЛ за умов гіпотиреозу [12]. Водночас у міокарді вміст ДК у щурів із ГЩЗ_{1+Cu} був на 48,15 % ($P<0,05$) більшим, ніж у інтактних тварин, що характеризує активацію ліпопероксидації у серці на тлі пригнічення киснезалежних процесів у інших досліджуваних органах і тканинах. Згідно з даними Панішиної та співавт. [22] експериментальний гіпотиреоз призводить до вірогідного зростання НАДФН-залежного ПОЛ у міокарді щурів на тлі зміни вмісту насичених жирних кислот (пальмітинової і стеаринової), а також есенціальних жирних кислот (лінолевої та арахідонової). Такі дані щодо спектра жирних кислот ліпідів міокарда щурів узгоджуються із перебігом процесів ліпопероксидації та підтверджують ймовірність маніфестації ПОЛ [22].

Вміст ТБК-РП у тварин 1-ї групи збільшувався у 2,23 раза ($P<0,05$) у сироватці крові

Таблиця 2. Вміст міді (мг/кг) в еритроцитарній масі та тканинах головного мозку, щитоподібної залози, міокарда й печінки щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі йодної депривації, комбінованого дефіциту йоду й міді ($M\pm m$; $n=30$)

Група тварин	Еритроцитарна маса	Головний мозок	Щитоподібна залоза	Міокард	Печінка
Контроль (інтактні тварини)	0,80±0,32	1,90±0,16	1,23±0,04	3,43±0,45	1,87±0,46
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)					
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	1,53±0,58	2,20±0,40	1,05±0,01**	3,70±0,26	2,72±0,60
	2,84±0,63*	3,06±0,30**	1,26±0,06 $P_{1-2}<0,001$	2,44±0,10* $P_{1-2}<0,001$	2,18±0,27

та у 2,15 раза ($P < 0,001$) у тканині печінки, але зменшувався на 31,65 % ($P < 0,05$) у проміжному мозку та на 52,74 % ($P < 0,001$) у щитоподібній залозі порівняно з контролем. У щурів 2-ї групи виявили суттєве підвищення цього показника у сироватці крові у 7,11 раза ($P < 0,001$) та зменшення на 47,72 % ($P < 0,01$) у проміжному мозку щодо значень у інтактних тварин.

Слід акцентувати, що введення d-пеніциламіну достовірно вплинуло на перебіг киснезалежних процесів у різних органах. Зокрема, комбінований дефіцит мікроелементів зумовив вибіркочку активацію ПОЛ, про що свідчить збільшення вмісту ДК у міокарді у 2,86 раза ($P < 0,01$) та ТБК-РП у сироватці крові у 3,18 раза ($P < 0,01$) щодо відповідних

значень у щурів із ГЩЗ₁. Водночас у гомогенатах проміжного мозку, щитоподібної залози та печінки щурів 2-ї групи виявили пригнічення вільнорадикального окиснення ліпідів, що підтверджується зменшенням вмісту ДК у проміжному мозку та щитоподібній залозі на 75,00 й на 86,49 % ($P < 0,05$, $P < 0,01$) відповідно та зменшенням ТБК-РП у печінці на 47,54 % ($P < 0,01$) щодо аналогічних значень у тварин із ГЩЗ₁.

Характеризуючи зміни ПОБ, виявили сповільнення їх пероксидації у більшості досліджуваних тканин, що підтверджено зменшенням продуктів фрагментації окиснених білків (табл. 4). При цьому мінімальні зміни показників ПОБ спостерігали у сироватці крові щурів 2-ї групи: зниження E_{530} на 42,86 % ($P < 0,05$) від-

Таблиця 3. Вміст дієнових кон'югатів та продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту у сироватці крові, тканинах проміжного мозку, щитоподібної залози, міокарда, печінки у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі йодної депривації, комбінованого дефіциту йоду й міді ($M \pm m$; $n=30$)

Група тварин	Сироватка	Проміжний мозок	Щитоподібна залоза	Міокард	Печінка
Дієнові кон'югати, ум.од./мл					
Контроль (інтактні тварини)	0,41±0,02	0,33±0,08	0,33±0,03	1,35±0,17	0,57±0,13
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі					
дефіциту йоду (1-ша група)	0,19±0,03***	0,68±0,17	0,74±0,15*	1,70±0,06	0,62±0,13
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	0,23±0,06*	0,17±0,09 $P_{1-2} < 0,05$	0,10±0,02** $P_{1-2} < 0,01$	2,00±0,13*	0,37±0,08
Продукти, що реагують на тіобарбітурову кислоту, нмоль/мл					
Контроль (інтактні тварини)	3,13±0,81	3,16±0,24	3,47±0,12	3,70±0,26	3,5±0,15
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі					
дефіциту йоду (1-ша група)	7,00±1,36*	2,16±0,35*	1,64±0,27***	3,79±0,13	7,53±0,72***
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	22,25±1,73***	1,65±0,24**	2,89±1,53	3,98±0,19	3,95±0,78 $P_{1-2} < 0,01$

Таблиця 4. Окиснювальна модифікація білків (опт.од./г білка) у сироватці крові, тканинах проміжного мозку, щитоподібної залози, міокарда, печінки у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі йодної депривації, комбінованого дефіциту йоду й міді (M±m; n=30)

Група тварин	E ₃₅₆	E ₃₇₀	E ₄₃₀	E ₅₃₀
Сироватка крові				
Контроль (інтактні тварини)	3,09±0,82	3,05±0,79	1,21±0,47	0,14±0,05
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)	2,06±0,42	2,21±0,45	0,77 ±0,20	0,14 ±0,02
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	2,06±0,30	1,76±0,26	0,61±0,11	0,08±0,02 P ₁₋₂ <0,05
Проміжний мозок				
Контроль (інтактні тварини)	1,04±0,18	0,94±0,26	0,54± 0,2	0,03±0,02
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)	0,18±0,09**	0,25±0,12*	0,23 ±0,1	0,05±0,03
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	0,43±0,1*	0,41±0,13	0,006±0,001*	-
Щитоподібна залоза				
Контроль (інтактні тварини)	0,62±0,08	0,63±0,12	0,35±0,07	0,05±0,007
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)	0,39±0,02*	0,48±0,06	0,02±0,007**	-
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	0,03±0,01*** P ₁₋₂ <0,001	0,03±0,01*** P ₁₋₂ <0,001	0,006±0,002**	-
Міокард				
Контроль (інтактні тварини)	1,66±0,13	1,74± 0,13	0,74±0,12	0,06±0,08
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)	1,83±0,02	1,89± 0,02	0,88±0,04	-
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	1,95±0,08	2,01± 0,11	1,95±0,11*** P ₁₋₂ <0,001	-
Печінка				
Контроль (інтактні тварини)	0,38±0,1	0,41±0,16	0,31±0,08	0,04±0,005
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі дефіциту йоду (1-ша група)	0,27±0,09	0,36±0,08	0,3 ±0,09	0,07 ±0,01*
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	0,18±0,06	0,15±0,03 P ₁₋₂ <0,05	0,13 ±0,03	0,06 ±0,01

носно щурів 1-ї групи. Найбільш суттєвих змін ПОВ зазнавала тканина щитоподібної залози у тварин обох дослідних груп, про що свідчить зменшення продуктів окиснювальної модифікації білків (зниження E_{356} – на 37,10 %, $P < 0,05$; E_{430} – на 94,29 %, $P < 0,01$ у тварин 1-ї групи та E_{356} – на 95,12 %, $P < 0,001$; E_{370} – на 95,24 %, $P < 0,001$; E_{430} – на 98,29 %, $P < 0,01$ у тварин 2-ї групи щодо аналогічних значень у інтактних тварин). При цьому встановлено достовірні розбіжності показників окиснювальної модифікації білків (E_{356} та E_{370}) у тканині щитоподібної залози тварин обох груп.

У тканині проміжного мозку щурів із ГЩЗ_I спостерігали зменшення об'єму модифікованих білків щодо контролю, зокрема, відмічали зниження E_{356} – на 82,69 % ($P < 0,01$), E_{370} – 73,40 % ($P < 0,05$) порівняно із аналогічними показниками у інтактних тварин. Таку саму закономірність виявлено у щурів із ГЩЗ_{I+Cu}: зниження E_{356} , E_{430} , на 58,65 ($P < 0,05$) та на 98,98 % ($P < 0,05$) відповідно щодо контрольних значень.

За цих умов у міокарді тварин 1-ї групи зміни продуктів окиснювальної модифікації білків не були достовірними, а у тварин із ГЩЗ_{I+Cu} спостерігали тенденцію до зростання окремих їх фракцій, зокрема, значення E_{430} у 2,64 раза ($P < 0,001$) перевищили аналогічні у міокарді інтактних тварин та у 2,22 раза ($P < 0,001$) у тварин із ГЩЗ_I. Такі результати підтверджують активацію ПОВ у міокарді щурів із ГЩЗ, що особливо зазнає маніфестації за умов комбінованого дефіциту йоду та міді.

Зміни показників ПОВ у тканинах печінки були різнонаправленими: у тварин із ГЩЗ_I спостерігали збільшення E_{530} – на 75,00 % ($P < 0,05$), а у щурів із ГЩЗ_{I+Cu} – зменшення E_{430} на 58,07 % ($P < 0,05$) щодо контролю.

Враховуючи, що інтенсивність вільнорадикального окиснення білків залежить не тільки від впливу шкідливих чинників на організм, але й від рівня метаболічних процесів у клітинах та тканинах, можна припускати

можливість вираженого негативного впливу з боку продуктів ПОВ насамперед на кардіоміоцити. Одержані результати (маніфестація процесів ПОЛ, ПОВ, зменшення вмісту міді у міокарді дослідних тварин) дають змогу припустити вагому роль мікроелементного дисбалансу та метаболічних механізмів у патогенезі кардіологічної патології за умов тиреоїдної дисфункції. На нашу думку, мікроелементний дисбаланс є фактором ризику щодо розвитку серцево-судинної патології за умов порушення тиреоїдного гомеостазу (у тому числі при доклінічних формах гіпотиреозу) у жителів територій із малим вмістом йоду та міді. Такі припущення підтверджуються значною поширеністю серцево-судинної патології в регіонах йодної депривації [8], а також можливістю обмеженого надходження до організму есенційних мікроелементів, зокрема міді [23].

Відомо, що порушення функціональної здатності щитоподібної залози може супроводжуватися зниженням активності ферментативних механізмів антиоксидантного захисту, виснаженням резервів системи природної детоксикації [24–26]. Проте за умов гіпотиреозу антиоксидантний захист (АОЗ) може також виявляти функціональну інертність.

У результаті проведеного нами дослідження встановлені зміни показників протирадикального захисту у тварин обох дослідних груп (табл. 5). З'ясовано, що у щурів із ГЩЗ_I знижується активність СОД (на 22,35 %, $P < 0,05$), глутатіонредуктази (на 60,00 %, $P < 0,05$) та насиченість трансферину залізом (на 40,54 %, $P < 0,05$) у сироватці крові щодо показників у інтактних тварин. Аналогічна тенденція спостерігалась у щурів 2-ї групи: знижувалась активність каталази (на 47,05 %, $P < 0,001$), СОД (на 33,13 %, $P < 0,05$), та насиченості трансферину залізом (на 56,76 %, $P < 0,001$) відносно контролю.

Згідно з результатами проведеного порівняльного аналізу показників АОЗ у тва-

Таблиця 5. Зміни активності антиокислювальних ензимів сироватки крові у щурів із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі йодної депривації, комбінованого дефіциту йоду й міді ($M \pm m$; $n=30$)

Група тварин	Каталаза, мг H_2O_2 / мл	Супероксид- дисмутаза, МО/мг гемоглобіну	Глутатіон- пероксидаза, мкмоль/1мг білка	Глутатіон- редуктаза, нмоль/хв·мг білка	Церуло- плазмін, ум. од.	Насиченість трансферину залізом, ум. од.
Контроль (інтактні тварини)	11,52±0,95	39,25±3,77	0,19±0,04	0,15±0,04	53,61±14,63	0,37±0,03
Гіпофункція щитоподібної залози на тлі						
дефіциту йоду (1-ша група)	13,67±0,671	30,48±1,41*	0,20±0,01	0,06±0,01*	44,63±9,89	0,22±0,05*
комбінованого дефіциту йоду й міді (2-га група)	6,1±0,89** $P_{1-2}<0,001$	26,67±1,32*	0,18±0,04	0,42±0,15 $P_{1-2}<0,05$	35,42±7,2	0,16±0,02***

рин обох дослідних груп показано, що комбінований дефіцит мікроелементів супроводжувався більш суттєвими змінами активності антиоксидантних ензимів у щурів із ГЩЗ. Зокрема, у сироватці крові тварин 2-ї групи виявили зниження активності каталази (на 55,38 %, $P<0,001$) на тлі збільшення активності глутатіонредуктази (у 7 разів, $P<0,05$).

Загалом можна стверджувати, що розвиток ГЩЗ на тлі мікроелементного дисбалансу спричинює виснаження ресурсів АОЗ. Збільшення активності глутатіонредуктази може бути результатом мобілізації системи антиоксидантів, що спрямована на дисмутацію надмірної кількості супероксидного аніон-радикала в пероксид водню [27].

Отже, тиреоїдний статус тварин із ГЩЗ залежить від забезпечення організму не тільки йодом, але й іншими есенційними мікроелементами, зокрема міддю. Комбінований їх дефіцит суттєво змінює показники гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі, киснезалежного метаболізму, протирадикального захисту, потенціюючи негативний вплив на організм кожного з них. Вважаємо доцільним за умов порушення тиреоїдного гомеостазу визначати мікроелементний баланс організму для дослідження етіопатогенезу та з'ясування можливостей залучення мікроелементів й ан-

тиоксидантів до схеми лікування ГЩЗ. Така комплексна корекція може не тільки сприяти відновленню функціональної здатності щитоподібної залози, але й запобігати розвитку патології змін з боку окремих фізіологічних систем організму. Виявлені метаболічні зміни в міокарді гіпотиреоїдних тварин за умов мікроелементного дисбалансу можуть зумовлювати розвиток окиснювальних ушкоджень і впливати на патогенез кардіологічної патології при тиреоїдній дисфункції.

Н.Н. Воронич-Семченко, Т.В. Гуранич

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КРЫС С ГИПОФУНКЦИЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ ДЕФИЦИТА ЙОДА И МЕДИ

В экспериментах на крысах с гипofункцией щитовидной железы на фоне монодефицита йода (ГЩЖ₁) и комбинированного дефицита йода и меди (ГЩЖ_{1+Cu}) изучали тиреоидный статус, баланс меди, соотношение процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), белков (ПОБ), антиоксидантной защиты (АОЗ). Установлено, что комбинированный дефицит микроэлементов сопровождается перераспределением содержания меди между разными тканями (увеличение в эритроцитарной массе и головном мозге, уменьшение в миокарде), существенными изменениями показателей гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, кислородзависимого метаболизма, противорадикальной защиты, потенцируя

неблагоприятное влияние на организм каждого из них. Показано, что ГЩЖ_{I+Cu} ведет к угнетению кислородзависимых процессов, о чем свидетельствует уменьшение содержания диеновых конъюгатов (ДК) на 69,70 % в щитовидной железе, ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-РП) на 47,72 % в межзачаточном мозгу, продуктов окислительной модификации белков на 37,10–98,98 % в тканях межзачаточного мозга, щитовидной железы и печени на фоне избирательной активации перекисидации в сыворотке крови (увеличение ТБК-РП в 7,11 раз) и в миокарде (увеличение ДК – в 2,86 раза, продуктов окислительной модификации белков – в 2,86 раза) по сравнению с контролем. Полученные результаты (манифестация процессов ПОЛ, ПОБ, уменьшение содержания меди в миокарде подопытных животных) позволяют допустить существенную роль микроэлементного дисбаланса и метаболических механизмов в патогенезе кардиологической патологии при тиреоидной дисфункции. Развитие ГЩЖ_{I+Cu} истощает ресурсы АОЗ: снижается активность каталазы (на 47,05 %), супероксиддисмутазы (на 33,13 %), церулоплазмина (на 33,93 %) и насыщение трансферина железом (на 56,76 %) на фоне увеличения активности глутатионредуктазы (в 2,8 раза) относительно контрольных значений. Длительные нарушения АОЗ могут выступать причиной манифестации кислородзависимых процессов и развития патологических изменений со стороны отдельных физиологических систем организма.

Ключевые слова: гипофункция щитовидной железы, микроэлементный дисбаланс, свободнорадикальное окисление липидов, перекисное окисление белков, антиоксидантная защита.

N.M. Voronych-Semchenko, T.V. Guranych

THE CHANGES OF PROCESSES OF FREE RADICAL OXIDATION OF LIPIDS AND PROTEINS, ANTIOXIDANT DEFENCE IN RATS WITH HYPOFUNCTION OF THYROID GLAND UNDER IODINE AND COPPER DEFICIT

Thyroid status, copper balance, correlation of processes of peroxide oxidation of lipids (POL), proteins (POP), antioxidant defence (AOD) were examined in experiments on rats with hypofunction of thyroid gland under iodine monodeficit (HTG_I) and combined iodine and copper deficit (HTG_{I+Cu}). It was determined that a combined deficit of microelements is accompanied by a distribution of copper content between different tissues (increase in red blood cell mass and cerebrum, decrease in myocardium), essential changes of indexes of hypothalamo-hypophysis-thyroid axis, oxygen-dependent metabolism, antiradical defense, exacerbating the effects of negative influence of each of them on organism. It was established that HTG_{I+Cu} causes a suppression of oxygen-dependent processes. In thyroid gland, it is shown a decrease of content of dyenic conjugates (DC) by 69,70% , of TBA-

reacting products (TBA-RP) by 47,72% in diencephalon, the volume of modified proteins (VMP) - by 37,10-98,98% in the tissues of diencephalons. The results obtained let us to suggest a pivotal role of microelement dysbalance and metabolic mechanisms in pathogenesis of cardiological pathology under thyroid dysfunction. The development of HTG_{I+Cu} exhausts the resources of AOD: decreases the activity of catalase (on 47,05%), superoxide dismutase (on 33,13%), ceruloplasmine (on 33,93%) and saturation of transferrin with iron (on 56,76%) against the background of selective rise in the activity of glutathionreductase (in 2,8 time) in comparison with the control data. The long-term disturbances of antyoxidative defence can be the reason of manifestation of oxygendependent processes and the development of pathological changes in separate physiological systems of organism.

Key words: hypofunction of thyroid gland, microelement imbalance, freeradical oxidation of lipids, peroxidative oxidation of proteins, antioxidant system.

Ivano-Frankivsk Medical University

REFERENCES

1. Honcharova OA. Gender peculiarities of thyroid homeostasis in patients of different age with autoimmune thyroiditis. *Problems of Aging and Longevity*. 2012; 21(3):336-42.
2. Moskalenko RA. Morphogenesis of thyroid gland in conditions of induced microelement deficiency and correction of such influence by glutargin. *Herald of Sumy State University*. 2010;1:27-36.
3. Marsakova NV, Esypenko BE. Metabolism of iodine, carbohydrates and proteins in rats in deficiency of iodine, copper and cobalt. *Physiologic J*. 1990;36:51-9.
4. Farkhutdinova L. Role of microelements in development of pathology of thyroid gland. *Physician*. 2006;3:43-4.
5. Fal'fushyns'ka HI, Hnatyshyna LL, Osadchuk DV. Metallic depot function and antioxidant features of thyroid gland in humans with iodine deficiency nodular colloid goiter. *Ukr Biochem J*. 2011;83(6):92-7.
6. Oribko IB. Biological role of copper in oxidation reducing processes in the organism. *News of Dentistry*. 2000;2:61-2.
7. Brent GA. The molecular basis of the thyroid hormone action. *The New Engl J of Medicine*. 1994; 331:847-53.
8. Anikeeva TV, Maksimova LY, Sinyachenko OV. Content of copper and zinc in hair and blood in ischemic and chronic rheumatic heart diseases. *Ukr Med Almanac*. 2009;1:7-9.
9. Anikeeva TV, Maksimova LY, Sinyachenko OV. Content of copper and zinc in hair and blood in ischemic and chronic rheumatic heart diseases. *Ukr Med Almanac*. 2009;1:7-9.
10. Dubinina EE, Morozova MH, Leonova NV. Oxidative modification of blood plasma proteins of patients with psychological disorders: depression, depersonalization. *Issues of Med Chemistry*. 2000;4:7-9.
11. Lezhenko HO, Pashkova OE, Kamenshyk AV. State of activity of peroxidation of proteins in children and

- patients with diabetes mellitus in dynamics of disease. Clin Pediatrics. 2008;6:51-6.
12. Topchyu II, Kirienko AN, Bondar' TN. Lipid peroxidation and metabolism of nitric oxide in patients with chronic kidney disease in dynamics of treatment. Ukr J Nephrol and Dialysis. 2012;1:C.3-8.
 13. Bezukov OF, Grygor'ev PE. Role of concentration of copper containing compounds in diet and the incidence of thyroid pathology. Tavrian Medical and Biological Newspaper. 2010;13(4):11-3.
 14. Krasnokuts'kyi SV. Vitamin E in prophylaxis and treatment of states linked with the activation lipid peroxidation. Circulation and Hemostasis (Gift). 2010;1-2:115-20.
 15. Martinez-Galan JR, Pedraza P, Santacana M. Early effect of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. J Clin Invest. 1997;99:2701-2709.
 16. Charnosh SM. Comparative characteristics of three experimental models of hypothyroidism. Herald of Scientific Researches. 2007;2:113-5.
 17. Yamamoto M, Aklyama C, Aikawa H. D-penicillamine – induced copper deficiency in suckling mice: neurological abnormalities and brain mitochondrial enzyme activities. Developmental Brain Research. 1990;55(1):51-5.
 18. Barysheva ES. Role of microelements in functional and structural homeostasis of thyroid gland. Physician. 2010;7(37):1-12.
 19. Dunn JT, Grutchfield HE, Gutekunst R. Two simple methods for measuring iodine in urine. Thyroid. 1993;3(2):119-23.
 20. Kulimbetov MT, Rasyhtov MM, Saatov TS. Modeling of experimental hypothyroidism caused by natural iodine chronic nutrient deficiency. Int Endocr J. 2009;2(20):22-27.
 21. Romanyuk AM, Moskalenko. Peculiarities of metabolism of microelements in thyroid gland in proliferative diseases in conditions of influence of salts of heavy metals. Herald of Sumy State University. 2007;1:9-13.
 22. Panishyna NG, Yurzhenko NM, Briuzgina TS Status of lipid peroxidation in experimental hypothyroidism. BMJ. 2008;1:104-106.
 23. Neyko EM. Microelements in medicine. Contribution of scientists of Ivano-Frankivsk state medical university. Galician Medical J. 2008;2:5-8.
 24. Kryuk YY, Makhneva AV, Zolotukhin SE. Peculiarities of manifestation of oxidative stress in hypothyroidism of different degree of severity in an experiment. Pathol. 2011;8(2):62-5.
 25. Kul'chyts'kyi OK, Potapenko RI, Novikova SM, Burchyns'ka MK. Activity of the processes of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins in rats of different age in conditions of action of intermittent hypobaric hypoxia. Problems of Aging and Longevity. 2011;20(3):291-301.
 26. Pinyazhko RO, Hzhchots'kyi MR. Changes of oxidative metabolism in conditions of experimental esophagitis on the background of hypothyroid dishomeostasis and correction by melatonin. AML. 2011;1:77-81.
 27. Drobins'ka OV, Hayda LM, Dvorschenko KO. State of system of lipid peroxidation and antioxidant defense in parietal cells in conditions of development of experimental chronic atrophic gastritis. Ukr Biochemical J. 2010;82(5):85-91.

Івано-Франківськ. мед. ун-т МОЗ України
E-mail: Voronich@meta.ua

Матеріал надійшов до
редакції 21.10.2013

І.В. Белінська, О.В. Линчак, Т.В. Рибальченко, О.М. Гурняк

Гематологічні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду за 1,2-диметилгідразиніндукованого канцерогенезу товстої кишки щурів

Досліджено вплив інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) на клітини крові за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки щурів. Встановлено, що введення MI-1 в дозі 2,7 мг/кг протягом 20 тиж запобігає розвитку анемії, яка є наслідком онкологічних захворювань і ускладнює їх перебіг. Про це свідчить зменшення кількості ретикулоцитів (0,19 [0,15;0,21]×10¹²/л) і відновлення вмісту (18,02 [17,44;19,03] пг) і концентрації (309,42 [292,38;318,27] г/л) гемоглобіну в еритроцитах до контрольних значень (0,17 [0,15;0,19], 18,31 [17,95;18,45], 310,78 [306,25;316,18] відповідно) на відміну від щурів, яким вводили ДМГ (0,28 [0,24;0,39]; 17,50 [17,00;17,96]; 288,10 [284,71;303,73] відповідно). MI-1 нормалізує кількість моноцитів (1,40 [0,95;2,50]×10⁹/л) і тромбоцитів (646,32 [575,23;700,50]×10⁹/л) в крові після 26 тиж експерименту, у щурів, яким вводили ДМГ, вони істотно збільшені (1,97 [1,52;2,58], 783,90 [687,64;922,27] відповідно) порівняно з контрольною групою (1,23 [0,94;1,68], 629,34 [590,19;711,48] відповідно). Тобто MI-1 зменшує залучення цих клітин до прогресування розвитку пухлин та їх метастазування. Уповільнення моноцитозу і тромбоцитозу під впливом MI-1 може бути опосередковано: 1) зменшенням кількості та розміру пухлин і площі ураження товстої кишки і, як наслідок, впливу їх цитокінів на кровотворну тканину; 2) пригніченням проліферації та диференціювання гемопоетичних попередників кісткового мозку через інгібування рецепторних протеїнкіназ васкулярного ендотеліального та епідермального факторів росту та нерцепторних PDK1-, Src-, Syk-протеїнкіназ, інгібітором яких він є, і які залучені як до гемопоезу, так і до канцерогенезу.

Ключові слова: похідне малеїміду, інгібітор протеїнкіназ, 1,2-диметилгідразиніндукований канцерогенез товстої кишки, еритроцити, лейкоцити, тромбоцити.

ВСТУП

Цільова (таргетна) терапія є новим напрямком фізіології та медицини, яка базується на створенні речовин, що інгібують активність макромолекул у клітинах пухлин, і, як наслідок, пригнічують ріст останніх. До таких молекул належать протеїнкінази, які залучені до передачі сигналу в клітину, і гіперактивовані в багатьох пухлинах навіть без сигналів росту. Перевагами таргетної терапії є її висока ефективність і низька токсичність.

Похідне малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон)

синтезоване in silico науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету ім. Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор низки протеїнкіназ (FGF-R1, Yes, EGF-R(h), VEGF-R1,2,3, Src(h), ZAP70, Syk(h), PDK1 тощо). MI-1 пригнічує проліферацію пухлинних клітин in vitro [1], зменшує кількість і розміри пухлин за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки in vivo [2] і має низьку токсичність [2-5]. Це свідчить про те, що MI-1 є потенційною сполукою для пригнічення канцерогенезу, особливо шлунково-кишкового тракту. Розвиток

© І.В. Белінська, О.В. Линчак, Т.В. Рибальченко, О.М. Гурняк

пухлин в організмі порушує функціонування кровотворної тканини, наслідком чого є розвиток анемії, зміни складу та вмісту лейкоцитів і тромбоцитів, які ускладнюють перебіг онкологічних захворювань, залучаються до прогресування пухлин і зменшують ефективність протипухлинної терапії. Крім того, зазначені протеїнкінази, які інгібує МІ-1, відіграють важливу роль у проліферації, диференціюванні та функціонуванні клітин у нормі, в тому числі і гемопоетичних [6-8].

Мета нашого дослідження – вивчити вплив МІ-1 на еритроцитарні, лейкоцитарні та тромбоцитарні показники крові за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки щурів. У всіх щурів, які одержували ДМГ, були виявлені пухлини товстої кишки. Показано, що через 26 тиж експерименту порівняно з 20 тиж, збільшувалася середня кількість пухлин на одного щура і, відповідно, збільшувалася площа ураження кишечника. Доведено, що за умов введення МІ-1 в обох дозах зменшується кількість і розміри пухлин та площа ураження товстої кишки [2].

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах-самцях з початковою масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм і вимог, згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Проведено 2 серії досліджень протягом 20 та 26 тиж (6 тиж після відміни ДМГ). МІ-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії в дозах 0,027 (відповідає концентрації у крові 10^{-6} моль/л) або 2,7 мг/кг (відповідає концентрації у крові 10^{-4} моль/л) і вводили per os щоденно впродовж 20 або 26 тиж. Вибрані дози пригнічували проліферацію пухлинних

клітин in vitro на 50 та 90 % [2]. ДМГ в дозі 20 мг/кг розводили у 0,1 мл фізіологічного розчину і вводили щурам підшкірно один раз на тиждень протягом 20 тиж. Контрольні групи щурів одержували 0,1 мл соняшникової олії та/або 0,1 мл фізіологічного розчину. На підставі результатів статистичного аналізу показники контрольних груп не відрізнялися між собою ($P > 0,05$). Тому їх об'єднали в дві контрольні групи (20 тиж – група I, 26 тиж – група V) для збільшення ймовірності виявлення різниці між показниками дослідних і контрольної груп. Виходячи з цього, щури були поділені на 8 груп.

I серія досліду (20 тиж): I – контрольна група ($n=15$); II – введення ДМГ ($n=8$); III – введення ДМГ сумісно з 0,027 мг/кг МІ-1 ($n=8$); IV – введення ДМГ сумісно з 2,7 мг/кг МІ-1 ($n=8$).

II серія досліду (26 тиж), 6 тиж після відміни ДМГ: V – контрольна група ($n=16$); VI – введення ДМГ ($n=10$); VII – введення ДМГ сумісно з 0,027 мг/кг МІ-1 ($n=11$); VIII – введення ДМГ сумісно з 2,7 мг/кг МІ-1 ($n=10$).

Кров для аналізу у щурів I–IV груп під ефірним наркозом забирали на 21-му, у щурів груп V–VIII – на 27-му тижні. Кров з пахової вени забирали в пробірку з антикоагулянтом ЕДТА, після чого тварин декапітували для проведення цитологічних досліджень кісткового мозку та гістологічного аналізу тканин. Показники крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, концентрація гемоглобіну в крові, гематокрит, середній об'єм еритроцита – MCV, середній вміст гемоглобіну в еритроциті – MCH, середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – MCHC) визначали за загальноприйнятими методами. Диференціальний аналіз лейкограм здійснювали на мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом, підраховуючи 200 лейкоцитів, серед яких еозинофільні та нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити, моноцити.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За тестом Шапіро–Уїлка встановлено,

що показники крові щурів мають ненормальний розподіл в одній із груп порівняння, тому для оцінки різниці між значеннями показників використовували критерій Крускала–Уолліса для множинних порівнянь з подальшим застосуванням непараметричного критерію Манна–Уїтні. Обчислювали медіану, 25-тий і 75-тий проценти, найбільше і найменше значення в групах. Порівнювали показники у тварин після впливу МІ-1 за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки зі щурами з ДМГ-індукованим канцерогенезом товстої кишки та контрольною групою (5 попарних порівнянь). Різницю вважали вірогідною при $P < 0,01$ [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз морфофункціонального стану еритроцитів при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстої кишки у щурів показав, що МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування нормалізує кількість ретикулоцитів в крові ($P=0,006$) порівняно з тваринами з ДМГ-індукованим канцерогенезом і не відрізняється від контрольних значень (рис. 1). За його впливу в дозі 0,027 мг/кг кількість ретикулоцитів залишається істотно вищою ($P=0,001$) порівняно з контрольною групою, так само як у групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом ($P=0,0001$). Спостерігається тенденція до відновлення МСН ($P=0,074$) і МСНС ($P=0,036$) за умов впливу МІ-1 в дозі 2,7 та 0,027 мг/кг (МСНС, $P=0,027$) порівняно з групою щурів з канцерогенезом. Про нормалізацію еритроцитарних показників свідчить відсутність різниці між концентрацією гемоглобіну в крові, МСНС і МСН порівняно з контрольною групою, на відміну від групи щурів, яким вводили ДМГ, в якій концентрація гемоглобіну в крові має тенденцію до зменшення ($P=0,014$), а МСН та МСНС істотно нижчі ($P=0,002$; $P=0,007$ відповідно; рис.2,а,в,г). Кількість еритроцитів, середній їх об'єм, гематокрит не зазнають істотних змін (див. рис. 2,б,д,е).

Після 26 тиж застосування МІ-1 в обох

дозах концентрація гемоглобіну в крові та кількість еритроцитів нормалізуються, про що свідчить відсутність різниці порівняно з контрольною групою та наявність тенденції ($P=0,022$) порівняно з групою з ДМГ-індукованим канцерогенезом (див. рис. 2,а,б). На відміну від цього, в останній (6 тиж після відміни ДМГ) спостерігається тенденція до зменшення концентрації гемоглобіну в крові і кількості еритроцитів ($P=0,019$ і $P=0,048$ відповідно) порівняно з контрольною групою (див. рис. 2,а,б). Інші показники не зазнають істотних змін. Тому на підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що МІ-1 запобігає розвитку анемії, цим самим зменшуючи ускладнення онкологічного захворювання і обмеження застосування цитотоксичної терапії.

МІ-1 в обох концентраціях на тлі кан-

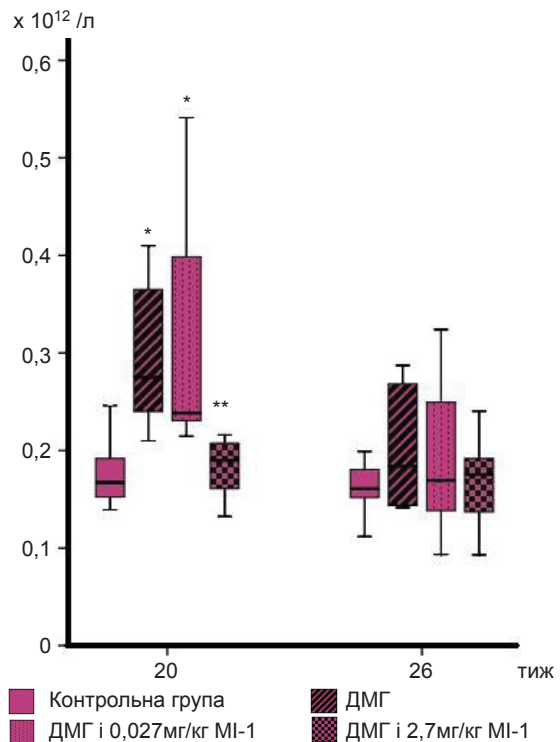


Рис. 1. Кількість ретикулоцитів у крові щурів у нормі та за умов впливу похідного малеїміду в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки. * $P < 0,01$ порівняно з контрольною групою; ** $P < 0,01$ – з тваринами з ДМГ-індукованим канцерогенезом товстої кишки

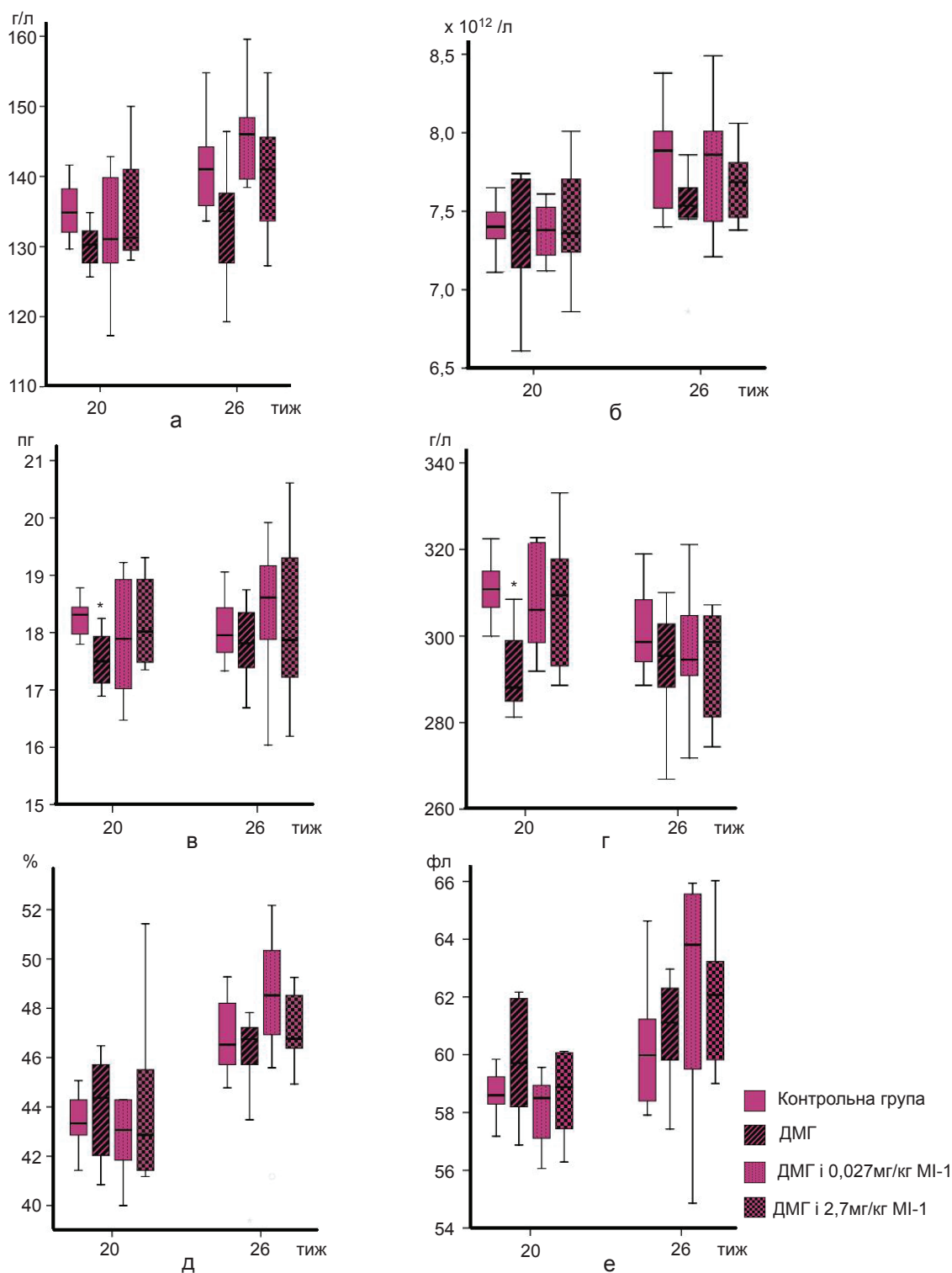


Рис. 2. Морфофункціональна характеристика еритроцитів крові щурів в нормі та за умов впливу похідного малеїміду (MI-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки: а – гемоглобін, б – еритроцити, в – середній вміст гемоглобіну в еритроциті – МСН, г – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – МСНС, д – гематокрит, е – середній об’єм еритроцита – MCV. *P<0,01 порівняно з контрольною групою

Загальний вміст та склад лейкоцитів (медіана [25-й і 75-й процентилі]) в нормі, за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки та впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг протягом 20 та 26 тиж

Схема та серії досліду	Загальна кількість лейкоцитів		Еозинофільні гранулоцити		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити,		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити		
	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	
І серія (20 тиж)													
Контроль	18,90 [14,50;24,0]	3,00 [2,00;4,00]	0,52 [0,31;0,93]	1,50 [0,50;2,00]	0,22 [0,11;0,40]	22,00 [18,50;24,00]	3,84 [3,12;5,25]	66,00 [64,50;73,00]	13,99 [9,72;15,80]	6,50 [4,50;8,00]	1,03 [0,85;1,65]		
ДМГ	19,70 [15,55;25,75]	6,25 [2,75;6,50]	1,18 [0,58;1,50]	1,50 [0,63;1,88]	0,27 [0,14;0,45]	20,25 [15,88;24,88]	4,17 [2,61;5,66]	65,75 [60,13;69,63]	12,77 [10,57;15,03]	8,25 [6,50;10,00]	1,63 [1,06;2,43]		
ДМГ і МІ-1 в дозі													
0,027 мг/кг	19,45 [16,80;23,93]	4,25 [3,13;7,25]	0,80 [0,60;1,60]	1,25 [0,63;1,88]	0,25 [0,12;0,33]	18,25 [14,25;22,75]	3,89 [2,41;4,62]	65,50 [61,63;70,00]	13,52 [11,76;15,20]	10,50 [6,75;11,63]	2,05 [1,10;2,60]		
2,7 мг/кг	18,90 [15,18;23,68]	2,75 [2,00;3,00]	0,42 [0,30;0,71]	1,50 [0,50;2,38]	0,27 [0,12;0,39]	20,75 [16,50;23,25]	3,57 [2,80;4,58]	68,75 [64,38;74,25]	12,86 [9,98;16,84]	6,5 [5,13;8,38]	1,23 [1,17;1,36]		
ІІ серія (26 тиж)													
Контроль	16,70 [14,45;20,93]	3,25 [2,13;4,5]	0,70 [0,42;0,79]	1,00 [0,50;1,8]	0,20 [0,07;0,33]	18,50 [13,50;25,88]	3,44 [2,82;4,10]	71,50 [60,50;73,88]	11,11 [9,10;16,19]	7,00 [5,25;8,75]	1,23 [0,94;1,68]		
ДМГ	19,15 [14,60;24,18]	4,50 [2,88;7,0]	1,01 [0,54;1,25]	0,50 [0,38;2,00]	0,13 [0,07;0,28]	20,00 [16,25;23,25]	3,36 [2,85;4,81]	65,50 [58,25;67,63]	13,42 [7,89;16,29]	10,00* [7,88;14,50]	1,97* [1,52;2,58]		
ДМГ і МІ-1 в дозі													
0,027 мг/кг	18,50 [16,80;26,30]	4,00 [3,00;4,50]	0,91 [0,49;1,16]	1,50 [0,00;1,50]	0,25 [0,00;0,46]	17,50 [14,00;34,00]	3,34 [2,95;5,80]	64,50 [58,00;74,50]	13,03 [9,32;16,96]	7,5 [5,50;12,50]	1,67 [1,26;2,24]		
2,7 мг/кг	19,25 [17,06;22,60]	3,75 [2,50;5,50]	0,69 [0,56;0,97]	1,00 [0,50;2,13]	0,17 [0,10;0,48]	21,75 [17,38;29,25]	4,31 [3,17;6,28]	64,25 [53,75;70,50]	11,70 [10,34;13,93]	7,25 [5,63;11,38]	1,40 [0,95;2,50]		

Примітка. *P<0,01 порівняно з контрольною групою.

церогенезу товстої кишки протягом 20 і 26 тиж експерименту не впливає на загальний вміст лейкоцитів у крові щурів (таблиця). Але спостерігається перерозподіл їх складу: нормалізується як відносний, так і абсолютний вміст еозинофільних гранулоцитів за умов впливу МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг, про що свідчить відсутність різниці порівняно з контрольною групою та наявність тенденції ($P=0,055$ і $P=0,059$ відповідно) порівняно з групою з ДМГ-індукованим канцерогенезом (див. таблицю) після 20 тиж застосування. Відносний і абсолютний вміст еозинофільних гранулоцитів залишається збільшеним майже в 1,5 раза ($P=0,026$ і $P=0,053$ відповідно) за умов застосування МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг, так само як і в групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом (збільшені двічі $P=0,017$, $P=0,045$ відповідно) порівняно з контролем. Після 26 тиж впливу МІ-1 в обох дозах на тлі канцерогенезу відсутня різниця вмісту еозинофільних гранулоцитів щодо контролю, водночас він у середньому на 44 % підвищений ($P=0,035$) в групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом.

Слід відмітити, що МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу нормалізує відносний та абсолютний вміст моноцитів у крові щурів, про що свідчить відсутність різниці в порівнянні з контрольною групою та наявність тенденції ($P=0,092$) щодо групи тварин з канцерогенезом, в якій відносний вміст моноцитів підвищений у середньому на 27 % ($P=0,035$), а абсолютний – на 57 % ($P=0,061$; див. таблицю). При введенні МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг тенденція до збільшення залишається ($P=0,012$, $P=0,034$ відповідно) відносно контролю. Але, відносний та абсолютний вміст нормалізуються після 26 тиж застосування МІ-1 в обох дозах, на відміну від групи з ДМГ-індукованим канцерогенезом, в якій вони істотно збільшені ($P=0,006$ і $P=0,008$ відповідно; див. таблицю).

Використання МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу зменшує

кількість тромбоцитів у крові після 20 і 26 тиж до контрольних значень. Це підтверджується відсутністю різниці з контролем та наявністю тенденції після 20 ($P=0,093$) та 26 тиж ($P=0,013$) порівняно з групою щурів з канцерогенезом (рис. 3). У разі впливу МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг протягом 20 тиж кількість тромбоцитів не відрізняється від контрольних значень, але після 26 тиж – має тенденцію до збільшення ($P=0,016$), водночас в групі з ДМГ-індукованим колоректальним канцерогенезом істотно вища ($P=0,006$; див. рис. 3).

Вплив МІ-1 на клітини крові може бути як безпосереднім, так і опосередкованим. Перший – ймовірно, пов’язаний із протективною дією на мембрани клітин. Ці припущення базуються на дані досліджень, в яких доведено істотне зменшення продуктів окисної модифікації ліпідів і протеїнів мембран ге-

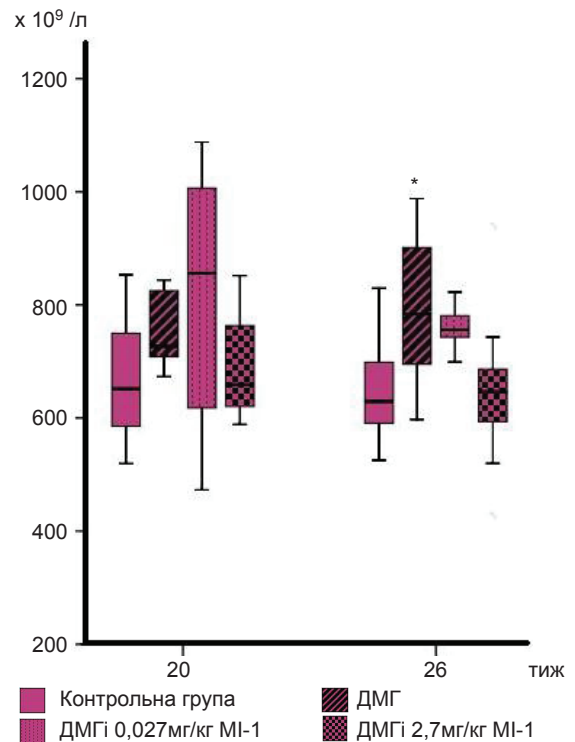


Рис. 3. Кількість тромбоцитів у крові щурів у нормі та за умов впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки; * $P<0,01$ порівняно з контрольною групою

паточитів у разі впливу MI-1 при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів [3]. Аналогічні дані одержані і на клітинах та їх мембранах слизової оболонки кишечника [5]. Тобто, MI-1 сприяє нормалізації продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації протеїнів мембран і активності антиоксидантних ензимів, що порушуються під час дії ДМГ. Саме з цим механізмом ефекту MI-1 може бути пов'язане істотне зменшення кількості ретикулоцитів у крові за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки. Стабілізація мембран еритроцитів запобігає їх гемолізу і, як наслідок, не стимулюється вихід ретикулоцитів із кісткового мозку для відновлення нестачі еритроцитів.

Опосередкована дія MI-1 на клітини крові відбувається декількома шляхами. MI-1 може впливати на диференціювання попередників клітин крові в кістковому мозку через протеїнкінази Yes, Src (h), ZAP70, Syk (h), PDK1, VEGF-R1,2,3 (h) тощо, інгібітором яких він є [1], оскільки ці протеїнкінази задіяні у сигнальних каскадах при проліферації та диференціюванні багатьох клітин, у тому числі і гемопоетичних [6–8].

Поява та ріст багатьох пухлин в організмі, в тому числі і колоректальних, супроводжується високою концентрацією таких цитокінів, як VEGF, TNF α , IL-1, IL-6 тощо, як у тканинах пухлин [10], так і в сироватці крові [11]. Високий вміст цих цитокінів корелює із прогресуванням захворювання і пов'язаний із низькою чутливістю до терапії [12], а їх блокування має терапевтичний ефект [10]. Так, наприклад, синтезуючи VEGF, пухлина стимулює диференціювання клітин крові в кістковому мозку (моноцитів, тромбоцитів тощо), активує в них синтез цитокінів, які використовуює для свого росту, прогресування та метастазування [13]. Експериментально доведено, що клітини колоректальних пухлин активують моноцити до виділення IL-1 β , який у свою чергу активує в пухлинних клітинах гени транскрипційних факторів, що

регулюють клітинний цикл і запускають проліферацію [14]. Активація кінази VEGFR-1 (зв'язування з VEGF) попередників моноцитів призводить до проліферації і міграції їх до осередка пухлин через активацію фосфоїнозитид-3-кінази (PI3K) [15], яка в свою чергу активує 3-фосфоїнозитидзалежну протеїнкіназу-1 (PDK1), кінази Src і Syk [7]. Виходячи з цього, можна вважати, що продемонстрований нами нормалізуючий вплив MI-1 на кількість моноцитів у крові опосередкований блокуванням на гемопоетичних попередниках як рецепторної VEGFR-1-кінази, так і цитоплазматичних PDK1-, Src- і Syk-кіназ, які задіяні у передачі сигналу в клітину.

Інгібування вищезгаданих протеїнкіназ MI-1 може опосередковувати нормалізацію кількості тромбоцитів. Показано, що стимулювання VEGF-R1 призводить до диференціювання мегакаріоцитарних попередників, переміщення їх до синусоїдів кісткового мозку і, як наслідок, до збільшення кількості тромбоцитів у крові [8]. На відміну від цього, стимулювання VEGF-R2 активує проліферацію та виживання мегакаріобластів, кількість тромбоцитів при цьому не змінюється. VEGF-R3 відіграє регуляторну роль у мегакаріоцитопоезі, відновлюючи популяцію цих клітин після гострого пригнічення гемопоезу (сублетальне опромінення, вплив високих доз 5-фторурацилу тощо) та збільшуючи кількість тромбоцитів у відповідь на дію тромбопоетину [16]. Тому збільшення кількості тромбоцитів за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу можна пов'язати з високою концентрацією VEGF у пухлинній тканині [10] і, як наслідок, у сироватці крові, що характерно як для ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки у щурів [17], а так і для колоректального раку у людей, і його концентрація збільшується з прогресуванням захворювання [12]. Крім того збільшена концентрація VEGF у сироватці крові має високий кореляційний зв'язок із кількістю тромбоцитів [18]. Також зазнають змін і самі тромбоцити, в яких різко підвищу-

ється вміст тромбоцитарного фактора росту (PDGF) [19], що пов'язано із прогресуванням розвитку пухлин внаслідок їх васкуляризації. Тому встановлена нами нормалізація кількості тромбоцитів в крові за умов впливу MI-1 на щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки може бути опосередкована його інгібувальним впливом на VEGF-R1,2,3 протеїнкінази, особливо VEGF-R1, оскільки саме з нею пов'язане збільшення кількості тромбоцитів. Нормалізуювальний ефект MI-1 також може бути опосередкований пригніченням активності PDK1-кінази, яка задіяна у передачі проліферативного та диференціювального сигналу в мегакаріоцитах. Так, дефіцит PDK1-кінази у мишей призводить до тромбоцитопенії і зменшення функціональної активності тромбоцитів (зменшення агрегації, ретракції згустка тощо) [20]. Нормалізація кількості тромбоцитів під впливом MI-1 зменшує їх залучення до прогресування пухлин і тим самим поліпшує перебіг захворювання.

Як зазначалося вище, MI-1 зменшує кількість і розміри пухлин та площу ураження товстої кишки вже після 20 тиж застосування [2]. Внаслідок цього знижується вплив на гемопоез цитокінів пухлин і клітин імунної системи і, як наслідок, зменшується вихід клітин з кісткового мозку та нормалізується їх кількість у крові.

Враховуючи ці результати та результати цитогістологічних досліджень ефектів MI-1 *in vitro* та *in vivo* [1–5] можна вважати цю речовину однією із перспективних протипухлинних таргетних сполук нового покоління.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що MI-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу запобігає розвитку анемії, яка ускладнює перебіг онкологічних захворювань, про що свідчать зменшення кількості ретикулоцитів і відновлення вмісту та концентрації гемоглобіну в еритроцитах.

2. MI-1 нормалізує кількість моноцитів і тромбоцитів у крові після 26 тиж впливу за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу (6 тиж після відміни ДМГ), зменшуючи залучення цих клітин до прогресії розвитку пухлин та їх метастазування.

3. Зменшення моноцитозу та тромбоцитозу під впливом MI-1 за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу може бути опосередковано: 1) зменшенням кількості та розміру пухлин і площі ураження товстої кишки і, як наслідок, впливу їх цитокінів на кровотворну тканину; 2) пригніченням проліферації та диференціювання гемопоетичних попередників кісткового мозку через інгібування рецепторних протеїнкіназ васкулярного ендотеліального та епідермального факторів росту, а також нерецепторних PDK1-, Src-, Syk-протеїнкіназ, інгібітором яких він є, і котрі залучені до гемопоезу і до канцерогенезу.

**И.В. Белинская, О.В. Линчак,
Т.В. Рыбальченко, О.Н. Гурняк**

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА ПРИ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИН-ИНДУЦИРОВАННОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА КРЫС

Исследовано влияние ингибитора протеинкиназ производного малеимида (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион) на клетки крови в условиях индуцированного 1,2-диметилгидразином (ДМГ) канцерогенеза толстого кишечника. Установлено, что введение MI-1 в дозе 2,7 мг/кг в течение 20 нед в условиях канцерогенеза предотвращает развитие анемии, которая является следствием онкологических заболеваний, и осложняет их о чем свидетельствуют уменьшение количества ретикулоцитов (0,19 [0,15;0,21]×10¹²/л) и восстановление содержания (18,02 [17,44;19,03] пг) и концентрации (309,42 [292,38;318,27] г/л) гемоглобина в эритроцитах до контрольных значений (0,17 [0,15;0,19], 18,31 [17,95;18,45], 310,78 [306,25;316,18] соответственно) в отличие от группы ДМГ-индуцированного канцерогенеза (0,28 [0,24;0,39]; 17,50 [17,00;17,96]; 288,10 [284,71;303,73] соответственно). MI-1 нормализует количество моноцитов (1,40 [0,95;2,50]×10⁹/л) и тромбоцитов (646,32 [575,23;700,50]×10⁹/л) в крови после 26 нед эксперимента у животных, которым вводили ДМГ, они значительно выше (1,97 [1,52;2,58], 783,90 [687,64;922,27] соответственно) по сравнению с контрольной группой (1,23

[0,94;1,68], 629,34 [590,19;711,48] соответственно). То есть MI-1 уменьшает вовлечение этих клеток в прогрессирование развития опухолей и их метастазирование. Снижение моноцитоза и тромбоцитоза может быть опосредовано: 1) уменьшением количества и размера опухолей и площади поражения кишечника и, как следствие, влияния их цитокинов на кроветворную ткань; 2) угнетением пролиферации и дифференцировки гемопоэтических предшественников костного мозга путем ингибирования малеимидом рецепторных протеинкиназ васкулярного эндотелиального (VEGF) и эпидермального (EGF) факторов роста и нерцепторных PDK1-, Src- и Syk-киназ, вовлеченных как в гемопоэз, так и канцерогенез.

Ключевые слова: производное малеимида, ингибитор протеинкиназ, 1,2-диметилгідразиніндуцированный канцерогенез толстого кишечника, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты.

I.V. Byelinska , O.V Lynchak , T.V. Rybalchenko , O.M. Gurnyak

HEMATOLOGICAL EFFECTS OF THE PROTEIN KINASES INHIBITOR MALEIMIDE DERIVATIVE OF DIMETHYLHYDRAZINE-INDUCED COLORECTAL CARCINOGENESIS OF RATS

The effect of the protein kinase inhibitor maleimide derivative (MI-1, 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) on blood cells of rats with 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis has been studied. Administration of MI-1 at 2.7 mg/kg for 20 weeks on DMH-induced carcinogenesis prevents anemia, which is a consequence of cancer and complicates it. This is confirmed by a reduction in the number of reticulocytes (0,19 (0,15;0,21)×10¹²/l) and restoration of mean corpuscular hemoglobin (18,02 (17,44;19,03) pg) and mean corpuscular hemoglobin concentration (309,42 (292,38;318,27) g/L) to a control value (0,17 (0,15;0,19), 18,31 (17,95;18,45), 310,78 (306,25;316,18), respectively) in contrast to the group DMH (0,28 (0,24;0,39); 17,50 (17,00;17,96); 288,10 (284,71;303,73), respectively). MI-1 normalizes the number of monocytes (1,40 (0,95;2,50)×10⁹/L) and platelets (646,32 (575,23;700,50)×10⁹/L) in the blood after 26 weeks of experiment; in the DMH group, the values are significantly higher (1,97 (1,52;2,58), 783,90 (687,64;922,27), respectively) as compared to control group (1,23 (0,94;1,68), 629,34 (590,19;711,48), respectively). MI-1 reduces the involvement of these cells in the tumors progression and metastasis. Reduction of the monocytosis and thrombocytosis may be mediated by: 1) a decrease in the number and size of tumors and, consequently, the influence of their cytokines on hematopoietic tissue; 2) suppression of proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells through inhibiting of receptor protein kinases of vascular endothelial and epidermal growth factors and non-receptor PDK1-, Src- and Syk- kinases, that are involved in hematopoiesis and carcinogenesis.

Key words: maleimide derivative, protein kinases inhibitor, 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis, erythrocytes, leukocytes, platelets

Taras Shevchenko National University, Kyiv

REFERENCES

1. Dubinina GG, Golovach SM, Kozlovsky VO, Tolmachov AO, Volovenko YuM. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Journal Organichnoi ta farmacev-tichnoi khimii (Ukraine)*. 2007; 5(1):39–49.
2. Lynchak OV. The influence of the maleimide derivative on the condition of the normal rat liver and bowel and with chemical-induced carcinogenesis of the colon. *Synopsis Dissertat For Scientif Degree of Candidate the Biol Scienc*. Kyiv, 2010:1–20.
3. Filinska OM, Yablonska SV, Mandryk SY, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. State of the liver antioxidant system and content of matrix metalloproteinase-2 of large intestine under the effect of maleimide derivative in experimental colon carcinogenesis in rats. *Ukrainian Biochem J*. 2010; 82(4):69–77.
4. Byelinska IV, Rybalchenko VK, Ostrovska GV, Dyagil IS. Hematological effects of protein kinases inhibitor maleimide derivative (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione). *J of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2010; 4(1):32–35.
5. Filinska O, Yablonska S, Mandryk S, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. Effect of maleimide derivative on oxidative stress and glutathione antioxidant system in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rat. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska*. 2010. *Sec. DDD, XXIII*, 3:191–195.
6. Pearn L, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood*. 2007; 109:4461–4469.
7. Park H, Ishihara D, Cox D. Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 510(2):101–111.
8. Pitchford SC, Lodie T, Rankin SM. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood*. 2012; 120(14):2787–2795.
9. Grzhibovskiy AM. Analysis of three or more independent groups of quantitative data. *Ecology of human [Russian]*. 2008; (3):50–58.
10. Lee HH, Son YJ, Lee WH, Park YW, Chae SW, Cho WJ, et al. Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int J Cancer*. 2010; 126:1817–1827.
11. Long TM, Raufman JP. The diagnostic and prognostic role of cytokines in colon cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 2011; 2011(1):27–39.
12. Nakamura I, Shibata M, Gonda K. Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate

- with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncology Letters*. 2013; 5(5):1682–1686.
13. Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, Landsman L, Cochain C, Silvestre J.S, et al. On-site education of VEGF–recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *JEM*. 2013; 210(12):2611–2625.
 14. Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. The NF–κB/AKT–dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL–1β. *Cancer Microenvironment*. 2009; 2:69–80.
 15. Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR–1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(2):322–328.
 16. Thiele W, Krishnan J, Rothley M, Weih D, Plaumann D, Kuch V, et al. VEGFR–3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis. *Blood*. 2012; 120(9):1899–1907.
 17. Goyal RK, Solanki R. Anti cancer activity of acetone extract of *Quercus Infectoria* Olivier Fagaceae in 1,2–dimethylhydrazine–induced colon cancer 20–HETE Mimetics of inhibitors in the treatment of Cancer patient with sepsis or septic shock . *Int. J. Cancer Studies and Res*. 2013; 2(1):1–7.
 18. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of Plasma and Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels with Platelet Count in Colorectal Cancer: Clinical Evidence of Platelet Scavenging? *Clin. Cans. Res*. 2000; 6:3147 – 3152.
 19. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, Michel LV, Connors S, Oenick M, et al. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis*. 2012; 15(2):265–73.
 20. Chen X, Zhang Y, WangY, Li D, Zhang L, WangK, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis. *Blood*. 2013; 121(18):3718–3726.

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

Матеріал надійшов до
редакції 24.03.2014

А.І. Березнякова, В.Ф. Черемісіна, О.Д. Жемела

Особливості стану гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом

У роботі вивчено показники гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом: імуноглобулінів (Ig) класу А, Е, G, М; циркулюючих імунних комплексів (ЦІК); зрілих Т-лімфоцитів, хелперних, супресорних, В-лімфоцитів, недиференцованих лімфоцитів. Встановлено, що у щурів з алергічним дерматитом найбільш активна гуморальна ланка імунітету. Однією з ланок патогенезу цього захворювання є підвищення вмісту ЦІК у крові та зниження Т-хелперів у загальній кількості Т-лімфоцитів. Інформаційним показником з високим рівнем кореляції є IgE, що підтверджує доцільність його визначення в плазмі крові при гострому дерматиті для характеристики лімфоцитів-маркерів апоптозу та прогнозу захворювання. Визначена негативна кореляційна залежність між концентраціями СД95 – маркера апоптозу і IgE в групі здорових і хворих тварин може свідчити про участь системи апоптозу в регуляції продукції загального IgE.

Ключові слова: алергічний дерматит, імуноглобуліни, циркулюючі імунні комплекси.

ВСТУП

Незважаючи на значні успіхи, які досягнуті у вивченні патогенезу запальних захворювань шкіри, проблема діагностики і лікування дерматитів залишається актуальною. Оскільки, на відміну від системних змін, дослідженню яких присвячено багато праць [1–4], особливостям місцевого імунітету при дерматитах приділяється значно менше уваги як клініцистів, так і експериментаторів [5]. Водночас патогенетично значущі відхилення відбуваються саме на топічному рівні [6, 7]. Дані багатьох досліджень свідчать про важливе місце у розвитку запального процесу у шкірі імунних реакцій, опосередкованих Т-лімфоцитами [8–10]. Зокрема, встановлено підвищення вмісту Т-хелперів (СД4) та Т-супресорів (СД8) лімфоцитів у шкірі хворих на псоріаз в порівнянні зі здоровою шкірою. Однак дані досить суперечливі: деякі автори відмічають надлишок СД4-лімфоцитів, інші – СД8 [9, 10]. Важливе місце в патогенезі алергічних захворювань відводять і циркулюючим імунним комплексам (ЦІК). Встановлено, що

вони формуються після кожної зустрічі антигена з антитілом та порушуються зусиллями мононуклеарних фагоцитів по закінченні активації комплементу [11–13]. Формування ЦІК являє собою фізіологічні механізми захисту, наслідком яких є швидке усунення як ендогенних, так і екзогенних антигенів (віруси, мікроорганізми, антигени, гриби тощо) ретикуло-ендотеліальною системою. Підвищення вмісту ЦІК у різноманітних біологічних середовищах, наприклад, у сироватці крові спостерігається при багатьох запальних захворюваннях і тому їх визначення є важливим показником при оцінці загального стану організму.

Мета нашої роботи – вивчити патогенетичні особливості показників гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 30 нелінійних щурах-самцях, масою 180,0–200,0 г, які зна-

ходилися в умовах віварію на однаковому харчовому та водному режимах. Тварини були розподілені на 2 групи. До I контрольної групи ввійшли 10 інтактних тварин, до II групи – 20 тварин з модельованим алергічним дерматитом [14].

Для дослідження показників імунної системи використовували кров з хвостової вени щурів, яку відбирали вранці натщесерце (у тварин в клітках на ніч забирали залишки їжі та води). В крові визначали такі показники: вміст імуноглобулінів (Ig) класу А, Е, G, М; ЦІК, кількість зрілих Т-лімфоцитів (СД3), хелперних (СД4), супресорних (СД8), загальну кількість В-лімфоцитів (СД19), недиференційованих лімфоцитів (СД56). Дослідження проводили за методикою, яка додавалася до цієї панелі моноклональних антитіл. Мікроскопію виконували на мікроскопі фірми «Люам РІ». Алергічний дерматит викликали введенням 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ): 3 краплі 5%-го його розчину одноразово у вигляді аплікації наносили на місце сенсibiliзації (поверхня спини) з додатковим нанесенням на 7 інших ділянок шкіри по 1 краплі 1%-го розчину. У розвитку сенсibiliзації у щурів за клінічною та морфологічною картиною шкіри [15] розрізняли 2 етапи. Перший етап – первинно-контактна реакція (через 24 год) у вигляді обмежуваного набряку та гіперемії. Ця реакція має риси неспецифічного запалення з деякими ознаками початку розвитку сенсibiliзації. Другий етап (на 8-му добу) – спонтанна запальна реакція (реакція спалахування) з тотальним некрозом епідермісу та утворенням великих субепідермальних міхурів. Ця реакція розвинулася на основі ослаблення імунної системи та обов'язковим компонентом при цьому була інфільтрація з наявністю базофілів. Важкість алергічного дерматиту оцінювали за загальним станом і поведінкою тварин за ступенем розвитку дерматиту: 0 балів – видимих ушкоджень не спостерігалось; 1 бал – слабо виражена гіперемія з дрібнолускатим пошархненням; 2 бали – помірно виражена

гіперемія, злушення, крапчасті крововиливи; 3 бали – виражена гіперемія, виразки шкіри; 4 бали – різка еритема з явищами геморагій, вираженою інфільтрацією, виразками.

Усі дослідження проводили відповідно до національних «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2011), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та схвалені 1-м Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [16]. Усі маніпуляції, які викликали біль, здійснювали під барбаміловим наркозом. Одержані результати опрацьовані статистично за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6.0 з використанням критерію t Стьюдента та кореляційного аналізу. Вірогідно значимою вважали різницю при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення інтенсивності імунологічних реакцій у щурів з алергічним дерматитом ми проаналізували показники клітинного і гуморального імунітету щодо значень інтактних тварин. При аналізі показників імунного статусу щурів з алергічним дерматитом встановлені зміни у фенотипі Т-клітин відносно контролю (табл. 1). Так, загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3) значно знижена в групі щурів з алергічним дерматитом ($55,0 \pm 9,3$ щодо $62,4 \pm 5,0$; $P < 0,05$), що відображає дефіцит Т-клітинних механізмів захисту, які здійснюють імунологічний контроль за антигенним гомеостазом організму. Підрахунок відносного числа Т-хелперів (СД4) показав зниження і цієї популяції Т-лімфоцитів у щурів з дерматитом ($38,1 \pm 7,95$ щодо $42,3 \pm 9,5$; $P < 0,05$). Одночасно виявлена тенденція до незначного зниження числа Т-супресорів (СД8) ($28,6 \pm 9,0$ і $30,8 \pm 8,0$; $P < 0,05$). Кількість недиференційованих лімфоцитів (СД56) у щурів з алергічним дерматитом значно перевищувало аналогічні значення у тварин групи

Таблиця 1. Показники Т-клітинної ланки імунного стану периферичної крові (%) у щурів з алергічним дерматитом

Показники, %	Інтактні щури (n=10)	Щури з алергічним дерматитом (n=20)
Загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3)	62,4±5,0	55,0±9,3*
Т-хелпери (СД4)	42,3±9,5	38,1±7,95*
Т-супресори (СД8)	30,8±8,0	28,6±9,0*
«Нульові» недиференцовані лімфоцити (СД56)	19,3±8,0	24,5±9,3*
Відношення Т-хелперів до Т-супресорів (СД4/СД8)	1,4±0,1	1,32±0,4

Примітка. Тут і в табл. 2 *P <0,05 у порівнянні з контролем.

контролю (24,5±9,3 щодо 19,3±8,0; P<0,05). Підвищення цього показника свідчило про напруженість імунітету у щурів з алергічним дерматитом.

Дослідження гуморальних факторів імунного статусу у тварин з дерматитом також виявило деякі відхилення в порівнянні з інтактними щурами (табл. 2). Кількість В-лімфоцитів мала тенденцію до збільшення (26,4±7,1 відносно 24,2±6,8; P>0,05). Важливе значення в оцінці гуморального імунітету має співвідношення популяцій у загальному пулі В-лімфоцитів. Нами встановлена дизімуноглобулінемія: зниження вмісту IgM і IgG та підвищення IgA. Вміст IgA сироватки крові у щурів з дерматитом складав 1,92±1,10 г/л щодо 1,4±0,25 г/л у інтактних тварин. Таке підвищення вмісту IgA на фоні зниження показників Т-ланки імунітету, скоріш всього, є компенсаторним та відображає поліклональну активацію В-системи імунітету.

Крім цього, нами відмічено збільшення

кількості ЦІК (67,0±16,6 щодо 41,3±16,7; P<0,05), що підтверджувало пряму їх причетність до розвитку запального процесу у шкірі тварин з дерматитом. Типовою для останніх була тенденція до зниження показників Т-клітинної ланки імунітету. Зниження кількості Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій свідчило про недостатність клітинної ланки імунітету та зменшення резистентності організму до інфекції. В-лімфоцити (СД19) у 60 % щурів з дерматитом мали тенденцію до підвищення.

Коефіцієнт кореляції між рівнем активованих лімфоцитів (маркерів апоптозу клітин) і лімфоцитами периферичної крові у щурів з алергічним дерматитом був таким:

Загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3)	0,3
Т-хелпери (СД4)	0,12
Т-супресори (СД8)	0,26
Загальна кількість В-клітин (СД19)	-0,09
«Нульові» недиференційовані лімфоцити (СД56)	0,46

Слід відмітити слабку кореляційну залежність між лімфоцитами крові та кількістю

Таблиця 2. Показники гуморальної ланки імунітету і циркулюючих імунних комплексів у периферичній крові щурів з алергічним дерматитом

Показники	Інтактний контроль (n=10)	Щури з алергічним дерматитом (n=20)
Загальна кількість В-клітин (СД19)	24,2±6,8	26,4±7,1
Циркулюючі імунні комплекси Імуноглобуліни класу, г/л	41,3±16,7	67,0±16,6*
А	1,4±0,25	1,92±1,10*
М	1,3±1,5	0,98±0,1
Г	13,2±1,05	10,4±1,04
Е	35,1±1,7	37,2±1,8

Таблиця 3. Індексна оцінка клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом з різним вмістом імуноглобуліну (Ig) класу E (n=10)

Показники	Група з IgE > 100 МО/мл	Група з IgE < 100 МО/мл
CD3/CD19	2,4	2,3
CD3/CD4	1,4	2,7
CD3/CD8	2,7	2,1
CD4/CD8	1,9	0,9
Σ	8,4	8,0

CD95 – маркера апоптозу у щурів з дерматитом, що може бути пояснено включенням різних механізмів апоптозу і підтверджує існування думки про відсутність єдиних механізмів його запуску при розвитку захворювань різних нозологічних груп [17].

Для вивчення інтенсивності імунних реакцій на місцевому рівні 20 щурів з алергічним дерматитом були поділені на 2 підгрупи по 10 тварин у кожній: перша підгрупа зі значенням IgE > 100 МО/мл, друга – IgE < 100 МО/мл. Стан імунного статусу оцінювали за результатами дослідження клітинного і гуморального імунітету індексною оцінкою (табл. 3, 4).

Варто зазначити, що локальні показники клітинного імунітету (8,4) значно знижені відносно гуморальних індексних показників (10,7) у групі з IgE-позитивною відповіддю. У групі щурів з IgE-негативною відповіддю

такої різниці ми не спостерігали (індексна оцінка клітинних факторів – 8,0, гуморальних – 7,9).

Висока індексна оцінка гуморального імунітету свідчила, з нашої точки зору, про напруженість гуморальних імунних реакцій у щурів з алергічним дерматитом.

При підвищенні у периферичній крові вмісту загального IgE зменшувалося число CD95. Встановлено (P<0,05) зниження кількості CD95-клітин та рівня експресії на них Fas-рецептора (32,0±3,3 %) відносно значень у інтактних щурів (58,0±8,41 %). Можливо, це відображає процеси регуляції експресії Fas-рецептора з боку цитокинів, які продукуються Th2, що блокує передачу сигналів апоптозу в клітини, в тому числі і IgE-продукуючі, та викликає підтримання продукції IgE (табл.5).

Виявлена негативна кореляційна залежність у обох групах щурів між концентраціями

Таблиця 4. Індексна оцінка гуморального імунітету у щурів з алергічним дерматитом з різним вмістом імуноглобуліну класу E (IgE)

Показники	Група з IgE > 100	Група з IgE < 100
IgG/CD19	0,7	1,5
IgA/CD19	0,3	0,3
IgM/CD19	0,04	0,1
IgE/CD19	0,8	0,5
IgG/IgA	7,1	4,1
IgA/IgM	0,4	0,1
IgG/IgM	0	0,8
IgE/IgG	0,9	0,2
IgG/ЦІК	0,2	0,2
IgA/ЦІК	0,05	0,05
IgM/ЦІК	0	0
IgE/ЦІК	0,2	0,06
Σ	10,7	7,9

Таблиця 5. Коефіцієнт кореляції лімфоцитів периферичної крові і СД95 – маркера апоптозу у щурів з алергічним дерматитом залежно від вмісту загального імуноглобуліну класу Е (IgE)

Показники	СД95	
	IgE < 100 МО/мл	IgE > 100 МО/мл
СД3	0,19	0,53
СД4	-0,2	0,76
СД8	-0,28	0,44
СД19	0,46	0,42
СД56	0,38	0,80
IgE	-0,62	-0,9

СД95-маркера апоптозу і IgE може свідчити про участь системи апоптозу в регуляції продукції загального IgE [5, 18].

ВИСНОВКИ

1. У щурів з алергічним дерматитом найбільш активна гуморальна ланка імунітету.

2. Одною із ланок патогенезу алергічного дерматиту є підвищення вмісту ЦИК у крові та зниження Т-хелперів у загальній кількості Т-лімфоцитів.

3. Інформаційним показником з високим рівнем кореляцій є IgE, що підтверджує доцільність його визначення в плазмі крові при гострому дерматиті для характеристики лімфоцитів-маркерів апоптозу та прогнозу захворювання.

4. Негативна кореляційна залежність між концентраціями СД95 – маркера апоптозу і IgE в групі здорових і хворих тварин може свідчити про участь апоптозу в регуляції продукції загального IgE.

**А.И. Березнякова, В.Ф. Черемисина,
О.Д. Жемела**

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У КРЫС С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

В работе изучены показатели системного и локального иммунитета у крыс с аллергическим дерматитом: иммуноглобулинов (Ig) класса А, Е, G, М; циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); зрелых Т-лимфоцитов, хелперных, супресорных, В-лимфоцитов, недифференцированных лимфоцитов. Установлено, что у крыс с аллерги-

ческим дерматитом на локальном уровне наиболее активно гуморальное звено иммунитета. Одним из звеньев патогенеза этого заболевания является повышение содержания ЦИК в крови и снижение Т-хелперов в общем количестве Т-лимфоцитов. Определено, что информационным показателем с высоким уровнем корреляций является IgE, что подтверждает целесообразность его определения в плазме крови при остром дерматите для характеристики лимфоцитов-маркеров апоптоза и прогноза заболевания. Установленная отрицательная корреляционная зависимость между концентрациями СД95 – маркера апоптоза и IgE в группе здоровых и больных животных может свидетельствовать об участии системы апоптоза в регуляции продукции общего IgE.

Ключевые слова: аллергический дерматит, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы.

**A.I. Bereznyakova, V.F. Cheremisina,
O.D. Jemela**

SYSTEMIC AND LOCAL IMMUNITY IN RATS WITH ATOPIC DERMATITIS

We studied indicators of systemic and local immunity in rats with allergic dermatitis (Ig A, E, G, M, CIC, CD3, CD4, CD8, SD19, SD56). In rats with allergic dermatitis on the local level, the most active is humoral immunity. One of the pathogenesis of atopic dermatitis is an increased content of circulating immune complexes in the blood and decreased T-helper in a total amount of T- lymphocytes. An informative index with a high level of correlation is the IgE level, confirming the advisability of its determination in blood plasma in acute dermatitis to characterize lymphocyte apoptosis markers and prognosis of the disease. An established negative correlation between the concentrations of SD95-marker of apoptosis and the IgE level in healthy and sick animals may point for involvement of apoptosis in the regulation of the total IgE.

Key words: allergic dermatitis, immunoglobulin, circulating immune complexes.

National University of Pharmacy, Kharkov

REFERENCES

1. Boychuk S, Mustafin I, Fassahov R, Mbainadzi L. Apoptosis of lymphocytes at atopic asthma. *Pulmonology*. 2003;5:38-44.
2. Vavilov A, Samsonov V, Dimant L. et al. Immunological researches of T-lymphocytes in the skin of patients with psoriasis. *J Dermatol*. 2000;4:4-5.
3. Zalkan P, Ievleva E. Effect of synthetic detergents on the reactivity skin of guinea pigs: actual problems of occupational dermatology. Moscow; 1965.
4. Ivanova Y, Nacharov Y, Reshetnicov T. Features of the immunological status of patients with perioral dermatitis during immunomodulatory therapy. *Herald New Medical Technol*. 2007;14(2):47-9.
5. Ischeykin K. A comparative study of performance of the immune system in children with atopic dermatitis and eczema. *Ukr J Dermatol, Venereol, Cosmetol*. 2009;2: 58-63.
6. Karaulov AV. *Clinical Immunology and Allergology*. Moscow: Med. Inform. Agency; 2002.
7. Katunina O. Immunomorphological characteristics of infiltrate in psoriasis. *J Dermatol and Venereol*. 2005;2:25-8.
8. Reznikov O, Solovyov A, Dobrelya N, Stefanov O. Biotic preclinical assessment and other scientific studies performed on animals: method. recommendations. *J Pharmacol and Pharmacy*. 2006;7:47-61.
9. Sylkov A, Kovalevskaya-Kucheryavenko T, Sennikov S. Cytokines in immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Цитокінес і Інфламмація*. 2012;13(1):5-10.
10. Frolov V, Peresadin N, Boitchenko P. Diagnostic and prognostic value of circulating immune complexes in patients. *Medical Business*. 1990;6:116-8.
11. Frolov V, Sotskaya Y. Circulating immune complexes and the phagocytic activity of monocytes in patients with chronic bronchitis at carrying out of differentiated immune correction. *Ukr Pulmonol Zh*. 2003;3:28-30.
12. Tsvetkov G, Mordovtsev V. *Patomorfology of the skin diseases: a guide for physicians*. Moscow; 2003.
13. Charlesworth E. Immunomodulation in dermatology lessons in the treatment of psoriasis. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27(2):123-5.
14. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. London: Churchill Livingstone; 2006.
15. Kaditis A, Kalampouka E, Hatzinikolaou S. et al. Associations of tonsillar hypertrophy and snoring with history of wheezing in childhood. *Pediatric Pulmonol*. 2010;45(3):275-80.
16. Owen C. Immunoglobulin E: role in asthma and allergic disease: lessons from the clinic. *Pharmacol. Ther*. 2007;113:121-33.
17. Silvestri M., Pistorio A., Battistini E., Rossi G.A. IgE in childhood asthma: relevance of demographic characteristics and polysitisation [Internet] 2009 [cited 2010 July 22]. Available from: <http://adc.bmj.com/content/early/adc>.
18. Uabrijan L, Lipozenij J, Batinac T. et al. Growth CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages in psoriasis. *Fcta Dermatovenerol*. 2009;17(3):162-5.

Нац. фармацевт. ун-т, Харків
E-mail: patology@ukrfa.kharkov.ua

Матеріал надійшов
до редакції 14.03.2014

Б.М. Маньковський, А.М. Урбанович

Вміст лептину крові та активність системної запальної відповіді у хворих на цукровий діабет 2-го типу із різною масою тіла та тривалістю процесу

Метою нашої роботи було встановити взаємозв'язок вмісту лептину крові та маркерів генералізованого неспецифічного запалення у пацієнтів із цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу залежно від його тривалості, наявності надлишкової маси та ожиріння. Порівнювали вміст лептину та інтерлейкінів (ІЛ) ІЛ-2, ІЛ-6, туморнекротичного фактора α (TNF- α) у групах із різною тривалістю ЦД 2-го типу, із нормальною та надлишковою масою тіла та ожирінням. У пацієнтів із підвищеним вмістом лептину виявлено достовірно нижчий вміст TNF- α ($7,82 \pm 0,34$ нг/мл). Також спостерігалось позитивна кореляція останнього із індексом маси тіла ($r=0,48$, $P<0,0001$), ІЛ-6 ($r=0,13$, $P=0,019$), що спричиняється збільшенням пулом вісцеральної жирової тканини, яка продукує лептин та 10–35 % ІЛ-6. У пацієнтів із вперше виявленим ЦД 2-го типу достовірно нижчий вміст лептину ($19,35 \pm 1,39$ нг/мл) та TNF- α ($7,82 \pm 0,94$ нг/мл). Найвищий вміст лептину та цитокінів був у пацієнтів із тривалістю ЦД від 5 до 10 років, як правило, саме у цей період відбувається розвиток серцево-судинних ускладнень. Вміст лептину ($6,39 \pm 1,15$ нг/мл) достовірно найнижчий, а вміст TNF- α ($11,37 \pm 3,77$ нг/мл) та ІЛ-6 ($10,12 \pm 6,91$ нг/мл) найвищий у групі пацієнтів із нормальною масою. Ймовірно, саме підвищений вміст цих цитокінів дає змогу зберігати нормальну масу тіла таким пацієнтам. Відомо, що при тривалій глюкозотоксичності та ліпотоксичності виникає метаболічна імуносупресія, яка визначається змінами в Т-клітинній ланці імунітету, що також сприяє виникненню аутоімунності при ЦД 2-го типу.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, лептин, інтерлейкін-2, інтерлейкін-6, туморнекротичний фактор α .

ВСТУП

Дослідження останніх років свідчать про залучення імунної системи у патогенез цукрового діабету (ЦД) 2-го типу та макросудинних ускладнень захворювання. Медіатори генералізованого неспецифічного запалення є предикторами розвитку цього захворювання. У пацієнтів із наявним ЦД 2-го типу виявляють підвищений вміст ліпоцитокінів [1–3].

Окрім цього, є відомості, що гормон жирової тканини – лептин відіграє істотну роль у регуляції імунологічної відповіді. Незважаючи на велику кількість досліджень, його роль у системному запаленні, патогенезі розвитку ЦД 2-го типу та розвитку серцево-судинних

ускладнень залишається незрозумілою і досі невивченою. Лептин модулює концентрацію про- та протизапальних цитокінів, оскільки активує такі запальні клітини, як макрофаги, нейтрофільні гранулоцити, Т-лімфоцити. Він впливає на синтез та активацію маркерів генералізованого неспецифічного запалення – туморнекротичного фактора α (TNF- α), інтерлейкінів (ІЛ) – ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-10, С-реактивного білка (СРБ). Встановлений прямий кореляційний зв'язок між вмістом TNF- α , СРБ, ІЛ-6 і лептином у здорових осіб. Лептин, TNF- α , ІЛ-6, ІЛ-2 та інші цитокіни безпосередньо пов'язані між собою і регулюються тими самими механізмами – через PPAR- γ (від англ. peroxisome proliferator-activated receptor). Ві-

рогідно, що лептин прямо або опосередковано через імунну систему може змінювати активацію та синтез цитокінів, які роблять значний внесок у виникнення та прогресування ЦД 2-го типу та серцево-судинної патології [3–6].

Механізми розвитку ЦД 2-го типу та його ускладнень нині вивчені не достатньо. Численні дослідження останніх років скеровані на в'яснення ролі гормонів, які продукуються жировою тканиною, серед яких одним із основних є лептин, та маркерів генералізованого неспецифічного запалення, зокрема TNF- α , ІЛ-2 та ІЛ-6, які частково теж продукуються жировою тканиною.

Мета нашої роботи – встановити взаємозв'язок вмісту лептину крові та маркерів генералізованого неспецифічного запалення у пацієнтів із ЦД 2-го типу залежно від його тривалості, наявності надлишкової маси та ожиріння.

МЕТОДИКА

Обстежено 154 жінки та 151 чоловік із ЦД 2-го типу. Для діагностики ожиріння та його ступеня застосовували класифікаційні критерії ВООЗ (1997) із встановленням індексу маси тіла (ІМТ): ІМТ від 19 до 24,99 кг/м² – нормальна маса; ІМТ від 25 до 29,99 кг/м² – надлишкова маса; ІМТ від 30 до 34,99 кг/м² – 1-й ступінь ожиріння; ІМТ від 35 до 39,99 кг/м² – 2-й ступінь ожиріння; ІМТ понад 40 кг/м² – 3-й ступінь ожиріння. Обстеження проводили на базі Львівського обласного ендокринологічного диспансеру.

Порівнювали вміст лептину та TNF- α , ІЛ-2, ІЛ-6 у групах із різною тривалістю ЦД, із нормальною і надлишковою масою тіла та ожирінням. Групи були зіставлені за

віком та компенсацією діабету.

Кров для аналізу забирали натщесерце. Вміст лептину в крові визначали імуноферментним методом («ELISA») за допомогою набору реактивів фірми «DRG» (Німеччина), TNF- α , ІЛ-2 та ІЛ-6 за допомогою наборів реактивів фірми «Diacolone» (Франція).

Під час клінічного дослідження дотримувалися передбачених у таких випадках заходів безпеки для здоров'я пацієнта, захисту його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини, відповідних законів України.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою параметричних методів тесту Ст'юдента та кореляційного аналізу з визначенням коефіцієнта Пірсона, а у разі невідповідності нормальному розподілу – за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова та з визначенням коефіцієнта Спірмена. Результати представлені у вигляді середнього значення й стандартного відхилення та коефіцієнта кореляції r . Достовірними вважали значення при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пацієнти були розділені на дві групи: 1-ша – із вмістом лептину в межах норми, 2-га – із підвищеним вмістом гормону (норми: чоловіки: 3,84 \pm 1,79 нг/мл, жінки: 7,36 \pm 3,73 нг/мл). У 1-й групі вміст лептину у жінок становив 3,9 \pm 0,68 нг/мл, у чоловіків 3,01 \pm 0,23 нг/мл; у 2-й групі вміст лептину у жінок був 39,7 \pm 2,24 нг/мл, у чоловіків 19,91 \pm 3,25 нг/мл. Результати аналізу вмісту цитокінів у цих групах представлені у табл. 1.

Таблиця 1. Вміст цитокінів (нг/мл) у групах із нормальним і підвищеним вмістом лептину в крові хворих на цукровий діабет 2-го типу

Показник	Група 1 (n=61)	Група 2 (n=244)
Туморнекротичний фактор α	9,0 \pm 1,62	7,82 \pm 0,34*; $P < 0,05$
Інтерлейкін-2	6,38 \pm 0,37	6,67 \pm 0,45
Інтерлейкін-6	2,71 \pm 0,48	2,55 \pm 0,21

* $P < 0,05$.

Виявлено нижчий вміст TNF- α ($7,82 \pm 0,34$ нг/мл, $P < 0,05$) у групі пацієнтів із підвищеним вмістом лептину. Достовірних змін у вмісті інтерлейкінів не виявлено.

Слід відмітити позитивну кореляцію вмісту лептину із ІМТ ($r=0,48$, $P < 0,0001$), ІЛ-6 ($r=0,13$, $P=0,019$), що спричиняється збільшеним пулом вісцеральної жирової тканини, яка продукує лептин та 10–35 % ІЛ-6 [8, 9]. Не виявлено кореляції між вмістом лептину та TNF- α , ІЛ-2 (рисунок).

Після розподілу пацієнтів на групи із різною тривалістю ЦД отримано результати, які представлені у табл. 2.

У пацієнтів із вперше виявленим ЦД 2-го типу спостерігалися достовірно нижчий вміст лептину ($19,35 \pm 1,39$ нг/мл) та TNF- α ($7,82 \pm 0,94$). Найвищий вміст лептину та цитокінів був у групі пацієнтів із тривалістю захворювання від 5 до 10 років, як правило, саме у цей період відбувається розвиток серцево-судинних ускладнень. Доведено, що TNF- α спричиняє підвищення генерації вільних радикалів, що може призводити до інтенсифікації процесів апоптозу та інактивації оксиду азоту в ендотелії [10].

Багатьма авторами лептин та цитокіни вважаються маркерами серцево-судинних захворювань [11, 12]. У групі із тривалістю ЦД від 5 до 10 років виявлено позитивну

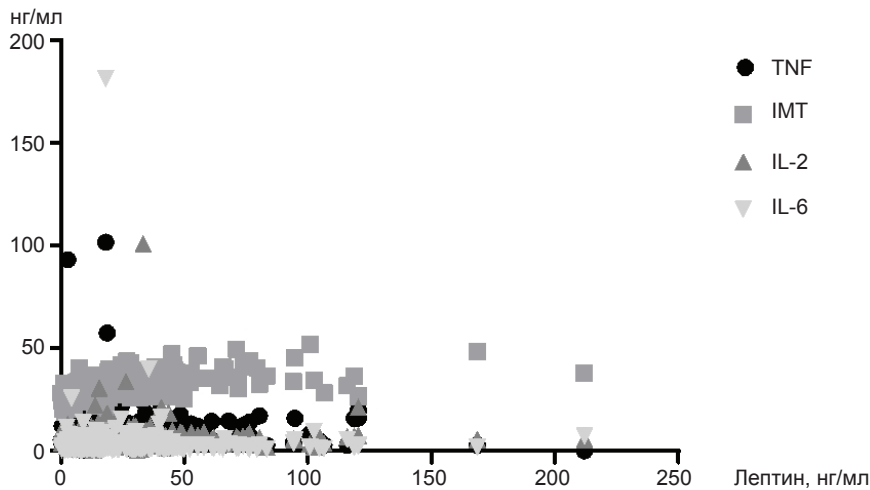
кореляцію між вмістом лептину та ІЛ-6 ($r=0,246$, $P=0,012$).

Лептин має імуномодулювальну функцію, але з огляду на його про- та протизапальну дію важко передбачити остаточний цього гормону на виникнення запального процесу в організмі. Можна припустити, що при розвитку хронічного неспецифічного запалення, яке формується зі збільшенням тривалості ЦД збільшується концентрація прозапальних цитокінів. Це призводить до зростання вмісту лептину, що ми і бачимо у нашому дослідженні. Разом із цим причинно-наслідковий зв'язок потребує подальшого вивчення.

При розподілі пацієнтів із ЦД 2-го типу на групи залежно від наявності ожиріння, надлишкової та нормальної маси тіла, отримано результати, представлені у табл. 3.

Вміст лептину достовірно найнижчий у групі пацієнтів із нормальною масою тіла, що підтверджено багатьма дослідниками. Водночас вміст TNF- α та ІЛ-6 є найвищими у цій самій групі пацієнтів. Ще у 1993 р. були вперше опубліковані відомості, про те, що TNF- α продукується жировими клітинами, бере участь в енергетичному обміні та знижує масу тіла [13].

Також доведено, що ІЛ-6 стимулює оксидацию жирних кислот як у адипоцитах, так і в м'язових клітинах [14]. Ці дані дають



Кореляція між вмістом лептину, цитокінами та індексом маси тіла

Таблиця 2. Вміст (нг/мл) лептину, цитокинів в крові у групах хворих на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу із різною тривалістю захворювання

Групи пацієнтів	Лептин	Туморнекротичний фактор α	Інтерлейкін-2	Інтерлейкін-6
Пацієнти із вперше виявленим ЦД (група 1; n=112)	19,35±1,39 $P_1 < 0,005$	7,82±0,94	6,94±0,94	2,86±0,41
Пацієнти із тривалістю ЦД до 5 років (група 2; n=113)	28,34±2,70	8,29±2,63 $P_4 < 0,05$	6,37±0,28	2,32±0,22
Пацієнти із тривалістю ЦД від 5 до 10 років (група 3; n=46)	33,85±5,58 $P_2 < 0,001$	11,83±2,17 $P_2 < 0,05$	7,51±0,79	6,25±3,90
Пацієнти із тривалістю ЦД понад 10 років (група 4; n=34)	30,10±6,12 $P_3 < 0,05$	8,24±0,83	6,15±0,41	3,03±0,78

змогу припустити, що він є ліполітичним фактором та має здатність знижувати вміст жиру в організмі.

Frankhauser S. із співавт. [15] у моделі на мишах довели, що при тривало підвищеному вмісті ІЛ-6 знижується вміст лептину. Ймовірно це відбувається через зменшення маси жиру. Ці дані підтверджують і отримані нами результати.

Позитивну кореляцію вмісту лептину виявлено у 1-й групі із TNF- α ($r=0,412$, $P=0,036$), у 2-й групі із ІЛ-2 ($r=0,266$, $P=0,016$).

Відомо, що при тривалій глюкозотоксичності та ліпотоксичності виникає метаболічна імуносупресія, яка визначається змінами в Т-клітинній ланці імунітету, що також сприяє виникненню ауто імунності при збільшенні тривалості ЦД 2-го типу [16].

Відповідно, можна припустити, що TNF- α , ІЛ-2 та ІЛ-6 на рівні із лептином сприяють

розвитку гіперглікемії, а надалі ускладненням ЦД 2-го типу [17].

ВИСНОВКИ

1. Найвищий вміст TNF- α , ІЛ-2 та ІЛ-6 спостерігається при тривалості ЦД 2-го типу від 5 до 10 років, що може відігравати свою роль у патогенезі розвитку серцево-судинних ускладнень, які активно прогресують саме у цей період.

2. При ЦД 2-го типу формується новий рівень регуляторних взаємозв'язків, де важливе значення мають зміни у синтезі цитокинів. Розвиток і прогресування цього захворювання тісно пов'язані з порушенням неспецифічної ланки імунітету, що дає підстави розробляти комплексну терапію, спрямовану на пригнічення запалення та синтезу прозапальних цитокинів.

Таблиця 3. Вміст (нг/мл) лептину, цитокинів в крові у групах хворих на цукровий діабет 2-го типу із нормальною надлишковою масою тіла та ожирінням

Групи пацієнтів з різним індексом маси тіла (ІМТ)	Лептин,	Туморнекротичний фактор α	Інтерлейкін-2	Інтерлейкін-6
Пацієнти із ІМТ до 24,9 кг/м ² (група 1; n=43)	6,39±1,15 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,0001$	11,37±3,77 $P_2 < 0,05$	6,82±0,84	10,12±6,91 $P_2 < 0,01$
Пацієнти із ІМТ до 29,9 кг/м ² (група 2; n=88)	19,35±2,61 $P_3 < 0,0005$	8,81±0,71	6,69±0,38	2,46±0,29
Пацієнти із ІМТ понад 30 кг/м ² (група 3; n=174)	33,25±2,26	7,68±0,45	6,10±0,30	2,67±0,27

Б.Н. Маньковский, А.М. Урбанович

СОДЕРЖАНИЕ ЛЕПТИНА КРОВИ И АКТИВНОСТЬ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА С РАЗНОЙ МАССОЙ ТЕЛА И ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ПРОЦЕССА

Основные исследования последних годов направлены на изучение роли гормонов жировой ткани, среди которых одним из основных является лептин, и маркеров генерализованного неспецифического воспаления интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-2, ИЛ-6 и туморнекротического фактора α (TNF- α), в патогенезе развития сахарного диабета (СД) и его осложнений. Установлено, что при длительности этого заболевания от 5 до 10 лет наблюдается самое высокое содержание лептина и цитокинов, а именно в этот период происходит формирование сердечно-сосудистых осложнений. Следует отметить, что содержание лептина достоверно ниже у пациентов с нормальной массой тела, в то время, как содержания ИЛ-6 и TNF- α самые высокие у этой группы больных. Очевидно, именно повышенное содержание этих цитокинов позволяет сохранить нормальную массу тела таким пациентам. Несмотря на тот факт, что СД 2-го типа считается не аутоиммунным заболеванием, известно, что при длительной глюкозотоксичности и липотоксичности возникает метаболическая иммуносупрессия, которая ведет к изменениям в Т-клеточном звене иммунитета, что приводит к развитию аутоиммунитета. Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типу, лептин, интерлейкин-2, интерлейкин-6, туморнекротический фактор α .

В. Mankovsky, A. Urbanovych

THE BLOOD LEPTIN CONTENT AND THE ACTIVITY OF THE ZONAL SYSTEM RESPONSE IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2 WITH DIFFERENT BODY WEIGHT AND DISEASE DURATION

Recent studies focused on the adipose tissue hormones role, especially leptin as one of the basic and generalized nonspecific inflammation markers among them. Some of the major markers are IL-2, IL -6 and TNF- α , in the pathogenesis of diabetes (DM) and its complications. It is established that patients with type 2 diabetes lasting from 5 to 10 years represent the highest leptin and cytokines levels, and during this period cardiovascular complications of type 2 diabetes are formed. Also it is found that the leptin level was significantly lower in patients with normal body weight, while the levels of IL-6 and TNF- α are the highest in these patients. Obviously, the increased level of these cytokines helps to maintain a normal body weight in these patients. Despite the fact that type 2 diabetes is considered a non-autoimmune disease, it is known that for a long glucose toxicity and lipotoxicity metabolic immunosuppression occurs, which causes changes in T-cell immunity, and consequently to autoimmunity.

Львів. мед. ун-т
E-mail: alinaur@dr.com

Key words: diabetes mellitus, leptin, interleicin.

Lviv Medical University.

REFERENCES

1. Donath MY., Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11(2):98-07.
2. Herder C, Haastert B, Muller-Scholze S. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). *Diabet.* 2005;54(2):11-7.
3. Su SC, Pei D, Hsieh CH. Circulating proinflammatory cytokines and adiponectin in young men with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2011;48(2):113-19.
4. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1793-01.
5. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008; 14 (3-4): 222-31.
6. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: Exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 996-03.
7. Maruyama I., Nakata M., Yamaji K. Effect of leptin in platelet and endothelial cells. *Obesity and arterial thrombosis.* *Ann.NY Acad. Sci.* 2000; 902: 315-9.
8. Coppack S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60:349-56.
9. Sopasaki VR, Sandqvist M, Gustafson B. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes. Res.* 2004;12:454-60.
10. Kopitsa NP. TNF- α : impact on the incidence of recurrent myocardial infarction and sudden cardiac death. *Zaporozh Med J.* 2004; 3(24):14-6. [Russian].
11. Volkov VI, Strona VI. Diseases of the cardiovascular system in women. Kyiv: Chetverta hvylya; 2011. [Russian].
12. Arhipova SV, Zorin NA, Yankin MY. The levels of cytokines and acute phase reactants of inflammation in myocardial infarction in men. *Clinicheskaya Medicina.* 2009;12:20-7. [Russian].
13. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor: direct role in obesity - linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259:87 - 91.
14. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005; 288:155-62.
15. Frankhauser S, Elias I, Sopakis VR. Overexpression of Il-6 leads to hyperinsulinemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetol.* 2008; 51:1306-16.
16. Sugano M, Koga T, Yamada K. Lipids and immunology. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 2000; 9: 146-52.
17. Baumann H, Morella K K, White D W et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:8374-8.

Матеріал надійшов до редакції 25.11.2013

Л.М. Гуніна, Ю.Д. Вінничук

Тканинна гіпоксія і асоційовані з нею зміни гомеостазу при вібраційних навантаженнях у спортсменів

Вивчали ефективність та механізми впливу на фізичну працездатність спортсменів-веслувальників вібраційних навантажень у режимі «вібрація всього тіла» (WBV) з частотою 50 Гц, амплітудою 30 мм і часом роботи 30 хв після кожного стандартного тренувального заняття протягом 3 тиж. Встановлено, що WBV викликають виникнення гіпоксії, що підтверджується зростанням у сироватці крові спортсменів вмісту індукованого гіпоксією фактора 1 α (HIF-1 α) з $0,89 \pm 0,03$ на початку до $1,31 \pm 0,01$ нг \times мл $^{-1}$ на момент закінчення дослідження, що суттєво вище, ніж у контролі ($1,04 \pm 0,02$ нг \times мл $^{-1}$). Водночас активується такий HIF-1 α -залежний процес, як еритропоєз: вміст еритроцитів збільшується на кінець дослідження з $5,01 \pm 0,23 \times 10^{12}$ до $6,04 \pm 0,11 \times 10^{12}$ \cdot л $^{-1}$ (у контролі до $5,23 \pm 0,12 \times 10^{12}$ \cdot л $^{-1}$). Інтенсифікація ангиогенних стимулів під впливом гіпоксії проявляється достовірним підвищенням (до $62,3 \pm 6,8$ нг \times мл $^{-1}$) у сироватці крові вмісту фактора росту ендотелію судин (VEGF) майже удвічі щодо вихідних значень. Показано, що вібраційні навантаження не сприяють виникненню окисного стресу, який є відомим ерголітичним фактором (знижує фізичну працездатність), а, навпаки, активують неферментативну ланку власної антиоксидантної системи, що виражається у зростанні вмісту відновленого глутатіону в клітинних мембранах. Встановлено також зниження вираженості ендогенної токсичності та покращення гуморального імунітету та, як наслідок – підвищення показників фізичної працездатності і змагальної діяльності спортсменів. Ключові слова: фізична працездатність, тканинна гіпоксія, ангиогенез, еритропоєз, окисний стрес, клітинні мембрани, гуморальний імунітет.

ВСТУП

Проблема стимуляції фізичної працездатності є однією з центральних у системі підготовки спортсменів. Крім суто тренувальних засобів використовуються різноманітні фармакологічні та нефармакологічні ергогенні, тобто чинники, які стимулюють фізичну працездатність [1]. До останніх належить і вібраційне навантаження, оскільки воно вважається самим універсальним і характерним механічним впливом серед відомих ергогенних чинників. Відносно новою технікою підвищення ефективності тренувального процесу є застосування вібрації усього тіла (WBV – від англ. Whole Body Vibration) [2]. Вібрація – фізичний стрес, який викликає

різноманітні нейровегетативні і соматичні реакції в організмі людини, а її біологічні ефекти можуть бути зумовлені як прямою дією на клітини і субклітинні структури, так і опосередкованою – через нейрогуморальні та нейрорефлекторні механізми [2]. Залежно від частоти коливань (від 10–15 до 15–50 Гц) вібрація спричиняє різний вплив на організм спортсмена, а саме, викликає збільшення поглинання кисню тканинами, оксигенації крові та м'язів, локальної і загальної циркуляції крові, а також активує м'язові ферменти, підвищує збудливість центральної нервової системи і артеріальний тиск [3]. Отже зрозуміло, що фізіологічну реакцію біологічної системи на зовнішні подразники

© Л.М. Гуніна, Ю.Д. Вінничук

слід розцінювати як наслідок процесів, які відбуваються на клітинному рівні.

Відомо, що вібротренінг подібний до умов середньогір'я, де найважливішим фактором впливу на організм спортсменів є тканинна гіпоксія, яка виникає при зниженні парціального тиску кисню в навколишньому середовищі [4]. Середньогірська підготовка є надзвичайно ефективним позатренувальним засобом зростання фізичної працездатності, але разом з тим вимагає адаптації організму до висотної гіпоксії і також є досить витратною з економічної точки зору. До того ж в умовах середньогір'я водночас з гіпоксією у спортсменів виникає окисний стрес, дія якого переважно носить ерголітичний характер [5].

Відомостей про вібраційно-індуковані ефекти у спорті вищих досягнень у науковій літературі замало [2], особливо про використання WBV, а дослідження стосовно механізмів впливу на організм цих методів стимуляції працездатності та прискорення проходження відновних процесів переважно лише констатують наявність ергогенної дії. У зв'язку з цим існує потреба у проведенні поглиблених медико-біологічних досліджень із застосуванням сучасних технологій, що розкривають механізми впливу вібраційних вправ на фізичну працездатність спортсменів. Це, з нашої точки зору, можливо лише за умов знання мішеней дії засобу та адекватної оцінки реакції організму, зокрема метаболічних змін, що виникають в організмі при використанні запропонованого методу стимуляції фізичної працездатності.

Метою нашої роботи було визначення механізмів реалізації впливу вібраційних навантажень на фізичну працездатність спортсменів.

МЕТОДИКА

Для моделювання вібраційних навантажень у режимі WBV було застосовано спіральновихровий тренажер (СВТ) «ПЛН-9051» (виробник «НПК ВТУЗ», Україна); частота – 50

Гц, амплітуда – 30 мм, час роботи – 30 хв. Рух платформи СВТ здійснювався в горизонтальній (обертальні рухи за годинниковою стрілкою) і вертикальній площині (зверху вниз і назад), створюючи поштовховий момент.

У дослідженнях брали участь 19 кваліфікованих (майстри спорту та кандидати у майстри спорту) веслувальників на байдарках і каное, тобто представники циклічних видів спорту з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності. Середній вік спортсменів-чоловіків становив $20,3 \pm 2,6$ років. Обстежених за методом випадкової вибірки було розділено на дві групи (основна – 10 осіб, контрольна – 9). До основної групи увійшли спортсмени, що впродовж обраного терміну дослідження (21-добовий мезоцикл періоду безпосередньої підготовки до змагань) займалися на СВТ у вищевказаному режимі після кожного стандартного тренувального заняття. До контрольної групи увійшли спортсмени, що тренувались у таких самих умовах, але без додаткових вібраційних навантажень.

Показники гематологічного гомеостазу оцінювали за допомогою автоматичного аналізатора «ERMA-PCE 210» («ERMA Ltd.», Японія) із використанням аутентичних витратних і контрольних матеріалів. Визначали кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, вміст загального та внутрішньоеритроцитарного гемоглобіну, гематокрит, середній об'єм еритроцитів, анізоцитоз.

Крім того, для оцінки метаболічних зрушень проведено біохімічні, імунологічні та імуноферментні дослідження. Останні включали, по-перше, визначення вираженості тканинної гіпоксії за вмістом у сироватці крові HIF-1 α із застосуванням стандартних наборів «Abscam» (США) і, по-друге, оцінку активності процесу ангиогенезу за вмістом VEGF із застосуванням наборів «Sigma» (США) за допомогою фотометра «Sunrise» («Tescan», Австрія)

Вміст імуноглобулінів (Ig) класів A, G, M досліджували імунотурбодиметричним методом із використанням наборів «Вектор-Бест»

(Росія) на біохімічному аналізаторі «Humanalyzer-3000» («Human», Німеччина). Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) визначали за класичним методом Haskova та співавт. [6].

Біохімічні дослідження про-антиоксидантної рівноваги (ПАР) у мембранах клітин проводили, використовуючи мембранні оболонки («тіні») еритроцитів, отриманих при гіпоосмотичному гемолізі [7]. Оцінку ПАР здійснювали за рівнем активності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) відповідно до змін вмісту одного з ТБК-активних продуктів – малонового діальдегіду (МДА) із спектрофотометричним визначенням різниці поглинання при довжинах хвиль 532 і 580 нм [8] та ступеня антиоксидантного захисту за рівнем одного з основних природних антиоксидантів – відновленого глутатіону, що відображає активність неферментативної ланки антиоксидантної системи, після інкубації еритроцитарної суспензії з реактивом Елмана при вимірюванні оптичної густини утвореного продукту реакції (тіонітрофенільні аніони) при довжині хвилі 412 нм [9]. За відношенням вмісту МДА до вмісту відновленого глутатіону розраховували про-антиоксидантний коефіцієнт ($K_{\text{па}}$).

Ступінь ендогенної інтоксикації визначали як концентрацію середньомолекулярних пептидів (СМП) у сироватці крові після осадження білків за допомогою 1,0 N розчину трихлороцтової кислоти при довжині хвилі 254 нм [10]. Спектрофотометричні вимірювання здійснювали на спектрофотометрі «PU-65» («Becton Dickinson», США).

Результати обробляли статистично із використанням комп'ютерної ліцензійної програми GraphPadInStat (США), виражаючи середні значення та похибку як $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$. Відповідність отриманих результатів нормальному закону розподілу перевіряли за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для визначення статистичної значимості різниці між показниками вибірок використовували критерій t Стьюдента [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що застосування вібраційних навантажень порівняно з контролем супроводжуються активацією еритропоезу. Це виражається у достовірному зростанні кількості еритроцитів, вмісту загального та внутрішньоеритроцитарного гемоглобіну у спортсменів-веслувальників основної групи (табл. 1). Важливим відображенням прискорення процесу еритропоезу є також зниження середнього об'єму еритроцитів, яке вказує на появу в циркуляції значної кількості «молодих» еритроцитів, що мають менший порівняно з більш зрілими клітинами об'єм, та збільшення гематокриту, тісно пов'язаного зі зростанням кількості червоних клітин крові.

Порівняно з контролем під впливом вібраційних навантажень суттєво знижується кількість лейкоцитів. Це, на нашу думку, зумовлено прискоренням швидкості кровообігу та елімінацією з судинного русла накопиченої під час тренувань молочної кислоти, котра, як відомо, спричиняє активацію лейкопоезу некомпенсаторного характеру. Достовірних змін кількості тромбоцитів, які в основному формують агрегаційний потенціал крові та подальше гальмування швидкості кровообігу [12], у зв'язку зі значними індивідуальними коливаннями показника, не встановлено (табл. 1).

Далі було показано, що, по-перше, застосування вібраційних навантажень після стандартних тренувальних занять позитивно впливає на ПАР, зокрема на субклітинному рівні – вміст МДА у мембранах еритроцитів знижується до 75,8 % щодо контрольних значень. По-друге, покращується також антиоксидантний захист, що характеризується зростанням вмісту відновленого глутатіону зі зниженням $K_{\text{па}}$ більш ніж удвічі порівняно з контролем. Також відмічено поліпшення структурно-функціонального стану мембран клітин з суттєвим зниженням їх сорбційної здатності (табл. 2).

Ймовірно, зазначені процеси можуть покращувати функціонування мембранозв'язаних

Таблиця 1. Вплив вібраційних навантажень на зміни гематологічного гомеостазу спортсменів

Показники	Здорові нетреновані особи-донори (n=10)	Спортсмени		
		разом до початку дослідження (n=19)	контроль-на група по закінченні дослідження (n=9)	основна група по закінченні дослідження (n=10)
Лейкоцити, $\times 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$	4,66 \pm 0,21	4,21 \pm 0,50	8,75 \pm 0,9*	5,26 \pm 0,7* **
Еритроцити, $\times 10^{12} \cdot \text{л}^{-1}$	4,42 \pm 0,25	5,01 \pm 0,23***	5,23 \pm 0,12	6,04 \pm 0,11*, **
Гемоглобін, г \cdot л $^{-1}$	134,25 \pm 5,7	148,2 \pm 4,3	142,6 \pm 3,4	159,7 \pm 2,6*, **
Гематокрит, %	44,8 \pm 1,4	47,1 \pm 0,7***	44,6 \pm 0,5*	49,2 \pm 0,4**
Середній об'єм еритроцита, фл	79,6 \pm 2,1	90,6 \pm 2,4***	88,7 \pm 1,6	82,9 \pm 1,3*, **
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	23,6 \pm 0,7	24,5 \pm 0,8	27,6 \pm 0,9*	31,8 \pm 1,1*, **
Анізоцитоз, %	13,9 \pm 2,6	14,5 \pm 1,3	18,8 \pm 1,8*	14,2 \pm 0,8**
Тромбоцити, $\times 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$	258,0 \pm 56,7	220,0 \pm 13,6	199,0 \pm 21,4	204,0 \pm 14,8

Примітки. Тут і в табл. 2, 3: * P < 0,05 порівняно зі значеннями до початку дослідження; ** P < 0,05 порівняно зі значеннями в контрольній групі; *** P < 0,05 порівняно зі значеннями у донорів.

ферментів, до яких належать і трансмембранні. Останнім властиві такі характеристики: каталітична активність щодо спряжених реакцій на протилежних боках мембрани (в першу чергу, окисно-відновні ферменти), беруть участь у переносі речовин (АТФ-ази), функціонування електронно-транспортних ланцюгів (P450 і цитохром b₅), використання

мембранних (фосфоліпази, гліколіпази) і водорозчинних субстратів (ацетилхолінестераза, ферменти гідролізу складних вуглеводів), утворення мембранозв'язаного комплексу для полегшення каналізації субстрату (ферменти циклу Кребса), здійснення човникових переміщень між цитозолем і мембраною та ін. [13, 14]. Тобто практично усі найваж-

Таблиця 2. Вплив вібраційних навантажень на показники прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і структурно-функціонального стану клітинних мембран

Показники	Здорові нетреновані особи-донори (n=10)	Спортсмени		
		разом до початку дослідження (n=19)	контроль-на група по закінченні дослідження (n=9)	основна група по закінченні дослідження (n=10)
Малоновий діальдегід, нмоль $\times 10^6$ еритроцитів	3,67 \pm 0,10	5,21 \pm 0,12***	5,99 \pm 0,13*	4,54 \pm 0,09*, **
Відновлений глутатіон, 10 $^{-12}$ ммоль \times еритроцит $^{-1}$	1,63 \pm 0,11	2,19 \pm 0,10***	2,06 \pm 0,13	3,66 \pm 0,17*, **
Про-антиоксидантний коефіцієнт, ум. од.	2,00 \pm 0,02	2,38 \pm 0,02***	2,91 \pm 0,05*, **	1,28 \pm 0,04*, **
Сорбційна здатність еритроцитів, %	21,6 \pm 1,4	36,07 \pm 2,08***	37,9 \pm 2,05*	24,4 \pm 1,11*, **

лівіші метаболічні зрушення в організмі, що каталізуються ферментами, залежать від структурно-функціонального стану клітинних мембран, оскільки останній виступає як регулятор активності та збереження четвертинної структури ензимів [15, 16]. Таким чином, згідно з даними сучасної літератури, встановлене нами під впливом вібраційних навантажень покращення структурно-функціонального стану мембран є тією первинною ланкою, яка відповідає за майже всі подальші метаболічні перетворення, що лежать в основі адаптаційних реакцій та є підґрунтям для зростання фізичної працездатності.

Показано, що вібраційні навантаження викликають в організмі, подібно до умов середньогір'я, позитивний вплив на показники гематологічного гомеостазу, зокрема, на еритроцитарну ланку [17]. Тому цілком логічно було прослідкувати, чи змінює вібрація активність HIF-1 α , який є провідним чинником активації ендogenous еритропоєтину як в умовах гіпоксії, так і під час тренувальних навантажень [18, 19]. Крім того, зважаючи на дані літератури, які свідчать про важливу роль у формуванні метаболічного адаптаційного потенціалу організму спортсмена та

зростанні працездатності таких факторів, як ангиогенез і стан імунітету [20, 21], нами було досліджено вміст у сироватці крові фактора росту ендотелію судин (VEGF), імуноглобулінів різних класів (A, M, G) і циркулюючих імунних комплексів (ЦІК).

Було встановлено, що застосування вібраційних навантажень за вказаною технологією супроводжується значним зростанням концентрації VEGF у сироватці крові спортсменів по закінченні мезоциклу, що свідчить про активацію процесів ангиогенезу. Разом з тим відмічено різноспрямовані зміни показників імунітету: достовірне зростання вмісту IgG, який відповідає за наявність тривалого гуморального імунітету, тенденція до підвищення вмісту IgA і IgM, що забезпечують місцевий і первинний імунітет у відповідь на гостру інфекцію та зниження вмісту ЦІК, що відображає розвиток запальних процесів в організмі (табл. 3).

Отримані результати свідчать, що активація процесів ангиогенезу та еритропоєзу за умов WBV відбувається паралельно. Фізіологічний ангиогенез, який відображає швидкість утворення і росту кровеносних судин, в першу чергу, мікроциркуляторного русла,

Таблиця 3. Вплив гіпоксичного стану, асоційованого з вібраційними навантаженнями, на показники активності ангиогенезу та імунного захисту спортсменів

Показники	Здорові нетренувані особи-донори (n=10)	Спортсмени		
		разом до початку дослідження (n=19)	контрольна група по закінченні дослідження (n=9)	основна група по закінченні дослідження (n=10)
Індукований гіпоксією фактор-1 α , нг·мл ⁻¹	0,78 \pm 0,04	0,89 \pm 0,03***	1,04 \pm 0,02*	1,31 \pm 0,01*, **
Фактор росту ендотелію судин, пг·мл ⁻¹	27,6 \pm 11,2	32,7 \pm 4,7	43,5 \pm 4,9*	62,3 \pm 6,8*, **
Імуноглобуліни класів, мг·л ⁻¹ :				
A	1685 \pm 112	1850 \pm 98***	1720 \pm 101	1940 \pm 87
G	11,4 \pm 4,2	16,2 \pm 2,8	12,1 \pm 2,0*	18,6 \pm 1,9**
M	1496 \pm 134	1786 \pm 101	1650 \pm 112	1788 \pm 96
Циркулюючі імунні комплекси, ум. од.	25,7 \pm 4,7	56,7 \pm 4,3***	66,5 \pm 4,8*	50,6 \pm 4,9**

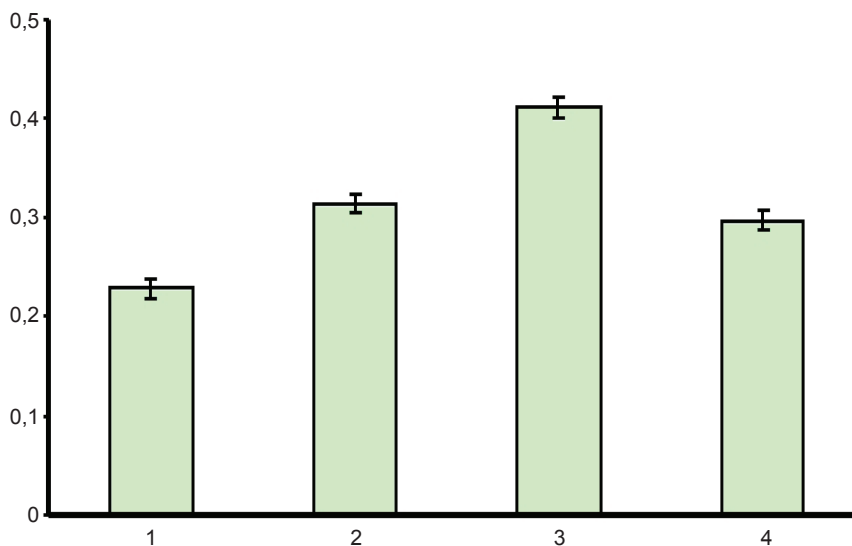
як відомо, активується в умовах тканинної гіпоксії [22] та віддзеркалює прискорення пристосувальних реакцій до зростаючого навантаження і збільшення кількості еритроцитів у разі тканинної гіпоксії, яка виникає [18], наприклад, під час тренувань в умовах середньогір'я [23].

При вивченні вираженості ендогенної інтоксикації, притаманної фізичним навантаженням [24], показано, що вміст її загальноприйнятих маркерів (середньомолекулярних пептидів) зменшується у спортсменів основної групи по закінченні курсу вібраційних тренувань (рисунок), що свідчить про зниження ступеня ендотоксикозу під впливом WBV. Про зменшення токсичного впливу фізичних навантажень свідчить і зниження вмісту ЦІК у сироватці крові, зафіксоване в наших дослідженнях, яке можна пояснити процесом елімінації з організму спортсменів токсичних речовин [25].

У разі вібраційних навантажень активується еритропоез, пришвидшується ріст нових кровеносних судин, поліпшується киснетранспортна функція крові через активацію

стовбурових еритроїдних клітин, а також імунний захист, що характерно для гіпоксичного стану [26] без виникнення додаткового окисного стресу, а, навпаки, зі зниженням його вираженості. Це узгоджується з останніми даними наукової літератури [27]. Оскільки всі ці зміни є залежними від вираженості гіпоксії, було проаналізовано вміст HIF-1 α у сироватці крові спортсменів у динаміці дослідження. Показано, що порівняно з результатами, отриманими у нетренованих осіб, вміст HIF-1 α у спортсменів до початку досліджень є вищим на 14,0 % (табл. 3). По закінченні досліджень в обох групах спортсменів спостерігається подальше збільшення концентрації цього показника – на 16,8 % у контролі та на 47,2 % у спортсменів основної групи. Тобто вібраційні навантаження спричиняють суттєве зростання вираженості гіпоксії, що накладається на зміни, зумовлені суто тренувальним процесом. Усі описані вище зміни гомеостатичних показників є асоційованими з гіпоксією, що підтверджується даними літератури [18, 22, 27], та прямо або опосередковано впливають на стимуляцію фізичної працездатності.

Вміст середньомолекулярних пептидів, ум. од.



Вплив вібраційних навантажень на вираженість ендогенної інтоксикації в спортсменів у динаміці дослідження: 1 – здорові нетреновані особи (донори), 2 – спортсмени до початку дослідження, 3 – спортсмени контрольної групи по закінченні дослідження, 4 – спортсмени основної групи по закінченні дослідження

Прямий вплив на фізичну працездатність можна пояснити нормалізацією ПАР на рівні клітинних мембран еритроцитів, оскільки це також супроводжується поліпшенням киснетранспортної функції крові [28]. Активізація власної антиоксидантної системи призводить до покращення кількісної та якісної характеристик клітинних мембран, що опосередковано, через зниження ендогенної токсичності та оптимізацію роботи численних мембранозв'язаних ферментів, стимулює пристосувальні реакції організму до фізичних навантажень. Слід зауважити, що зниження ендогенної токсичності є фактором нормалізації імунної реактивності, скорочувальної функції міокарда, функціонального стану альвеолярного матриксу [29, 30] і супроводжується збільшенням значень показників, які характеризують резерви респіраторної системи, що також сприяє стимуляції фізичної працездатності спортсменів. Отримані у нашому дослідженні результати стосовно покращенням функціонування гуморальної ланки імунітету, що асоціюються зі зростанням вираженості тканинної гіпоксії, також збігаються з даними інших дослідників [31].

Додатковим чинником зростання фізичної працездатності є антиоксидантний вплив вібраційних навантажень у режимі WBV, оскільки переважна більшість дослідників вважає, що розвиток окисного стресу негативно позначається на ергогенних властивостях організму [32–34]. Дуже важливим є те, що тканинна гіпоксія, яка виникає під час вібраційних навантажень, на відміну від раніше сталих уявлень, нині не вважається обов'язково асоційованою з окисним стресом [27], що спостерігається й у нашому дослідженні.

Підтвердженням позитивного впливу вібраційних навантажень на фізичну працездатність спортсменів при моделюванні змагальної діяльності на веслувальному тренажері «Concept» є покращення її показників. Так, при застосуванні WBV у членів основної групи час проходження змодельованої змагальної дистанції (500 м) зменшується

в середньому на 26,28 %. Позитивні зміни відмічені й у значенні середньої потужності при проходженні змагальної дистанції – зі $193,06 \pm 0,07$ до $195,62 \pm 0,06$ Вт ($P < 0,05$). Це відображає загальну картину поліпшення параметрів змагальної діяльності спортсменів, які спеціалізуються у веслуванні на байдарках і каное, під впливом вібраційних навантажень у режимі WBV.

Таким чином, згідно з отриманими результатами, вібраційні навантаження у режимі WBV аналогічні гіпоксичним умовам тренувань, проте без виникнення окисного стресу, як це спостерігається у середньогір'ї, і можуть використовуватися з тією самою метою – для покращення адаптаційних механізмів та зростання фізичної працездатності спортсменів, що спеціалізуються у циклічних видах спорту, а в більш загальному трактуванні – у видах спорту з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення.

ВИСНОВКИ

1. Принципи визначення механізмів розвитку ергогенної дії вібраційних навантажень, які належать до нефармакологічних ергогенних засобів, повинні базуватися на оцінці гомеостатичних факторів стимуляції фізичної працездатності спортсмена, асоційованих зі зростанням вираженості гіпоксичного стану.

2. Вібраційні навантаження в режимі WBV стимулюють еритропоез, що супроводжується покращенням киснетранспортної ланки крові через зростання кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в спортсменів.

3. Вібраційні навантаження активують процеси ангіогенезу, покращують антиоксидантний та імунний захист в організмі спортсмена.

4. Вібраційні навантаження у режимі WBV не спричиняють виникнення окисного стресу, що є додатковим позитивним фактором стимуляції фізичної працездатності спортсменів під час вібротренінгу.

Л.М. Гунина, Ю.Д. Винничук

ТКАНЕВАЯ ГИПОКСИЯ И АССОЦИИРОВАННЫЕ С НЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ВИБРАЦИОННЫХ НАГРУЗКАХ У СПОРТСМЕНОВ: ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ

Изучены эффективность и механизмы влияния на физическую работоспособность спортсменов-гребцов вибрационных нагрузок в режиме «вибрация всего тела» (WBV) с частотой 50 Гц, амплитудой 30 мм и временем работы 30 мин, которые осуществляли после каждого стандартного тренировочного занятия в течение 3 нед. Показано, что WBV вызывают возникновение гипоксии, что подтверждается к моменту окончания исследования ростом в сыворотке крови спортсменов содержания индуцируемого гипоксией фактора 1 α (HIF-1 α) с $0,89\pm 0,03$ до $1,31\pm 0,01$ нг·мл⁻¹, что существенно выше, чем в контроле ($1,04\pm 0,02$ нг·мл⁻¹). Одновременно активируется такой HIF-1 α -зависимый процесс, как эритропоэз: содержание эритроцитов увеличивается к концу исследования до $6,04\pm 0,11\cdot 10^{12}\cdot л^{-1}$ (в контроле только до $5,23\pm 0,12\cdot 10^{12}\cdot л^{-1}$). Интенсификация ангиогенных стимулов под влиянием гипоксии проявляется достоверным ростом в сыворотке крови содержания основного фактора ангиогенеза почти вдвое (до $62,3\pm 6,8$ пг·мл⁻¹) против исходных значений ($32,7\pm 4,7$ пг·мл⁻¹). Показано, что вибрационные нагрузки не способствуют возникновению окисного стресса, который является весомым эрголитическим фактором (снижает физическую работоспособность), а, наоборот, активируют неферментативное звено собственной антиоксидантной системы, что выражается в увеличении содержания восстановленного глутатиона в клеточных мембранах. Установлено также снижение проявлений эндогенной токсичности и улучшение гуморального иммунитета и, как следствие, повышение показателей физической работоспособности и соревновательной деятельности спортсменов. Ключевые слова: физическая работоспособность, тканевая гипоксия, ангиогенез, эритропоэз, окислительный стресс, клеточные мембраны, гуморальный иммунитет.

Л.М. Gunina, J.D. Vynnychuk

TISSUE HYPOXIA AND RELATED CHANGES OF HOMEOSTASIS DURING VIBRATION LOAD IN ATHLETES: INFLUENCE ON PHYSICAL PERFORMANCE

We explored the efficacy and the mechanisms of influence on physical performance of vibratory loads in the “whole body vibration” (WBV) at a frequency of 50 Hz, amplitude of 30 mm and a running time of 30 minutes, which was performed after each standard training sessions in athletes for 3 weeks. WBV vibration causes an occurrence of hypoxia, as evidenced by the end of the study the serum growth athletes content HIF-1 α with 0.89 ± 0.03 to 1.31 ± 0.01 ng \times ml⁻¹, which is substantially higher

than in control (1.04 ± 0.02 ng \times ml⁻¹). Simultaneously, it is activated such a HIF-1 α -dependent process as erythropoiesis: the contents of red blood cells increases at the end of the study to $6.04\pm 0.11\times 10^{12} l^{-1}$ (control only to $5.23\pm 0.12\times 10^{12}\times l^{-1}$). Intensification of angiogenic stimuli under the influence of hypoxia is manifested by a significant two times increase in the serum levels of the main angiogenesis factor VEGF (to 62.3 ± 6.8 pg \times ml⁻¹, from the control level of 32.7 ± 4.7 pg \times ml⁻¹). Vibration loads are accompanied by a lack of oxidative stress, an important ergolytic factor. In contrast, they activate non-enzymatic antioxidant system unit, resulting in an increase in the content of reduced glutathione in the cell membranes. We detected a reduction in endogenous toxicity and improvement of humoral immunity and, as a result, an improvement of physical performance in athletes.

Key words: physical performance, tissue hypoxia, angiogenesis, erythropoiesis, oxidative stress, cell membranes, humoral immunity.

National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Mikheev AA. Theory and methods of vibration training in sport (biological and pedagogical rationale dosed of vibrotrening). Monograph. M.: Sov. sport; 2011. [Russian].
2. Issurin VB. Vibrations and their applications in sport: a review. J Sports Med Phys Fitness 2005; 45:324-36.
3. Vorobieva VV. Vibration model for hypoxic type of cell metabolism evaluated on rabbit cardiomyocytes. Bull Exp Biol Med. 2009; 147(6):768-71.
4. Baykovsky YV. Determining factors of the athlete training at altitude and midlands. M.: TVT Division; 2010. [Russian].
5. Földes-Papp Z, Domej W, Demel U, Tilz GP. Oxidative stress caused by acute and chronic exposition to altitude. Wien Med Wochenschr 2005;155(7-8):136-42. PMID: 24482580.
6. Olishovsky CV. Role of the immune system in maintaining health and adaptive capabilities of athletes. Sports Medicine. 2010; (1-2):47-56. [Russian].
7. Semko GA. Structural and functional changes in the external membranes and membranous layers of erythrocytes at hyperepidermopoiesis. Ukr Biochem J. 1998;70:113-8. [Russian].
8. Bankova VV. The method for evaluating the plasma membrane lesions in children with various diseases. Pathol Physiol and Exp Therapy. 1987; (3):78-81. [Russian].
9. Shvets NI. Age features of changes in glutathione system of rat heart during immobilization stress. Ukr Biochem J. 2008; 80(6):74-8. [Russian].
10. Kishkun AA, Kudinova AC, Ofitova AD, Mishurin RB. Importance of middle molecules in assessing the level of endogenous intoxication. Mil Med J. 1990; (2):41-44. [Russian].
11. Lang T, Sesik M. How to describe the statistics in

- medicine: a guide for authors, editors and reviewers. M.: Practical Medicine; 2011. [Russian].
12. Watts T, Barigou M, Nash G. Comparative rheology of the adhesion of platelets and leukocytes from flowing blood: why are platelets so small? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Jun 1; 304(11):H1483-94. doi: 10.1152/ajpheart.00881.2012. PMID: 23585130.
 13. Nikitin VP, Kozyrev SA. The selective effect of a protein kinase C inhibitor on synaptic plasticity in defensive behavior command neurons during development of sensitization in the snail. *Neurosci Behav Physiol.* 2004; 34(5):423-30.
 14. Panofen F, Piwowarski T, Jeserich G. Small conductance calcium-activated potassium channels of trout CNS: molecular structure, developmental expression, and partial biophysical characterization. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002; 101(1-2):1-11.
 15. Sircar R, Greenswag A, Bilwes A, Gonzalez-Bonet G, Crane B. Structure and activity of the flagellar rotor protein FliY: a member of the CheC phosphatase family. *J Biol Chem.* 2013; 288(19):13493-502. doi: 10.1074/jbc.M112.445171.
 16. Chai Y, Kim D, Park J. The secreted oligomeric form of α -synuclein affects multiple steps of membrane trafficking. *FEBS Lett.* 2013;587(5):452-9. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.008.
 17. Risso A, Turello M, Biffoni F, Antonutto G. Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells Mol Dis.* 2007;38(2):83-92. PMID: 17188915.
 18. Mounier R, Pialoux V, Cayre A, Schmitt L, Richalet J, Robach P, et al. Leukocyte's Hif-1 expression and training-induced erythropoietic response in swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38(8):1410-7. PMID: 16888453.
 19. Mounier R, Pialoux V, Schmitt L, Richalet JP, Robach P, Coudert J, et al. Effects of acute hypoxia tests on blood markers in high-level endurance athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106(5):713-20. doi: 10.1007/s00421-009-1072-z. PMID: 19430946.
 20. Gunina LM, Lisnyak IA, Burmak VO. Physiological angiogenesis as a factor in adaptation to physical stress athletes with different mechanisms of energy. *Bulletin of Sport Science (RF).* 2013; (3):34-8. [Russian].
 21. Palazón A, Aragónés J, Morales-Kastresana A, de Landá-zuri M, Melero I. Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(5):1207-13.
 22. Wagatsuma A. Effect of aging on expression of angiogenesis-related factors in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2006; 41(1):49-54.
 23. Bärtsch P, Saltin B. General introduction to altitude adaptation and mountain sickness (a review) *Scand J Med Sci Sports.* 2008; Suppl 1:1-10.
 24. Goussetis E, Spiropoulos A, Tsironi M. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2009; 4(2(3)):294-9.
 25. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:22-5.
 26. Serebrovskaya TV, Nikolsky IS, Nikolskaya VV, Mallet RT, Ishchuk VA. Intermittent hypoxia mobilizes hematopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High Alt Med Biol.* 2011 Fall; 12(3):243-52. doi: 10.1089/ham.2010.1086.
 27. McGinnis G, Kliszczewicz B, Barberio M, Ballmann C, Peters B, Slivka D, et al. Acute hypoxia and exercise-induced blood oxidative stress. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2014 Mar 25; [Epub ahead of print] PMID: 24667140.
 28. Bell EL, Chandel NS. Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays Biochem.* 2007; 43:17-27.
 29. Puzhevsky AC, Livshits RI. Kardiodepressivnye agents in the blood of burn patients and evaluation of the effectiveness of their elimination. *Anesthesiology and Reanimath.* 1990; (1):57-9. [Russian].
 30. Anan I, Kiuru-Enari S, Obayashi K, Ranløv P, Ando Y. Investigation of AGE, their receptor and NF-kappaB activation and apoptosis in patients with ATTR and Gelsolin amyloidosis. *Histol & Histopathol.* 2010; 25(6):691-9.
 31. Abellan R, Ventura R, Remacha A, Rodríguez F, Pascual J, Segura J. Intermittent hypoxia exposure in a hypobaric chamber and erythropoietin abuse interpretation. *J Sports Sci.* 2007; 25:1241-50.
 32. Wang J-S, Huang Y-H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol.* 2005; 95:290-1.
 33. Michailidis Y, Jamurtas A, Nikolaidis M, Fatouros I, Koutedakis Y, Papassotiropoulos I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(7):1107-13.
 34. Nikolaidis M, Jamurtas A, Paschalis V, Fatouros I, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008; 38(7):579-606.

І.В. Ференц, І.В. Бродяк, М.Я. Люта, О.Р. Кулачковський, Н.О. Сибірна

Вплив продукту декарбоксілювання L-аргініну на морфофункціональні показники еритронару за умов експериментального цукрового діабету у щурів

У статті наведено результати дослідження впливу продукту декарбоксілювання L-аргініну (агматину) на стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика, кількість і добову продукцію ретикулоцитів і поверхневу архітектуру еритроцитів за умов стрептозотоцинового цукрового діабету у щурів. Показано, що введення агматину тваринам з діабетом призводить до зниження інтенсивності еритропоезу та зростання резистентності еритроцитів до соляної кислоти. Встановлено зростання частки молодих еритроцитів на 10 % і зменшення кількості перехідних форм клітин, які за фізіологічних умов здатні до трансформації у дискоцити, на 35 %. Отримані результати свідчать про покращення морфофункціональних характеристик еритроцитів при діабеті і відображають позитивний вплив агматину на клітини еритронару за рахунок цукрознижувальної дії цього поліаміну. Ключові слова: еритроцити, агматин, експериментальний цукровий діабет.

ВСТУП

Стан хронічної гіперглікемії при захворюванні на цукровий діабет (ЦД) супроводжується різноманітними порушеннями обміну речовин, що призводить до наростання патологічних процесів у клітинах і розвитку діабетичних ускладнень різної етіології. Особлива роль у каскаді цих патологічних змін відводиться порушенням реологічних властивостей крові [1]. Еритроцити становлять 90 % від кількості усіх формених елементів крові, а їхній сумарний об'єм у 50 разів перевищує об'єм лейкоцитів і тромбоцитів. Тому ці клітини є основними факторами, які впливають на в'язкість крові [2–4]. Зважаючи на це, порушення структури та функціональних властивостей еритроцитів є патогенетичною ланкою зміни реологічного статусу крові при ЦД, одного з факторів розвитку діабетичних мікроангіопатій [1, 5, 6].

Індуковані надлишком глюкози зміни в клітинах еритроїдного ряду проявляються в комплексі порушень на молекулярному та

клітинному рівнях: змінюється внутрішньо-клітинний метаболізм еритроцитів, модифікуються компоненти клітинної мембрани та знижується їхня механічна й осмотична стійкість. За умов ЦД популяція еритроцитів периферичної крові характеризується збільшенням вмісту макроцитів, зростанням поліморфізму клітин, появою значної кількості деформованих і гемолізованих форм [1, 6, 7].

Механізмом реалізації негативного впливу гіперглікемії є посилення процесів неферментативного глікозилювання внутрішньо-клітинних і мембранних білків еритроцитів. Зростання частки модифікованого у такий спосіб гемоглобіну зумовлює підвищення спорідненості його молекули до кисню та утруднює віддачу останнього в периферичних тканинах. Це виявляється у погіршенні оксигенації ендотеліоцитів кровоносних судин, що є одним з факторів розвитку ендотеліальної дисфункції, та порушенні газотранспортної функції крові в цілому [8]. Неферментативне приєднання глюкози до мембранних білків (спектрину, білка смуги

3, білка смуги 4.1) призводить до їхньої незворотної структурно-функціональної модифікації. Разом із посиленням процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), неферментативне глікозилювання білкових компонентів еритроцитарної мембрани є причиною порушення стабільності форми та зниження механічної стійкості еритроцитів, посилення їхньої агрегації й адгезії до ендотелію [9, 10]. З іншого боку, надмірне накопичення глюкози в цитоплазмі еритроцитів індукує зміни у внутрішньоклітинному метаболізмі цих клітин. Пригнічення синтезу АТФ в умовах гіперглікемії супроводжується порушенням енергозалежних процесів – підтримання та відновлення дископодібної форми еритроцитів, транспорту катіонів, захисту клітинних компонентів від окиснення [1]. Окрім того, дефіцит АТФ поряд зі зростанням продукції активних форм кисню і активацією пентозофосфатного шунта призводить до зниження активності АТФ-залежних амінофосфоліпід-трансфераз. Такі метаболічні зміни є причиною порушення ліпідної асиметрії плазматичних мембран і екстерналізації фосфатидилсерину у зовнішній фосфоліпідний бішар клітин. Зростання вмісту фосфатидилсерину у зовнішньому бішарі плазматичної мембрани та посилення процесів десіалювання мембранних глікокон'югатів є ознаками старіння еритроцитів та сигналом для їхньої елімінації з кров'яного русла макрофагами селезінки, купферівськими клітинами печінки та макрофагами кісткового мозку [1, 11].

Метою нашої роботи було дослідження впливу агматину – продукту декарбоксілювання L-аргініну, який має гіпоглікемічну дію, на морфофункціональні показники еритроциту за умов експериментального ЦД у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яким забезпечували вільний доступ до їжі та води

і перебування у стандартних умовах віварію. Експерименти проводили згідно з національними “Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), що узгоджуються з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985).

Тварини були поділені на 4 групи. До I контрольної групи ввійшли інтактні щури, до II – тварини, яким вводили агматин. Тваринам III і IV груп моделювали ЦД внутрішньоочередним введенням стрептозотоцину (“Sigma”, США), розчиненого в 10 ммоль/л цитратному буфері (рН 5,5), з розрахунку 60 мг/кг. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали через 72 год після введення препарату. В експерименті використовували тварин із вмістом глюкози понад 14 ммоль/л. Щурам IV групи робили ін'єкцію агматину (“Sigma”, США) у концентрації 20 мг/кг, який вводили протягом 14 діб починаючи з 3-ї доби від моменту індукції діабету.

Забір крові для досліджень проводили з додаванням гепарину (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

Стойкість еритроцитів до кислотного гемолітика визначали за методом Терскова і Гітельсона [12] і характеризували за такими показниками: тривалість гемолізу (хвилини), пік гемолізу еритроцитів (хвилини), максимальна кількість гемолізованих еритроцитів за 0,5 хв (відсотки). Криву часової залежності кількості гемолізованих еритроцитів розділяли на відрізки, на основі чого їх ділили на три групи стійкості: відрізок від 1,5 до 3 хв – еритроцити зі зниженою стійкістю (старі); від 3,5 до 4,5 хв відповідає середньостійким еритроцитам (середнього віку); відрізок від 5 хв характеризує еритроцити із підвищеною стійкістю (молоді). У периферичній крові підраховували кількість і добову продукцію ретикулоцитів [13].

Еритроцити для трансмісійного електронно-мікроскопічного дослідження після відмивання фіксували спочатку 2,5%-м розчином глутаральдегіду, потім 2%-м розчином OsO_4 у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 2 год при 4°C . Після повторної промивки цим буфером еритроцити зневоднювали у зростаючих концентраціях етилового спирту. Зразки наносили на алюмінієву пластинку, висушували, напильовали ультратонким шаром міді. Готові зразки вивчали в скануючому електронному мікроскопі (JEOL JSM-T 220A). У кожному препараті підраховували 1000 клітин і визначали кількісне співвідношення морфологічних форм еритроцитів, використовуючи класифікацію [14, 15].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента і представили їх у вигляді $M \pm m$. Статистично вірогідними вважали відмінності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено типові еритрограми шурів у нормі, за умов ЦД та при введенні тваринам агматину. Метод кислотних еритрограм дає змогу оцінити гідрофобний бар'єр і проникність білкових компонентів мембрани, а також групувати морфологічно однорідні еритроцити на віковій популяції.

Молоді еритроцити характеризуються найвищою стійкістю до дії кислотного гемолітика і займають на еритрограмі праве положення. Старіння еритроцитів супроводжуються поступовим зниженням їхньої резистентності, що на еритрограмі позначається зміщенням кривої вліво. Міра стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу є відображенням функціонально-метаболічного стану клітинної мембрани і зазнає змін не тільки в процесі старіння клітин, а й внаслідок фізико-хімічної модифікації та дестабілізації мембранних компонентів при багатьох патологічних станах [12].

Еритрограма контрольних тварин була одновершинною, що свідчить про відносну однорідність популяції та відповідає нормобластичному типу кровотворення (див. рис. 1). Пік її припадав на 3,5 хв, у цій точці кривої гемолізу зазнало 26 % еритроцитів. Тривалість гемолізу становила 14 хв, при цьому початкові ділянки еритрограми супроводжувалися лише незначним зменшенням оптичної густини, що характеризує передгемолітичні зміни еритроцитів – перехід з дископодібної у сферичну форму.

Розвиток ЦД супроводжувався зменшенням часу сферуляції, що проявлялося у зміщенні еритрограми ліворуч порівняно з нормою. Спостерігали скорочення тривалості гемолізу до 13 хв. Основний пік гемолізу

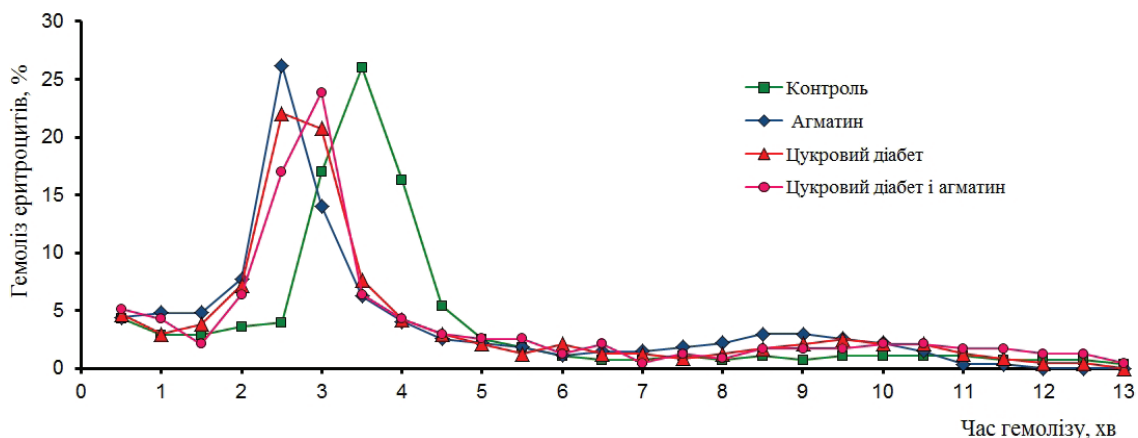


Рис. 1. Типові криві гемолізу еритроцитів під впливом соляної кислоти у нормі, за умов експериментального цукрового діабету та при введенні тваринам агматину

простежувався на 2,5 хв, вміст гемолізованих еритроцитів у цей момент становив 22 % (див. рис. 1). Зниження стійкості популяції еритроцитів до кислотного гемолізу та зростання кількості старих еритроцитів при діабеті (рис. 2) свідчить про наростання інтенсивності мембранодеструктивних процесів. Особливу роль у структурно-функціональній модифікації еритроцитарних мембран і зміні їхніх фізико-хімічних властивостей за умов цієї патології відіграє активація ПОЛ [16]. Накопичення цитотоксичних продуктів ПОЛ супроводжується зміною пластичних властивостей клітинної мембрани та збільшенням її ригідності [9, 10]. З іншого боку, інтенсифікація поліолового шляху розпаду глюкози призводить до накопичення в клітинах осмотично активних метаболітів – сорбітолу та фруктози, що сприяє набряку та зниженню осмотичної стійкості еритроцитів, впливаючи на показники гемолізу [7, 17].

При введенні агматину тваринам II групи спостерігали скорочення тривалості гемолізу до 12 хв, що супроводжувалося зменшенням часу сферуляції та зміщенням еритрограми

вліво порівняно з контролем. Найбільша частка популяції еритроцитів (26 %) гемолізувала на 2,5 хв після внесення соляної кислоти. Виявлені зміни показників кислотного гемолізу свідчать про зростання в загальному пулі еритроцитів кількості клітин із зниженою резистентністю (див. рис. 2). Це може бути зумовлене пришвидшенням старіння еритроцитів при введенні агматину.

У тварин з ЦД ін'єкція агматину (IV група) призводила до незначного зсуву піку еритрограми праворуч (з 2,5 на 3,0 хв) порівняно з тваринами, яким його не вводили (III група). Кількість гемолізованих еритроцитів у цій точці (24 %) достовірно не змінювалася, а тривалість гемолізу збільшувалася до 14,5 хв. Часткове зростання резистентності еритроцитів у цій дослідній групі відбувається внаслідок збільшення кількості молодих і зниження старих клітин у популяції (див. рис. 2). У наших попередніх дослідженнях показано, що введення тваринам з ЦД протягом 14 днів агматину призводить до зниження вмісту глюкози в крові до фізіологічних значень – з 18,0 до 4,5 ммоль/л. [18]. Тому ми припуска-

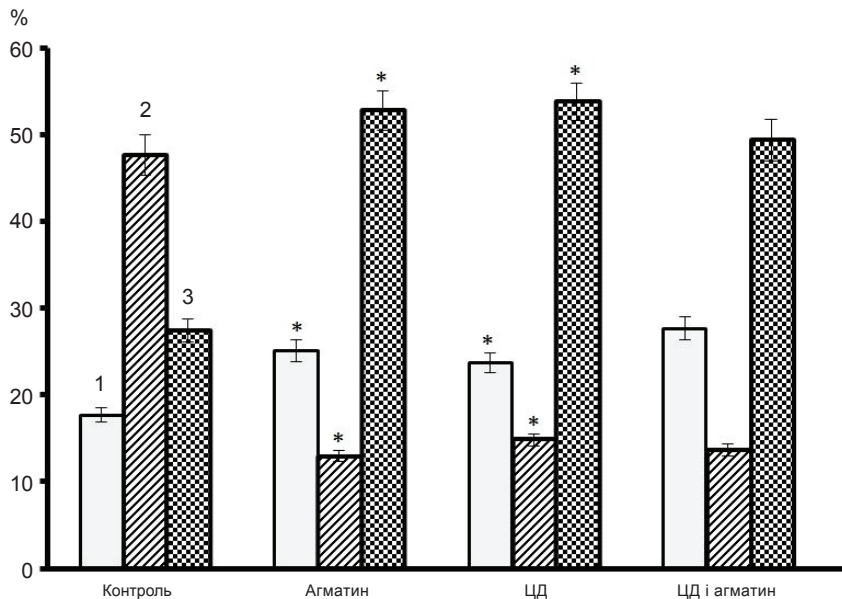


Рис. 2. Розподіл еритроцитів на віковій популяції (залежно від стійкості клітин до соляної кислоти): 1 – молоді еритроцити, 2 – еритроцити середнього віку, 3 – старі еритроцити. * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями у тварин з експериментальним цукровим діабетом (ЦД)

ємо, що покращення функціонального стану еритроцитів у тварин з ЦД у відповідь на введення агматину є результатом нормалізації вмісту глюкози в крові і зниження негативного впливу глюкозотоксичності на ці клітини.

На наступному етапі роботи для дослідження інтенсивності еритропоезу підраховували кількість ретикулоцитів і їхню добову продукцію. Показано, що при ЦД у щурів ці показники достовірно збільшуються (табл. 1). Посилення інтенсивності еритропоетичної функції кісткового мозку при діабеті є компенсаторною реакцією, спрямованою на збільшення кисневої ємності крові [16]. Проте збільшення кількості ретикулоцитів на фоні зниження стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу (див. рис. 1) свідчить про вихід у кровотік функціонально неповноцінних клітин, зі зміненим ліпідним і білковим складом клітинної мембрани та зі зниженою резистентністю, що підтверджується літературними даними [19].

На фоні введення агматину тваринам II групи результати добової продукції ретикулоцитів вказують на те, що проліферативна активність червоного ростка кровотворення не зазнає змін. Зменшення кількості ретикулоцитів у периферичній крові контрольних тварин під впливом агматину є непрямою ознакою пришвидшеного їх дозрівання і перетворення в еритроцити. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями резистентності еритроцитів до дії кислотного гемолітика. Зниження гемолітичної стійкості цих клітин крові є наслідком зменшення відсоткового вмісту ретикулоцитів і молодих еритроцитів у периферичній крові.

При введенні агматину тваринам з ЦД (IV група) спостерігали достовірне зменшення

кількості та добової продукції ретикулоцитів (див. табл. 1). Ймовірною причиною пригнічення еритропоезу у цій групі тварин є здатність агматину впливати на гомеостаз поліамінів [20]. Такі речовини є важливими компонентами у процесах реплікації ДНК, проліферації та підтримання клітинного гомеостазу. Проникаючи з позаклітинного простору за допомогою активного перенесення системою транспорту путресцину, агматин викликає виснаження внутрішньоклітинного вмісту поліамінів. Оскільки активність поліамінтранспортної системи корелює зі швидкістю клітинної проліферації, агматин, в основному діє на клітини з високою проліферативною кінетикою, пригнічуючи їхній ріст [21, 22]. Тому ми припускаємо, що вплив агматину на клітини еритроноу за умов ЦД може бути опосередкований його інгібуючою дією на активно проліферуючі клітини-попередники еритроїдного ряду на рівні кісткового мозку.

Пригнічення агматином інтенсифікованого еритропоезу за умов ЦД все таки має нормалізуючий ефект, на що вказує збільшення резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика. Таким чином, часткове зростання стійкості еритроцитів до гемолізу (див. рис. 1) у цій групі тварин у відповідь на введення агматину зумовлено збільшенням кількості молодих еритроцитів (див. рис. 2), а також відновленням функціонального стану клітин і зменшенням інтенсивності мембранодеструктивних процесів.

Морфологічна неоднорідність еритроцитарного пулу, пов'язана з порушення метаболізму та структури їхніх мембран, а також зміни у співвідношенні різних вікових груп еритроцитів можуть бути ідентифіковані при

Таблиця 1. Вплив агматину на кількість та добову продукцію ретикулоцитів у щурів при експериментальному цукровому діабеті (ЦД) і введенні агматину ($M \pm m$, $n=6-8$)

Показник	Контроль	Агматин	ЦД	ЦД і агматин
Кількість ретикулоцитів, %	18,83±0,60	15,58±0,29*	26,93±0,70*	22,90±0,56**
Добова продукція ретикулоцитів, тис.	116,65±2,84	114,60±2,22	129,60±1,79*	120,68±1,64**

Примітка. Тут і в табл., 2 * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями у тварин з ЦД.

електронно-мікроскопічному дослідженні цих клітин [8, 23]. Тому на наступному етапі роботи ми оцінювали зміни поверхневої архітектури еритроцитів на фоні введення агматину тваринам з експериментальним ЦД і без нього методом скануючої електронної мікроскопії.

Залежно від структури клітинної поверхні еритроцити є доволі гетерогенною популяцією клітин [8, 15]. При електронно-мікроскопічному дослідженні еритроцитів периферичної крові контрольних тварин показано, що абсолютна більшість клітин представлена двовігнутими дискоцитами (рис. 3, див. табл. 2). Перехідні форми (еліпсоподібні клі-

тини, еритроцити у вигляді плоского диска, дискоцити з одним виростом, з гребенем і з множинними виростами, а також еритроцити у вигляді ягоди шовковиці) становили 7,05 %. На незворотно трансформовані (куполлоподібні та сферичні еритроцити, клітини у вигляді спущеного м'яча) припадало 3,51 % від загального пулу клітин, рідко зустрічалися дегенеративно змінені форми еритроцитів (0,62 %).

Дискоцит має високу деформабельність й еластичність, що дає змогу йому пристосовуватися до діаметра судини і рухатися в найдрібніших ділянках мікроциркуляційного русла [23]. Здатність еритроцита до зміни

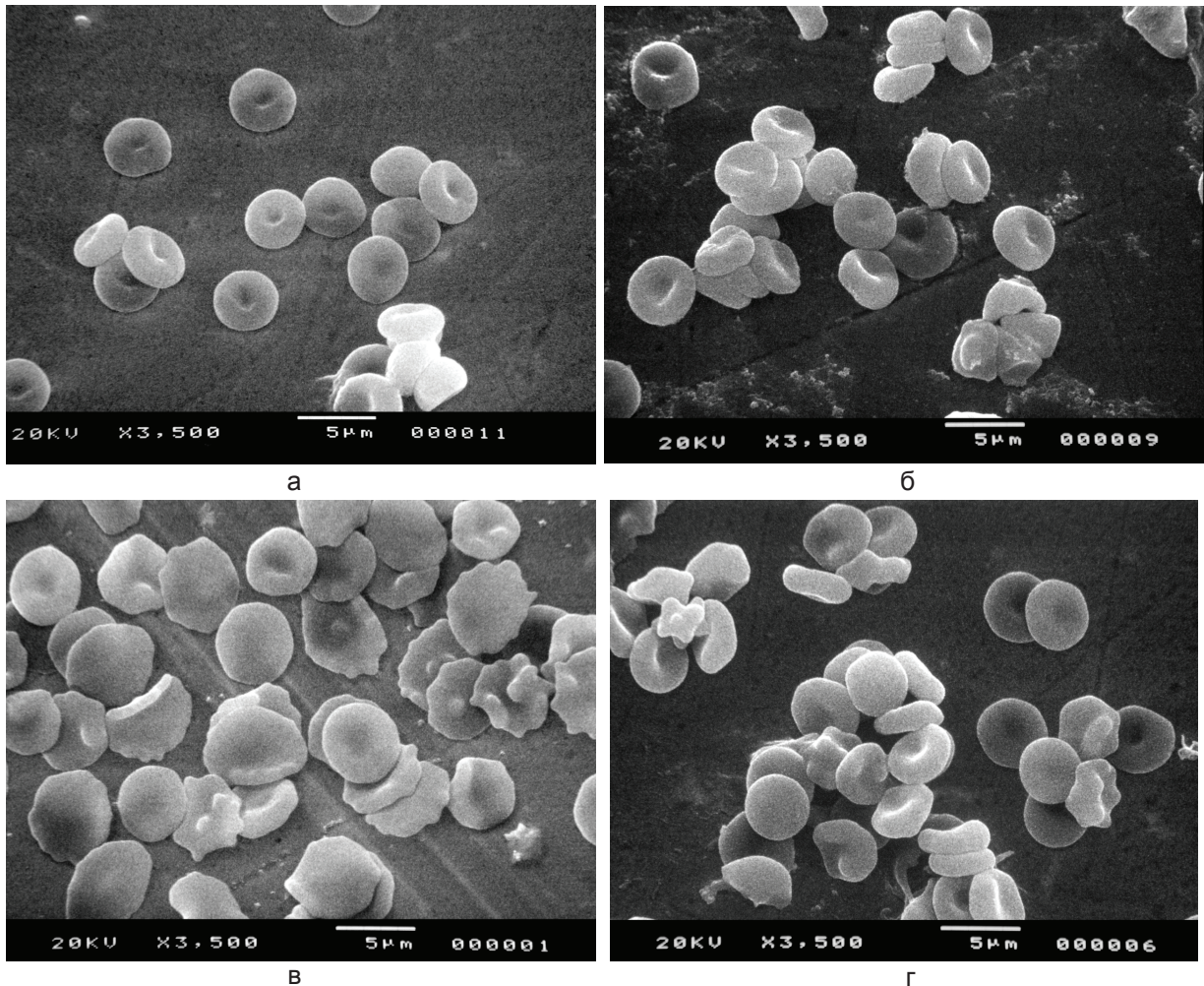


Рис. 3. Електронні мікрофотографії еритроцитів шурів: а – контроль, б – введення агматину, в – цукровий діабет (ЦД), г – ЦД і введення агматину. Скануюча електронна мікроскопія, $\times 3500$

форми забезпечується нормальним функціонуванням катіонтранспортних систем і збалансованістю молекулярної організації білкових і ліпідних компонентів клітинної мембрани. Проте наростання поліморфізму еритроцитарної популяції та збільшення кількості трансформованих клітин може виникати внаслідок екзо- й ендогенних фізико-хімічних та імунологічних впливів і є ознакою прискореного старіння еритроцитів [5].

В умовах хронічної гіперглікемії еритроцитарний пул є морфологічно неоднорідним. Порушення у внутрішньоклітинному метаболізмі та структурно-функціональній організації мембранних компонентів за умов ЦД супроводжуються збільшенням поліморфізму, розміру і форми еритроцитів, появою значної кількості деформованих і гемолізованих клітин [1]. При дослідженні поверхневої архітектоники еритроцитів тварин з ЦД виявлено достовірне зниження числа двоввігнутих дискоцитів і трикратне збільшення кількості перехідних, здатних до зворотної трансформації, клітин порівняно з нормою (див. рис. 3, табл. 2).

При ЦД 1-го типу молекулярний механізм трансформації еритроцитів може бути зумовлений підвищенням вмісту насичених

жирних кислот при зниженні ненасичених жирних кислот у фосfolіпідних фракціях мембрани еритроцита, зростанням мікров'язкості внутрішнього і модифікацією зовнішнього шарів мембрани, порушенням білок-ліпідних взаємодій, а також зниженням активності Ca^{2+} -АТФази [5]. Слід підкреслити, що Ca^{2+} -АТФаза мембрани еритроцитів є важливим регулятором внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Пригнічення її активності за умов дефіциту АТФ супроводжується нагромадженням останнього всередині клітини, що є причиною формування виростів і трансформації еритроцита в ехіноцит [23]. Збільшення кількості ехіноцитів завжди супроводжується підвищенням в'язкості крові. Окрім того, ригідні клітини щільно не дотикаються до стінки судин і тому не можуть повноцінно брати участь у газообміні. Рух таких клітин капілярами сповільнений, що сприяє утворенню мікротромбів [24]. Таким чином, порушення форми та рельєфу поверхні еритроцитів при ЦД визначає їхню функціональну нестабільність і призводить до зміни показників внутрішньосудинного гемолізу, що узгоджується з отриманими результатами про зниження резистентності цих клітин крові до кислотного гемолітика (див.

Таблиця 2. Морфологічна характеристика популяції еритроцитів (%) у нормі, за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) та на фоні введення тваринам агматину (результати скануючої електронної мікроскопії, $M \pm m$, $n=6-8$)

Популяції еритроцитів	Контроль	Агматин	ЦД	ЦД і агматин
Нормальні дискоцити	88,82±3,03	77,94±4,34	72,94±4,94*	80,23±3,95
Зворотно трансформовані еритроцити	7,05±0,41	4,43±0,37*	22,69±1,85*	14,78±1,12**
еліпси	0,37±0,02	0,29±0,01	2,39±0,17*	0,67±0,03**
плоскі диски	0,52±0,03	0,62±0,05	3,47±0,26*	0,98±0,08**
дискоцити з виростом	1,26±0,11	1,08±0,08	5,82±0,49*	2,65±0,19**
дискоцити з гребенем	1,05±0,08	0,89±0,05	4,01±0,33*	0,99±0,07**
дискоцити з багатьма виростами	3,64±0,28	1,21±0,09*	6,47±0,57*	7,48±0,65
еритроцити у вигляді ягоди шовковиці	0,21±0,01	0,34±0,03	0,53±0,04*	2,01±0,17**
Незворотно трансформовані еритроцити	3,51±0,31	15,84±1,10*	3,84±0,23	4,01±0,39
куполіподібні	1,65±0,11	8,27±0,69*	2,39±0,21*	1,98±0,15
сферичні	1,03±0,08	4,81±0,32*	0,79±0,05*	1,14±0,10**
у вигляді спущеного м'яча	0,83±0,07	2,76±0,19*	0,66±0,04	0,89±0,07
Дегенеративні форми	0,62±0,05	1,79±0,12*	0,53±0,04	0,98±0,09**

рис. 1). Зменшення стійкості еритроцитарної мембрани посилює еритродієрез, що є причиною порушення газотранспортної функції крові, наростання гіпоксії та погіршення основного патологічного стану [16].

Введення агматину тваринам без діабету призводило до значних змін у кількісному розподілі окремих морфологічних форм еритроцитів. На фоні зниження числа дискоцитів (на 12 %) і здатних до зворотної трансформації форм еритроцитів (на 37 %) кількість незворотно трансформованих і дегенеративних клітин достовірно перевищувала відповідні показники у тварин, яким агматин не вводили (див. рис. 3, табл. 2). Виявлені порушення поверхневої архітекτονіки циркулюючих еритроцитів на фоні введення агматину свідчать про однаправлені зміни в системі еритроциту, спрямовані у бік старіння популяції та зниження функціональної повноцінності клітин.

При електронно-мікроскопічному дослідженні поверхневої архітекτονіки еритроцитів тварин з ЦД на фоні введення агматину (IV група) виявлено незначне зростання кількості двоввігнутих дискоцитів. Частка перехідних форм еритроцитів, які за сприятливих фізіологічних умов здатні до трансформації у дискоцити, знижувалася на 35 %. У зменшенні кількості цієї морфологічної групи червоних клітин крові визначальну роль відіграло зниження відсоткового вмісту клітин у вигляді еліпсів і плоских дисків, а також дискоцитів з одним виростом і гребенем, проте частка дискоцитів з багатьма виростами й еритроцитів у вигляді ягоди шовковиці достовірно зростала порівняно з показниками тварин з ЦД, яким агматин не вводили (III група; див. табл. 2). Збільшення частки функціонально повноцінних дискоцитів і зменшення кількості здатних до зворотної трансформації еритроцитів у тварин з ЦД відображає позитивний вплив агматину внаслідок вираженої цукрознижувальної дії. Нормалізація вмісту глюкози в крові супроводжується відновленням внутрішньоклітинних метаболічних процесів і покращенням морфофункціональних

характеристик мембран еритроцитів.

Таким чином, введення агматину тваринам без ЦД призводило до погіршення фізіологічного стану еритроцитів, тоді як у разі діабету проявлялася його коригуюча дія на функціональний стан клітин еритроциту. Ймовірно, такі різноспрямовані фізіологічні ефекти агматину зумовлені різним механізмом його дії залежно від функціонального стану організму. Нормалізуючи вміст глюкози в крові тварин з ЦД, агматин призводить до зниження ефекту глюкозотоксичності на еритроцити периферичної крові, що покращує їхній функціональний стан. Тоді як за нормальних фізіологічних умов надлишок цього поліаміну спричинює дисрегуляцію сигнальних і метаболічних шляхів, що опосередковано виявляє негативний вплив на клітини еритроїдного ряду.

ВИСНОВКИ

1. Наростання морфологічної неоднорідності популяції еритроцитів та зниження їхньої резистентності до дії кислотного гемолітика при ЦД свідчить про підвищення інтенсивності деструктивних процесів у мембрані цих клітин крові в умовах гіперглікемії, що є причиною пришвидшення їхнього руйнування та, відповідно, посилення еритропоезу.

2. Введення агматину у разі ЦД призводить до часткового відновлення досліджуванних показників, що зумовлено не лише виявленням гіпоглікемічної дії, але й здатністю цього поліаміну впливати на інтенсивність еритропоезу.

**І.В. Ференц, І.В. Бродяк, М.Я. Люта,
О.Р. Кулачковський, Н.А. Сибірна**

ЭФФЕКТ ПРОДУКТА ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ L-АРГИНИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

В статье приведены результаты исследования влияния агматина на устойчивость эритроцитов к кислотному

гемолитику, кількість і суточну продукцію ретикулоцитів і поверхню архітектуру еритроцитів в умовах стрептозотоцинового сахарного діабету у крыс. Показано, що введення агматину животним з діабетом приводить до зниженню інтенсивності еритропоза і зростанню резистентності еритроцитів до соляної кислоти. Установлено підвищення частки молодих еритроцитів на 10% і зменшення кількості перехідних форм кліток, здатних при фізіологічних умовах до трансформації в дискоцити, на 35%. Отримані результати свідчать про покращення морфофункціональних характеристик еритроцитів при діабеті і відображають позитивний вплив агматину на клітки еритроноу за рахунок сахаропонижального ефекту цього поліаміну.

Ключові слова: еритроцити, агматин, експериментальний сахарний діабет.

**I. V. Ferents, I. V. Brodyak, M. Ya. Lyuta,
O. R. Kulachkovsky, N. A. Sybirna**

EFFECTS OF AGMATINE TREATMENT ON MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE ERYTHRON IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS IN RATS

This paper reports the results of a study of the impact of the agmatine treatment on erythrocyte resistance to acid hemolytic, reticulocyte count and reticulocyte production index, erythrocyte surface architectonics in streptozotocin-induced diabetic rats. Our results indicate that treatment of diabetic rats with agmatine causes a suppression of erythropoiesis and increases the resistance of erythrocytes against HCl-induced hemolysis. It was shown a 10% increase in the number of young red blood cells and 35% reduction in the number of structurally transformed erythrocytes that are capable of restoring normal biconcave disc shape under physiological condition. Our data demonstrate an improvement of morphofunctional state of red blood cells in diabetes and reflect the positive effect of agmatine treatment on erythron due to the glucose-lowering action.

Key words: red blood cells, agmatine, experimental diabetes mellitus.

Ivan Franko National University of Lviv

REFERENCES

1. Vydyborets SV. Erythrocytic changes in diabetes mellitus (a review of the literature). *Vrach Delo*. 1990 Feb;(2):56-61. [Russian].
2. Tsrkin VI, Dvoryanskiy SA, Troshkina NA. Red blood cell: structure and function of its membrane. *Vyatskiy med vestnik*. 2007;(2):32-40. [Russian].
3. Katyuhin LN. Rheological properties of erythrocytes. Modern methods of investigation. *Ros Fiziol Zh im. I.M. Sechenova*. 1995; 81(6):122-9. [Russian].

4. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. 2002 Jan;102(1):6-12.
5. Kravets EB, Ryazantseva NV, Jakovleva NM. Features of microrheological properties of erythrocytes in vascular complications of type 1 diabetes mellitus. *Sakharnyi diabet*. 2005; (1):14-7. [Russian].
6. Sokolov EI, Zaboltnov VI, Podachina SV, Baluda MV. Disturbances of rheological properties of the blood and disorders of lipid spectrum of membranes of red-blood-cells in patients with diabetes. *Kardiologia*. 1996; 36(9):67-70. [Russian].
7. Lipunova EA, Tugin VN, Rezanova TA. Change of the hematology parameters of elderly people's with diabetes mellitus. *Nauchnyye vedomosti BelGU. Ser. Estestvennyye nauki*. 2007; 5(5):140-3. [Russian].
8. Novitskiy VV, Ryazantseva NV, Stepovaya EA, Fedorova TS, Kravets EB, Ivanov VV, Zhavoronok TV, Chasovskih NYu, Chudakova OM, Butusova VN, Yakovleva NM. Molecular abnormalities of erythrocyte membrane in the pathology of different genesis are typical reaction of the body: the contours of the problem. *Byul. Sib. Med*. 2006; (2):62-9. [Russian].
9. Rabini RA., Fumelli P, Staffolani R, Mazzanti L, Pugnaroni A, Biagini G, Faloia E, De Pirro R. Effects of diabetes mellitus on structural and functional properties of erythrocyte membranes. *Membr Biochem*. 1993 Apr-Jun;10(2):71-9.
10. Singh M, Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. *Indian J Exp Biol*. 2009 Jan;47(1):7-15.
11. Kuypers FA, Lewis RA., Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*. 1996 Feb 1; 87(3):1179-87.
12. Gitel'zon II, Terskov IA. The erythrogram as a method of clinical investigation of the blood. *Krasnoyarsk: Scientific academy of USSR, Siberia department*; 1959. 246 p. [Russian].
13. Sybirna NO, Burda VA, Chajka YaP. *Metody doslidzhennya systemy krovi: Navchal'no-metodychnyj posibnyk Research Methods of Blood: Textbook. Vydavnychj centr LNU imeni Ivana Franka - Publishing Center of Ivan Franko LNU*, 2005. 100 p. [Ukrainian].
14. Ionov BV, Chernukh AM. Morphological differences between erythrocytes of arterial and venous rat blood revealed by scanning electron microscopy. *Bul Exp Biol and Med*. 1981 Dec; 92(12):749-51. [Russian].
15. Novoderzhkina YK, Shishkanova ZG, Kozinetz GI. Blood cell configuration and surface under normal and pathological conditions. *Moscow: «Triada-farm»*; 2004. 152 p. [Russian].
16. Burda V, Byront N, Sybirnay N, Kleveta G. Investigation of erythron functional state under the conditions of streptozotocin-induced diabetes. *Vis L'viv Univ. Biology*

- Series. 2002; 28:21-7. [Ukrainian].
17. Bondar TP, Kozinets GI. Morphofunctional condition of the peripheral blood erythrocytes in late vascular complications of diabetes mellitus of type 2. *Klin Lab Diagnost.* 2002;(12):22-34. [Russian].
 18. Ferents IV, Brodyak IV, Lyuta MYa. Effect of agmatine on the blood parameters of rats in experimental diabetes mellitus. *Studia Biologica.* 2012; 6(3): 65-72. [Ukrainian].
 19. Kurilovich SA, Kruchinina MV, Generalov VM, Bakirov TS, Rikhter VA, Semenov DV. Electrical parameters and structure of membranes of erythrocytes at diffuse liver diseases. *Ros. Zhurn. Gastroenterol. Gepatol. Koloproktol.* 2009; 19(2):30-6. [Russian].
 20. Satriano J, Isome M, Casero RA Jr, Thomson SC, Blantz RC. Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jul; 281(1):C329-34.
 21. Arndt MA, Battaglia V, Parisi E, Lortie MJ, Isome M, Baskerville C, Pizzo DP, Ientile R, Colombatto S, Toninello A, Satriano J. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Jun;296(6):C1411-9
 22. Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S, Blantz RC. Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15313-6.
 23. Mineev VN, Lalaeva TM. Surface architectonics and cytoskeleton of erythrocytes and their modulation by adrenergic agents in patients with bronchial asthma. *Ter Arkh.* 2004;76(3):12-7. [Russian].
 24. Bondar TP, Shmarov DA, Kozinets GI Morphometric and biochemical analysis of erythrocytes in smoking patients with late vascular complications of diabetes mellitus. *Klin Lab Diagnost.*, 2003 Aug; (8):37-40. [Russian].

Львів. нац. ун-т імені Івана Франка
E-mail: iryna_ferenc@i.ua

Матеріал надійшов до
редакції 18.03.2013

Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

Вплив агоніста та антагоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на відтворення умовного рефлексу самиць щурів у різні фази естрального циклу

Вивчали ефекти хронічного введення (14 діб) агоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів RJR-2403 і антагоніста мекаміламіну (1,0 мг/кг, внутрішньоочередово) на умовно-рефлекторну діяльність з використанням моделей просторового та непросторового навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. Процеси непросторового навчання оцінювали за допомогою умовної реакції пасивного уникнення, просторового – у водному тесті Морріса. Встановлено, що на тлі введення RJR-2403 поліпшувалося вироблення реакції пасивного уникнення у самиць у фазах проеструсу й еструсу порівняно з контрольними щурами. Застосування RJR-2403 подібним чином відновлювало здатність самиць до просторового навчання у фазу проеструсу та стимулювало його динаміку у фазу еструсу у водному тесті. Навпаки, хронічне введення мекаміламіну порушувало процеси непросторового і, особливо, просторового навчання незалежно від фаз статевого циклу. Результати цього дослідження свідчать про позитивний вплив стимуляції $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на умовно-рефлекторне навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу.

Ключові слова: RJR-2403, мекаміламін, $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів, навчання, статевий цикл, самиці щурів.

ВСТУП

Н-холінорецептори являють собою лігандактивуючі рецептори з пентаметричною структурою, що складаються з α - і β -субодиниць. Існування 9 типів α -субодиниць і 3 типів β -субодиниць вказує на високу структурну та функціональну гетерогенність Н-холінорецепторів [1]. Встановлено, що $\alpha 4\beta 2$ субодиниці Н-холінорецепторів експресуються в центральній нервовій системі [6]. Доведено, що вони розташовані переважно пресинаптично, та їх активація призводить до вивільнення різних нейромедіаторів [2]. Показано, що Н-холінорецептори залучені до механізмів навчання, пам'яті, тривожності, депресії, збудження, наркоманії [3, 4].

З іншого боку, численні клінічні та експериментальні дослідження вказують на існування функціонального взаємозв'язку вмісту ендогенних естрогенів, характеру когнітивних

© Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

функцій мозку та участю Н-холінореактивних структур головного мозку [5–8]. Вважають, що порушення в холінергічній системі при змінах вмісту ендогенних естрогенів насамперед зумовлюють розвиток цілої низки нейродегенеративних і мнестичних розладів [9]. Однак у літературі мало даних про вплив холінотропних речовин на умовно-рефлекторну діяльність у самиць щурів при дисбалансі естрогенів в організмі. Слід також зазначити, що більшість досліджень виконані на самицях після оваріоектомії в умовах змодельованого дефіциту естрогенів, і лише незначна кількість – на інтактних самицях з вільним циклом [7]. Крім того, немає відомостей про порівняльний фармакологічний аналіз дії агоністів і антагоністів різних типів Н-холінорецепторів на поведінковий статус самиць з різним вмістом ендогенних естрогенів в організмі.

Мета нашої роботи полягала в порівняльному аналізі участі $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холі-

норецепторів в умовно-рефлекторній діяльності дорослих самиць щурів при природній циклічній зміні вмісту статевих гормонів.

МЕТОДИКА

Робота виконана в умовах хронічного експерименту на 270 білих безпорідних статевозрілих самицях щурів віком 4–5 міс, масою 190–220 г, отриманих з розплідника «Рапполово» РАМН. Тварин утримували у віварії в умовах 24-годинного фоторежиму (12 год день/12 год ніч, включення світла о 7:00), контрольованої температури (22 ± 2 °C) і вологості (65 ± 10 %) повітря при вільному доступі до води та стандартному раціоні (гранульований комбікорм). Для утримання тварин використовували пластмасові клітки ($47 \times 35 \times 17$ см) з дротяною металевою кришкою та підстилкою з тирси.

Усі тварини були привчені до рук експериментатора до початку проведення поведінкових тестів, які здійснювали в ранкові години (10:00–13:00). Дослідження виконані згідно з «Міжнародними рекомендаціями щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин» (1985).

Використано агоніст $\alpha 4\beta 2$ субодиноць Н-холінорецепторів RJR-2403 й антагоніст $N\alpha 7$ -холінорецепторів мекаміламін («Sigma», США). Речовини розводили у фізіологічному розчині і вводили в дозі 0,1 мг/кг, внутрішньочеревино протягом 14 діб до початку поведінкових тестів і далі протягом усього періоду навчання та тестування під час виконання всіх досліджень. Щури контрольних груп отримували еквалентну об'єму кількість розчинника.

Для виконання кожної поведінкової методики щурів у фазі дієструсу, еструсу та проєструсу відповідно, розділяли на групи по 10 особин у кожній. Самиці 1-ї, 2-ї та 3-ї груп отримували фізіологічний розчин (контроль); 4-ї, 5-ї та 6-ї – RJR-2403; 7-ї, 8-ї та 9-ї – мекаміламін.

Для визначення фази статевого циклу протягом 7 послідовних діб до початку досліджен-

ня у щурів брали вагінальні мазки. В експерименти відбирали самиць, у яких спостерігали стабільний 4-добовий естральний цикл. Потім формували групи з однаковими фазами статевого циклу, які визначали за характерними морфологічними ознаками за мазками [10]. Протягом усього експериментального періоду і під час поведінкових серій проводили постійний моніторинг фаз статевого циклу.

Навчання проводили на моделях просторового і просторового навчання – умовної реакції (УР) пасивного уникнення водного тесту Морріса відповідно.

УР пасивного уникнення виробляли на основі одноразового електрошкірного підкріплення в установці, що складається з двох камер – великої (освітленої) і малої (темної) з електрифікованою підлогою, сполучених між собою круглим отвором [11]. При навчанні щура поміщали на 3 хв всередину освітленої камери хвостом до отвору в темну. Тварина досліджувала камеру, знаходила отвір в темну камеру та проникала в неї. Реєстрували латентний період (ЛП) першого потраплення і число заходів тварини в темну камеру. Через 15 с на ґратчасту підлогу камери подавали змінний струм (частота 50 Гц, тривалість 2–3 с, імпульсна активність 10 мс), розмір якого для кожної тварини підбирали індивідуально за вокалізацією. Отвір між камерами залишався відкритим. За щуром, що перебіг в освітлену камеру, спостерігали протягом 3 хв. Якщо протягом цього часу тварина не намагалася повернутися в темне приміщення, УР пасивного уникнення вважали виробленою з однієї спроби. Відтворення УР визначали через 24 год. Для цього щура поміщали в установку на 3 хв. Реєстрували ті самі показники, що й при навчанні. Збільшення ЛП заходження тварини в темну камеру або якщо вона не заходила зовсім розцінювали як відтворення УР пасивного уникнення, а вкорочення часу перебування в освітленій камері як амнезію навички.

Для виявлення здатності тварин до просторової орієнтації використовували водний

тест [12]. Басейн діаметром 130 і висотою 50 см заповнювали водою (глибина 35 см). Температуру води підтримували на рівні 20 ± 3 °С. На периферії басейну в 15 см від борту знаходилася прозора платформа діаметром 10 см, прихована під водою на глибині 1 см. Воду в басейні затемнювали за допомогою спеціальної рідини. Протягом 7 днів тварин навчали пошуку цієї платформи. Розташування платформи щодня змінювали. Ділянку, в якій установлювали платформу, вибирали довільно. На 8-му добу (через 24 год після останнього сеансу навчання) платформу поміщали в центр басейну. Тварину опускали у воду на одне і те саме місце. В день експерименту тварині надавали дві спроби – тренувальна та експериментальна, інтервал між якими становив 60 с. Положення платформи для обох спроб було однаковим. Контрольний час перебування тварини в басейні – 3 хв для кожної спроби. Якщо тварина не знаходила платформу за відведений відрізок часу, її ставив на платформу експериментатор, а значення ЛП вважали рівним 180 с. Протягом 3 хв реєстрували час виявлення платформи протягом обох спроб.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням дисперсійного аналізу two-way ANOVA-test з

наступним post-hoc-тестом Ньюмана–Келсі за допомогою пакета програм SPSS 9.0. Відмінності між значеннями при $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведені результати, двофакторний дисперсійний аналіз яких виявив ефекти дії препарату ($F(3,90)=4,17$, $P < 0,05$) і гормонального фактора (фаза статевих циклу) ($F(3,90)=3,32$, $P < 0,05$), а також взаємодії цих факторів ($F(3,90)=5,87$, $P < 0,001$) на відтворення УР пасивного уникнення. Post-hoc-аналіз також виявив відмінності між контрольними й експериментальними групами при аналізі результатів тесту УР пасивного уникнення ($P < 0,05$).

У самиць контрольної групи тільки у фазу дієструсу зазначалося відтворення УР пасивного уникнення, тоді як в інших фазах статевих циклу спостерігалася його амнезія. Хронічне введення мекаміламіну (блокування $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів) у фазах проєструсу й еструсу повністю порушувало здатність до відтворення УР пасивного уникнення, що виражалось в зниженні ЛП заходження тварини в темний відсік через 24 год після навчання. Однак на тлі хронічного

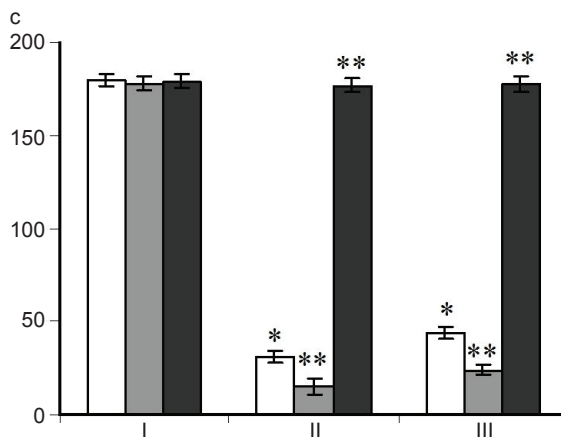


Рис. 1. Вплив хронічного введення агоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів RJR-2403 і мекаміламіну на формування і відтворення умовної реакції пасивного уникнення у самиць щурів. За віссю абсцис – фази оваріального циклу: I – дієструс, II – проєструс, III – еструс. За віссю ординат – латентний період заходження тварин в темну камеру через 24 год. 1 – контроль, 2 – введення мекаміламіну, 3 – введення RJR-2403. * $P < 0,05$ порівняно з самицями у фазі дієструсу; ** $P < 0,05$ порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевих циклу

введення RJR-2403 (стимуляція $\alpha 4\beta 2$ Н-холінорецепторів) в тих самих фазах статевого циклу ЛП заходження в темний відсік збільшувався ($P < 0,05$), що свідчить про антиамнестичні ефекти RJR-2403 на процес відтворення УР пасивного уникнення (див. рис. 1).

Двофакторний дисперсійний аналіз результатів, отриманих у водному тесті при тренувальній та експериментальній серіях, дав змогу встановити ефекти препарату ($F(3,90)=8,30$, $P < 0,05$), ($F(3,90)=5,390$, $P < 0,05$) і гормонального фактора (фаза статевого циклу) ($F(3,90)=2,40$, $P < 0,05$), ($F(3,90)=2,41$, $P < 0,05$), а також взаємодії цих факторів ($F(3,90)=5,37$, $P < 0,005$), ($F(3,90)=2,88$, $P < 0,05$). Post-hoc-аналіз продемонстрував

відмінності між контрольними й експериментальними групами ($P < 0,05$).

Встановлено, що у самиць у фазу проєструсу протягом перших 7 днів навчання значення ЛП знаходження прихованої платформи були вищі (рис. 2, $P < 0,05$) порівняно з такими самими показниками у щурів у фазу дієструсу. На 8-му добу експерименту у групи щурів у фазу проєструсу ЛП знаходження прихованої платформи як при тренувальній, так і при експериментальній спробі були вищі ($P < 0,05$) порівняно з показниками у щурів у фазу дієструсу. Слід зазначити, що пошук платформи у щурів у фазу проєструсу при тренувальних спробах характеризувався стереотипністю з явним переважанням рухів

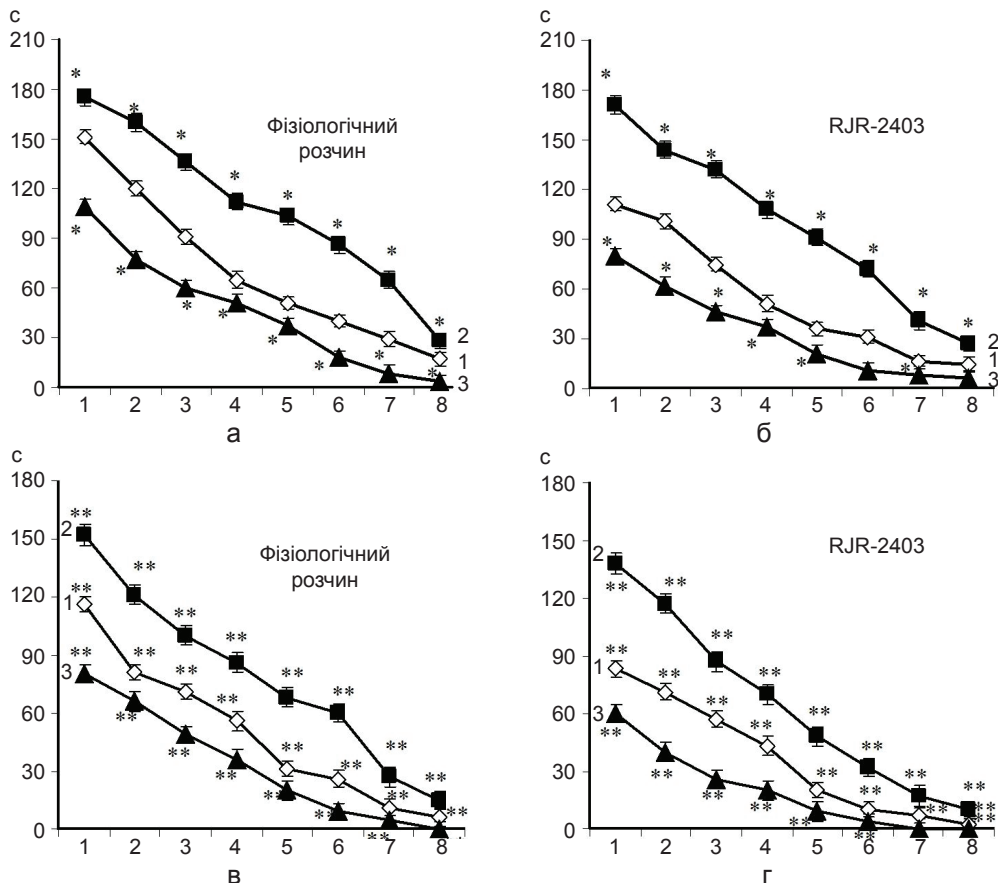


Рис. 2. Вплив агоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиноць Н-холінорецепторів RJR-2403 на просторове навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. За віссю абсцис – дні експерименту: 1 – дієструс, 2 – проєструс, 3 – еструс; а, б – тренувальна спроба, в, г – експериментальна спроба. За віссю ординат – латентний період заходження твариною прихованої платформи (с). * $P < 0,05$ порівняно з самицями у фазі дієструсу; ** $P < 0,05$ порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу

вздовж борту басейну та наявністю «човникових» рухів. Подовження часу пошуку платформи при експериментальній спробі часто визначалося спочатку неправильним вибором напрямку руху. Водночас у самиць у фазу еструсу спостерігалось прискорення в динаміці знаходження прихованої платформи порівняно зі щурами у фазу діеструсу. На 8-му добу тестування при переміщенні прихованої платформи з периферії басейну в його центр у щурів контрольної групи у фазу еструсу ЛП знаходження прихованої платформи при тренувальній і експериментальній спробах були менші ($P < 0,05$) порівняно з показниками контрольних щурів у фазу діеструсу.

На тлі хронічного застосування RJR-2403 відновлювалася здатність самиць до просторо-

рового навчання у фазу проеструсу та прискорювався процес просторового навчання у водному тесті у фазу еструсу. При блокаді $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів (введення метамізилу) незалежно від фази статевого циклу істотно пригнічувалася здатність самиць до просторового навчання (рис. 3).

Результати цього дослідження свідчать про неоднозначний вплив блокади або стимуляції $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на просторове та непросторове навчання в умовах природної циклічної зміни вмісту естрогенів у самиць щурів. Показано, що при низькому вмісті ендогенних естрогенів у фазу еструсу порушується відтворення УР пасивного уникнення, тоді як на моделі просторового навчання в цю саму фазу статевого

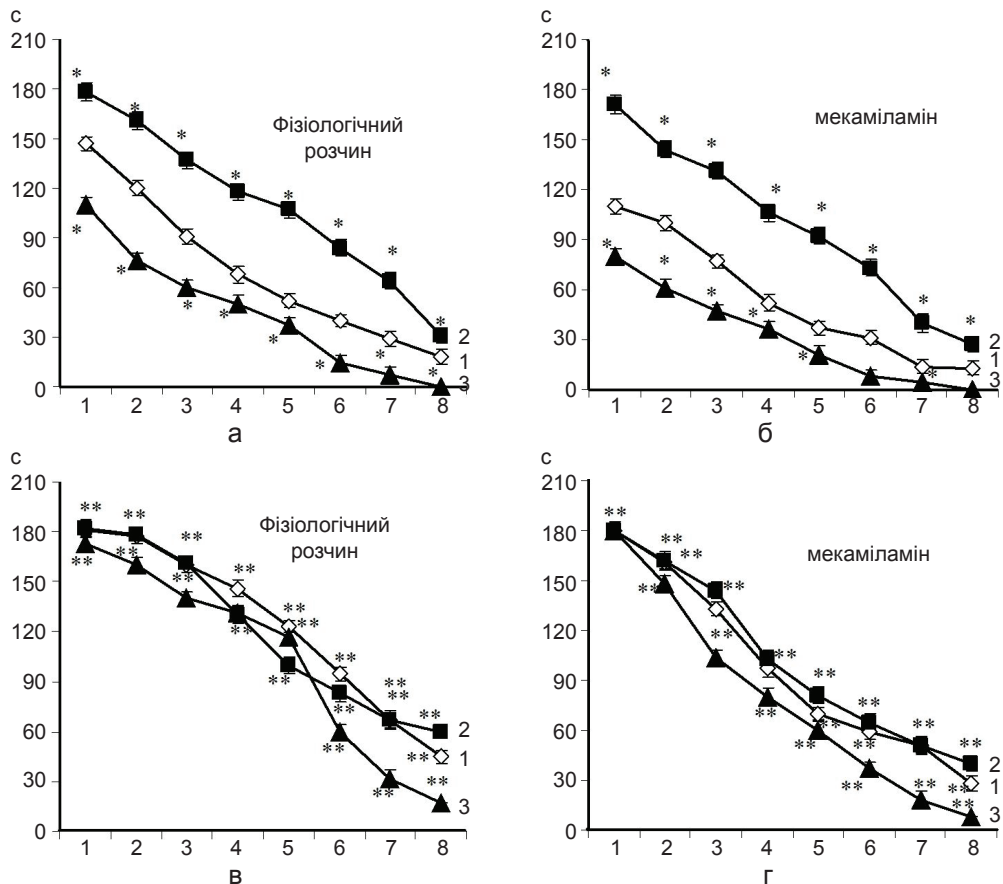


Рис. 3. Вплив мекаміламіну на просторове навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. За віссю абсцис – дні експерименту: 1 – діеструс, 2 – проеструс, 3 – еструс; а, б – тренувальна спроба, в, г – експериментальна спроба. За віссю ординат – латентний період заходження твариною прихованої платформи (с). * $P < 0,05$ порівняно з самицями у фазі діеструсу; ** $P < 0,05$ порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу

циклу формування і відтворення УР пошуку прихованої платформи поліпшується. З іншого боку, при високому вмісті ендogenous естрогенів у фазу проєструсу однонаправлено порушується як непросторове, так і просторове навчання. Можна говорити про те, що фізіологічні коливання вмісту естрогенів протягом оваріального циклу істотно впливають на динаміку та здатність до навчання і відтворення отриманої інформації, однак вектор спрямованості таких змін визначається не тільки вмістом естрогенів, а й застосовуваною методикою навчання (моделі просторового або непросторового навчання). Отримані результати добре узгоджуються з даними літератури про погіршення здатності самиць щурів при високому рівні ендogenous естрогенів до вироблення умовних рефлексів протягом оваріального циклу [8, 13–15].

Модель УР пасивного уникнення вперше показала, що хронічне введення RJR-2403 відновлювало відтворення цієї реакції у самиць у ключові фази статевого циклу, тобто стимуляція центральних $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів усуває розбіжності у виробленні рефлексу, пов'язані з природним гормональним статусом самиць. Навпаки, хронічне введення самицям мекаміламіну порушувало відтворення УР пасивного уникнення у фазі проєструсу й еструсу. Отже, блокада $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів нівелює відмінності в здатності щурів до непросторового навчання протягом ключових фаз статевого циклу.

Модель просторового навчання у водному тесті вперше виявила виражений пригнічувальний ефект мекаміламіну на просторове навчання та здатність тварини до пошуку прихованої платформи в фазі проєструсу й еструсу. Разом з тим при стимуляції $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на тлі застосування RJR-2403 відновлювалася здатність самиць до просторового навчання у фазу проєструсу та прискорювалося просторове навчання у водному тесті у фазу еструсу.

Результати тесту на просторове та непро-

сторове навчання вказують на те, що центральні $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів впливають на ці процеси на нейрохімічному рівні протягом статевого циклу.

Таким чином, результати дослідження свідчать про істотну роль $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів у когнітивних процесах у самиць щурів в різні фази статевого циклу. Воно вказує на вплив холінергічної системи в умовно-рефлекторній діяльності при природних коливаннях вмісту статевих гормонів в організмі та сприяє кращому розумінню комплексної їх взаємодії з центральною холінергічною системою мозку. Отже, варто продовжувати вивчення ефектів Н-холінотропних речовин як засобів для фармакокорекції порушень вищих функцій мозку протягом статевого циклу.

ВИСНОВКИ

1. Хронічне введення RJR-2403 повністю коригує відтворення рефлексу пасивного уникнення у самиць щурів при низькому і високому вмісті ендogenous естрогенів в організмі, відновлює здатність самиць до просторового навчання при високому вмісті естрогенів і стимулює просторове навчання при низькому їх вмісті.

2. Хронічне введення мекаміламіну порушує непросторове і, особливо, просторове навчання у самиць у ключові фази статевого циклу.

Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

ЭФФЕКТЫ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА $\alpha 4\beta 2$ СУБЪЕДИНИЦ Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА САМОК КРЫС В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Изучали эффекты хронического введения (14 сут) агониста холинорецепторов RJR-2403 и антагониста $\alpha 4\beta 2$ субъединиц Н-холинорецепторов мекамилamina (1,0 мг/кг, внутривбрюшинно) на условно-рефлекторную деятельность с использованием моделей пространственного и непространственного обучения у самок крыс в различные фазы полового цикла. Процессы непространственно-

го обучения оценивали с помощью условной реакции пассивного избегания, пространственного обучения – в водном тесте Морриса. Установлено, что на фоне введения RJR-2403 улучшалась выработка реакции пассивного избегания у самок в фазах проэструса и эструса по сравнению с контрольными крысами. Применение RJR-2403 сходным образом восстанавливало способность самок к пространственному обучению в фазу проэструса и стимулировало динамику пространственного обучения в фазу эструса в водном тесте. Напротив, хроническое введение мекамилamina нарушало процессы непространственного и, особенно, пространственного обучения независимо от фаз полового цикла. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте стимуляции $\alpha 4\beta 2$ субъединиц Н-холінорецепторов на условно-рефлекторное обучение у самок крыс в различные фазы полового цикла. Ключевые слова: RJR-2403, мекамиламин, $\alpha 4\beta 2$ субъединицы Н-холінорецепторов, обучение, половой цикл, самки крыс.

Yu.O. Fedotova, G.O. Frolova

THE INFLUENCE OF STIMULATION AND BLOCKADE OF $\alpha 4\beta 2$ NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS ON LEARNING OF FEMALE RATS IN KEY PHASES OF OVARY CYCLE

The present work was devoted to the comparative analysis of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in learning/memory processes during ovary cycle assessed in adult female rats. RJR-2403 (1.0 mg/kg, i.p.), $\alpha 4\beta 2$ nAChRs agonist and mecamylamine (1.0 mg/kg, i.p.), $\alpha 4\beta 2$ nAChRs antagonist were injected chronically during 14 days. The processes of learning/memory were assessed in different models of learning: passive avoidance performance and Morris water maze. Chronic RJR-2403 administration to female rats improved the passive avoidance performance in proestrous and estrous as compared to the control animals. Also, RJR-2403 restored spatial learning during proestrous phases in Morris water maze, and stimulated the dynamics of spatial learning during estrous phases. On the contrary, chronic mecamylamine administration impaired non-spatial, and especially, spatial learning in females during key phases of ovary cycle. The results of the study suggest positive effect of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs stimulation in learning/memory processes during ovary cycle in the adult female rats. Key words: RJR-2403, mecamylamine, $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, learning, ovary cycle, female rats.

*Pavlov Institute of Physiology RAS, Snt Petersburg, Russia;
Donetsk Natіonal University*

*Ін-т фізіології ім. І.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;
Донецьк. нац. ун-т
E-mail: gljukkk@ukr.net*

REFERENCES

1. Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci.* 1997; 2: 259-266.
2. Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem.* 2005; 48: 4705- 4745.
3. Hogg RC, Ragenbass M, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003; 147: 1-46.
4. Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted. *U Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 493-499.
5. Dumas J, Hancur-Bucci C, Naylor M, Sites C, Newhouse P. Estrogen treatment effects on anticholinergic-induced cognitive dysfunction in normal postmenopausal women. *Neuropsychopharmacol.* 2006; 31: 2065-2078.
6. Norbury R, Travis MJ, Erlandsson K, Waddington W, Ell PJ, Murphy DG. Estrogen therapy and brain muscarinic receptor density in healthy females: a SPET study. *Horm Behav.* 2007; 51: 249-257.
7. Pompili A, Tomaz C, Arnone B, Tavares MC, Gasbarri A. Working and reference memory across the estrous cycle of rat: a long term study in gonadally intact females. *Behav Brain Res.* 2010; 213: 10-18.
8. Pompili A, Benedetto AA., Gasbarri A. Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. *Psychoneuroendocrinol.* 2012; 37: 1379-1396.
9. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006; 16: 710-715.
10. Kirshenblat YaD. Workshop on Endocrinology. Moscow; 1969.
11. Bures J, Buresova O, Huston J. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Moscow; 1991.
12. Ponomarev DB, Vinogradova EP. Comparative analysis of the learning ability in Morris water test in rats with the various rate of active acquisition of the avoidance conditioned reflex. *IP Pavlov J Higher Nervous Activity.* 2000; 50 (6): 974-981.
13. Daniel JM, Fader, Spencer AJ, Dohanich AL. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav.* 1997; 32: P.217-225.
14. Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci.* 1997; 2: 259-266.
15. Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA., Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol.* 1992; 41: 31-37.

*Матеріал надійшов
до редакції 20.12.2013*

В.В. Труш, В.І. Соболев

Модуляція тироксином ефектів дексаметазону на скелетний м'яз білих щурів

На статевозрілих білих щурах-самцях в умовах in situ за допомогою електрофізіологічних методів досліджували модульований вплив тироксину у дозі, що не викликає ознак гіпертиреозу (10 мкг/кг), на проявлення ефектів дексаметазону на функціональний стан переднього великогомілкового м'яза. Встановлено, що хронічне ізольоване застосування дексаметазону супроводжувалося зниженням амплітуди скорочення (на 29,7–59,3 % після 10–50 діб) та маси переднього великогомілкового м'яза (на 22,4–12,7 % після 10–60 діб). Дія тироксину у комплексі з дексаметазоном згладила негативні ефекти синтетичного глюкокортикоїду на амплітуду скорочення м'яза й навіть зумовила деяке її підвищення (на 41,2–62,1 % відносно контролю після 20–60 діб), а також запобігла зниженню маси м'яза. Ізольоване застосування дексаметазону вже після перших 20 діб зумовлювало зниження швидкісних параметрів м'яза. Про це свідчило подовження відносно контролю тривалості активного його стану (на 20,5 %) і зменшення швидкості одиночного скорочення (на 45,3 %), а також зменшення частоти тетанізації м'яза (до 12–20 щодо 26–28 імп./с у контролі). Тироксин у комплексі з дексаметазоном уже після 10 діб уведення спричинював скорочення відносно контролю тривалості активного стану м'яза (на 19,3 %) і збільшення швидкості одиночного його скорочення (на 72,4 %), які зберігалися протягом усього подальшого періоду введення препаратів і свідчили про поліпшення швидкісних характеристик м'яза під впливом тироксину. Разом із тим у разі як ізольованого, так і комплексного з тироксином, хронічного введення дексаметазону, вже після перших 10–20 діб спостерігались ознаки підвищеної стомлюваності м'яза.

Ключові слова: дексаметазон, тироксин, скорочення м'яза, амплітуда скорочення м'яза, швидкість скорочення м'яза, максимальна стійка працездатність м'яза.

ВСТУП

Відомо, що першопричиною багатьох функціональних і метаболічних розладів у скелетній мускулатурі при гіперкортицизмі є катаболічний ефект надлишкових концентрацій глюкокортикоїдів на скелетні м'язові волокна, особливо гліколітичного типу [1, 2, 13]. Виходячи з цього, деякі автори [12, 20] висловлюють припущення, згідно з яким засоби й фактори, що стимулюють анаболізм або гальмують катаболізм білків у м'язовій тканині, можливо, частково компенсують негативні ефекти глюкокортикоїдів у скелетних м'язах. Поряд зі стероїдними й нестероїдними анаболічними препаратами, анаболічну дію на більшість тканин організму, у тому числі й на нервово-м'язову

© В.В. Труш, В.І. Соболев

систему, здійснюють тиреоїдні гормони, які здатні проникати всередину клітин-мішеней і реалізовувати свій вплив через генний апарат [18]. Водночас у літературі існують відомості [20], що глюкокортикоїди знижують чутливість аденоцитів-тиреотрофів до тиреоліберину, а це призводить до пригнічення секреції ними тиреотропного гормону й, як наслідок, зниження секреторної активності щитоподібної залози, а, виходить, і ослаблення впливу тиреоїдних гормонів на периферичні тканини.

Метою нашої роботи було дослідження динаміки деяких показників функціонального стану скелетного м'яза білих щурів при тривалому введенні синтетичного фторвмісного аналога глюкокортикоїдів дексаметазону, застосовуваного ізольовано та у комбінації

з тироксином у дозі, що не викликає ознак гіпертиреозу (10 мкг/кг на добу).

МЕТОДИКА

Всі експерименти були виконані відповідно до «Керівництва з догляду й використання лабораторних тварин» (публікація Національного інституту здоров'я № 85-23, США) і «Керівництва з експериментального (доклінічного) вивчення нових фармакологічних речовин» [10]. Експерименти проводили на 130 статевозрілих (4–5 місячних) щурах-самцях з вихідною масою 210–240 г.

Вибір самиць був зумовлений більшою чутливістю їх скелетних м'язів до катаболічної дії глюкокортикоїдів у порівнянні з особинами чоловічої статі [19]. Об'єктом дослідження став передній великогомілковий м'яз, котрий належить, як і більшість м'язів ссавців, до змішаного типу, але з перевагою швидких м'язових волокон [14], які характеризуються більш високою порівняно з повільними чутливістю до глюкокортикоїдів [13].

Дослідних тварин спочатку розділили на 3 групи. Щури першої групи (n=10) були контролем. У тварин другої групи (n=60) відтворювали гіперкортицизм різної тривалості хронічним введенням дексаметазону. Тваринам третьої групи (n=60) вводили дексаметазон і L-тироксин. Дексаметазон «KRKA» (Словенія) вводили в терапевтичній дозі (0,25 мг/кг, внутрішньоочеревинно, через добу), а L-тироксин (BERLIN-CHEMIE, Німеччина) у дозі, що не викликає ознак гіпертиреозу (10 мкг/кг, у вигляді водного розчину, щодобово, підшкірно) від 10 до 60 діб. Тварин другої і третьої груп надалі було поділено на 6 підгруп (n=10 у кожній підгрупі), кожна з яких одержала різну кількість ін'єкцій дексаметазону (5, 10 і т.д. аж до 30 ін'єкцій), застосовуваних ізольовано (для другої групи) та у комбінації з тироксином (від 10 до 60 ін'єкцій, для третьої групи).

По закінченні строку введення препаратів на наркотизованих тваринах (тіопентал натрію,

100 мг/кг) проводили гострий дослід, у якому за допомогою ергографії досліджували деякі показники функціонального стану переднього великогомілкового м'яза при викликаному його скороченні. Скорочення м'яза індукували подразненням малогомілкового нерва постійним електричним струмом надпорогової сили (500 мкА). Частота електричної стимуляції нерва варіювала в діапазоні від 8 до 100 імп./с, а зовнішнє навантаження становило 20 г. При кожній частоті електричного подразнення нерва м'яз працював протягом 7 с, після чого відбувався 1-хвилинний відпочинок і подальша робота при наступній частоті подразнення нерва. Ступінь скорочення м'яза вимірювали за допомогою потенціометричного датчика ПТП-1, включеного в міст постійного струму МОД-61. Напругу розбалансу моста через аналогово-цифровий перетворювач подавали на вхід комп'ютера й реєстрували за допомогою спеціально розробленої програми.

На підставі записів скорочення м'яза, викликаного подразненням малогомілкового нерва електричними імпульсами із частотою 8 імп./с, яка зумовлювала роботу м'яза у режимі одиночних скорочень, визначали їхню амплітуду і тривалість підтримки на максимальному рівні (тривалість періоду максимальної стійкої працездатності), тривалість активного стану м'яза (як суму латентного періоду скорочення й фази вкорочення) і швидкість розвитку скорочення при першому одиночному скороченні м'яза. За записами скорочення м'яза в діапазоні частот електричної стимуляції нерва 10–40 імп./с визначали частоту стимуляції, за якої м'яз переходив до гладкого тетанусу (частоту тетанізації м'яза).

Евтаназію тварин по закінченні гострого досліді проводили уведенням смертельної дози тіопенталу натрію. Для оцінки вірогідності різниці між центральними тенденціями порівнюваних груп використовували критерій t Стьюдента для нез'язаних вибірок, попередньо переконавшись у тому, що розподіл

значень досліджуваних показників близький до нормального (для тестування розподілу на нормальність використовувався критерій Шапіро-Уїлка, Statistica, 7.0).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Модуляція тироксином ефектів дексаметазону на амплітуду скорочення м'яза. При ізольованому застосуванні дексаметазону амплітуда скорочення м'яза знижувалася відносно контролю ($P < 0,05$) уже після 10 діб (на 29,7 %) і залишалася такою аж до 50 діб (на 59,3 %, рис. 1). Зниження амплітуди скорочення м'яза після 10 діб вказує на погіршення його силових характеристик, яке може бути пов'язане або зі зміною метаболічного профілю м'яза у бік зменшення питомої частки швидких волокон, задіяних у скороченні, внаслідок вимикання частини дистрофічно змінених під дією дексаметазону волокон зі скорочувального акту, або зі зниженням сили, що розвивається окремими його волокнами.

Нормалізація ж амплітуди м'язового скорочення до закінчення 2-місячного періоду введення препарату свідчить про нормалізацію силових характеристик досліджуваного м'яза.

У разі комплексного застосування дексаметазону й тироксину вже після 20 діб поліпшувалися силові характеристики м'яза, які зберігалися протягом усього подальшого періоду аж до 60 діб. Про це свідчить збільшення відносно контролю ($P < 0,05$) амплітуди скорочення м'яза після 20–60 діб на 41,2–62,1 % (див. рис. 1). Отже, тироксин, що вводився в комплексі з дексаметазоном, згладив негативні ефекти синтетичного глюкокортикоїду на силові характеристики переднього великогомілкового м'яза й навіть зумовив деяке їхнє поліпшення. Крім того, маса м'яза не знижувалася протягом усього періоду введення препаратів й навіть збільшувалася до закінчення 2-місячного періоду (на 9,92 %, $P < 0,05$). Тоді як при ізольованому застосуванні дексаметазону вже після 10 діб спостерігалось зменшення цього показника

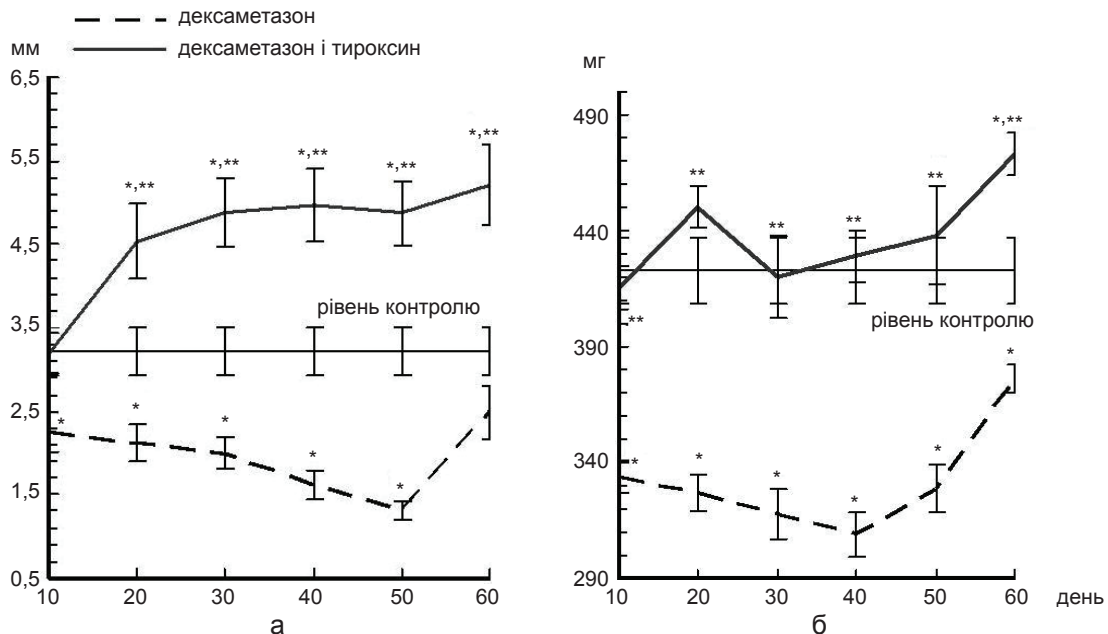


Рис. 1. Динаміка амплітуди скорочення (а) й маси (б) переднього великогомілкового м'яза при збільшенні кількості ін'єкцій дексаметазону, застосовуваного ізольовано й у комплексі з тироксином. * $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна відносно відповідних значень контрольної групи; ** $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна між значеннями дослідних груп, що отримали однакову кількість ін'єкцій дексаметазону та дексаметазону в комплексі з тироксином; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

(на 22,4 %, $P < 0,05$), яке зберігалось протягом 60 діб (див. рис. 1). Отже, тироксин запобіг зниженню маси м'яза, викликаному тривалим уведенням дексаметазону, і зумовив навіть її збільшення до закінчення 2-місячного періоду введення двох гормонів.

Разом із тим той факт, що амплітуда скорочення м'яза збільшувалася відносно контролю вже після перших 20 діб уведення дексаметазону в комбінації з тироксином, а маса м'яза зростала тільки по закінченні 2-місячного періоду, свідчить на користь того, що спостережуване нами після 20–50 діб збільшення амплітуди скорочення м'яза не можна пояснити його гіпертрофією. Поліпшення ж силових характеристик переднього великогомілкового м'яза тварин, що одержували дексаметазон і тироксин, зумовлене або підвищенням сили скорочення, яка розвивається окремими його волокнами, або зсувом гістохімічного профілю м'яза у бік збільшення питомої частки швидких м'язових волокон.

Здатність фізіологічних і помірно підвищених доз тироксину поліпшувати силові характеристики скелетних м'язів може бути зумовлена певними механізмами дії тиреоїдних гормонів на скелетні м'язові волокна. Зокрема, у літературі існують повідомлення, згідно з якими йодовані тироніни покращують збудливість м'язових волокон і ефективність електромеханічного сполучення в них за допомогою впливу на щільність і швидкісні характеристики натрієвих каналів [11], щільність і активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани [3], активність міозинової АТФази скорочувального апарата [8], ступінь спорідненості актинових ниток до Ca^{2+} [5], щільність і функціональний стан кальцієвих каналів мембрани саркоплазматичного ретикулула [6] і активність його Ca^{2+} -помпи [9], стан цАМФ-залежних процесів [15] і ключових метаболічних шляхів [18, 21] у м'язовому волокні, що повинно супроводжуватися підвищенням силових характеристик м'язових волокон.

Другою причиною поліпшення силових характеристик скелетних м'язів під впливом

фізіологічних або помірно підвищених доз тиреоїдних гормонів може бути безпосередній їх активуючий вплив на Ca^{2+} -помпу саркоплазматичного ретикулула [7], а також здатність індукувати експресію генів Ca^{2+} -АТФази і, як наслідок, збільшувати її концентрацію [9]. Обидва ці ефекти зумовлюють збільшення накопичення кальцію в цистернах саркоплазматичного ретикулула при розслабленні й відповідно підвищення кальцієвого залпу при наступних збудженнях м'язового волокна [14].

Підвищення ж концентрації кальцію в міоплазмі волокна при збудженні призводить, з одного боку, – до збільшення ефективності актоміозинової взаємодії, а з іншого – до виникнення фізіологічної м'язової контрактури [14]. Обидва ці фактори спричинюють збільшення амплітуди м'язових скорочень, але при цьому й розвиток міотонічного синдрому.

На користь можливого підвищення концентрації кальцію в міоплазмі м'язових волокон у тварин, що одержували дексаметазон у комплексі з тироксином, свідчать спостережувані нами ознаки фізіологічної контрактури м'яза, які виражалися в його скороченні ще до моменту нанесення чергового електричного подразнення на нерв (рис. 2), поступовому підйомі ізолінії ергограми вгору (рис. 3), а також значному уповільненні м'язового розслаблення.

Крім того, уповільнення м'язового розслаблення до закінчення періоду ритмічної роботи м'яза, викликане накопиченням високих концентрацій вільного кальцію в міоплазмі, може бути пов'язане з енергетичним дефіцитом у м'язових волокнах і говорить про розвиток стомлення в ньому.

Ще однією причиною підвищення під впливом тироксину силових характеристик переднього великогомілкового м'яза може бути, поряд зі збільшенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію в міоплазмі м'язових волокон, і підвищення чутливості скорочувального апарата скелетного м'яза до Ca^{2+} [5, 17].

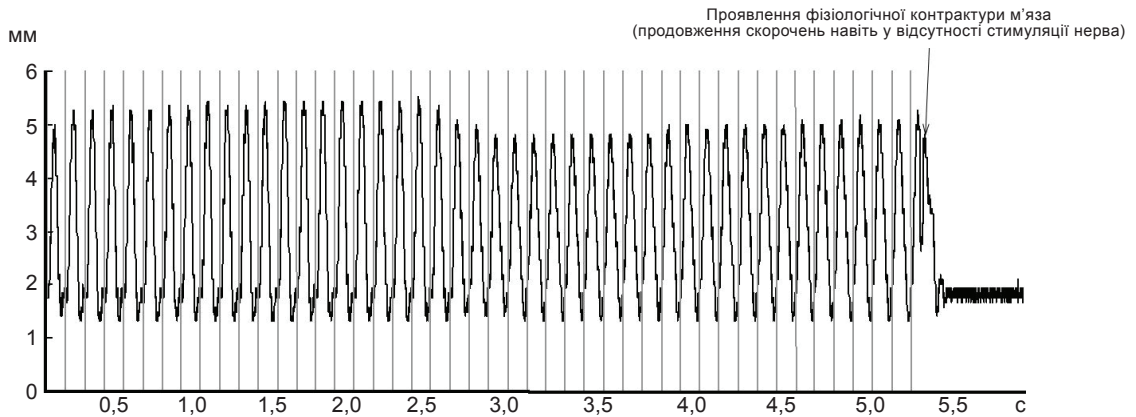


Рис. 2. Приклад ергограми переднього великогомілкового м'яза тварини, яка отримувала дексаметазон у комплексі з тироксином протягом 10 діб, що демонструє проявлення фізіологічної контрактури м'яза (частота електричної стимуляції малогомілкового нерва 8 імпульс/с, м'яз працює в режимі одиночних скорочень)

Нарешті, поліпшення силових характеристик м'яза, відзначене вже після 20 діб застосування

дексаметазону в комплексі з тироксином, може бути і наслідком підвищення його швидкісних

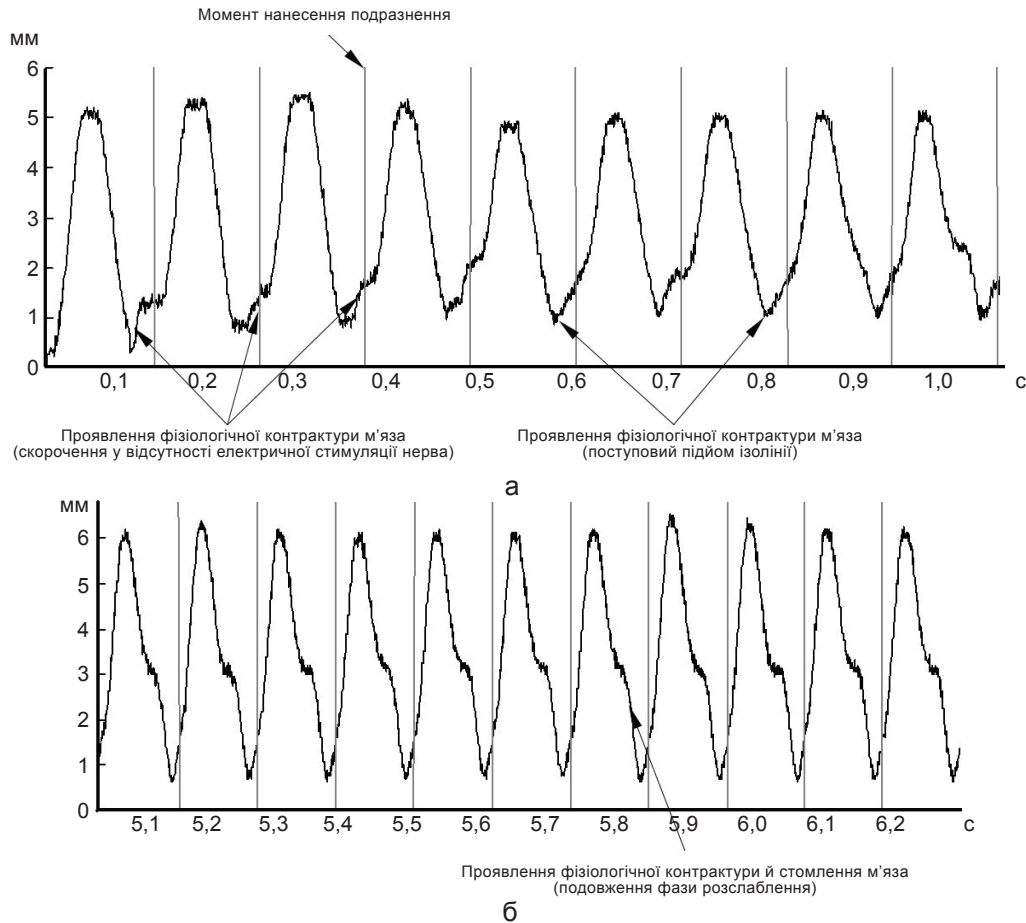


Рис. 3. Приклад ергограми переднього великогомілкового м'яза тварини, яка одержувала дексаметазон у комплексі з тироксином протягом 30 діб, що демонструє проявлення фізіологічної контрактури й стомлення м'яза. На а – наведено запис початку ритмічної роботи м'яза, на б – закінчення 7-секундного періоду ритмічної роботи м'яза

характеристик й, можливо, навіть зміни гістохімічного профілю. І, дійсно, у літературі є повідомлення, згідно з якими тиреоїдні гормони, діючи негеномним шляхом, підвищують активність АТФази міозину [8], спорідненість тропоніну до кальцію [5], а також актину до міозину [7], що повинно супроводжуватися підвищенням швидкості актоміозинової взаємодії, і, як наслідок, поліпшенням силових характеристик м'яза. Крім того, деякі автори [4] вважають, що вони, діючи таким чином, здатні підсилювати експресію генів, які кодують міозин швидкого типу, що повинне супроводжуватися зсувом гістохімічного профілю м'яза у бік збільшення питомої частки швидких м'язових волокон.

Тривале уведення дексаметазону, навпаки, супроводжується переважними деструктивними змінами гліколітичних волокон у силу більш високої їхньої чутливості до глюкокортикоїдів [2] у порівнянні з повільними, що може стати однією з причин збільшення питомої частки повільних волокон, задіяних у скороченні, у м'язі змішаного типу, яким є передній великогомілковий. У зв'язку із цим на наступному етапі аналізу отриманих результатів ми визнали за необхідне вивчити характер зміни швидкісних параметрів переднього великогомілкового м'яза в динаміці хронічного введення дексаметазону, застосовуваного ізольовано та у комбінації з тироксином, і на підставі деяких функціональних показників оцінити ймовірність зміни його гістохімічного профілю.

Модуляція тироксином ефектів дексаметазону на швидкісні параметри й працездатність скелетного м'яза. Аналіз швидкісних характеристик переднього великогомілкового м'яза тварин, які піддавалися ізольованому введенню дексаметазону й комплексному його застосуванню з тироксином, показав, що синтетичний глюкокортикоїд викликав фазні зміни швидкісних параметрів досліджуваного м'яза, а тироксин модулював ефекти дексаметазону на ці показники, у результаті своєї здатності прискорювати м'язові скорочення.

Зокрема, після 10 діб ізольованого застосування дексаметазону тривалість активного стану м'яза, яка визначалась як сума латентного періоду скорочення м'яза й тривалості фази скорочення, швидкість розвитку одиночного скорочення, а також тривалість максимальної стійкої працездатності м'яза не зазнавали істотних змін відносно контролю (рис. 4, 5). Разом із тим подальше ізольоване введення дексаметазону призводило до погіршення швидкісних параметрів переднього великогомілкового м'яза. Так, після 20–50 діб уже на початку роботи м'яза (при першому скороченні) спостерігалось подовження відносно контролю ($P < 0,05$) тривалості активного стану м'яза (на 20,5 %) і зменшення швидкості розвитку одиночного його скорочення (на 45,3 %, див. рис. 4). Після 20 діб суттєво ($P < 0,05$) скорочувалась тривалість стійкої максимальної працездатності м'яза (на 65,1 %), яка зберігалась протягом усього подальшого періоду введення в організм дексаметазону (див. рис. 5). Після 60 діб відзначалась нормалізація тривалості активного стану м'яза й швидкості розвитку одиночного скорочення (див. рис. 4), тоді як період максимальної стійкої його працездатності зберігався скороченим (на 40,4 % відносно контролю, $P < 0,05$, див. рис. 5), що свідчить про збереження порушень енергетичного обміну.

Таким чином, у разі ізольованого застосування дексаметазону, після 20–50 діб спостерігалось зменшення швидкості розвитку одиночного скорочення, котре побічно свідчить на користь зміни гістохімічного профілю м'яза у бік зменшення частки швидких (гліколітичного типу) волокон, задіяних у скороченні. На користь такого припущення свідчить і спостережуване нами зменшення амплітуди скорочення м'яза (див. рис. 1) після 20–50 діб ізольованого застосування дексаметазону.

Ще одним доказом можливого зменшення питомої частки швидких волокон, задіяних у скороченні переднього великогомілкового м'яза щурів, які одержували дексаметазон

протягом 20–50 діб, є зменшення частоти тетанізації м'яза порівняно з контролем. Зокрема, якщо м'яз контрольних тварин переходив до гладкого тетанусу при частоті електричної стимуляції малогомілкового нерва 26–28 імп./с, то у щурів, що одержували дексаметазон протягом цього періоду – 12–20 імп./с. Зменшення частоти тетанізації м'яза пов'язане з подовженням періоду активного його стану, відзначеним саме після 20–50 діб, про що вже обговорювалося вище (див. рис. 4), і побічно свідчить про збільшення питомої частки повільних волокон, задіяних у скороченні м'яза.

Таким чином, після 20–50 діб введення лише дексаметазону спостерігався цілий комплекс функціональних ознак, які побічно свідчать про зменшення питомої частки швидких і відповідно збільшення питомої частки повільних волокон, задіяних у скороченні переднього великогомілкового м'яза. Водночас збільшення питомої частки повільних м'язових волокон, задіяних у скороченні

м'яза, повинне зумовлювати збільшення тривалості максимальної стійкої його працездатності. Як уже обговорювалося раніше, тривалість утримання амплітуди скорочення м'яза на максимальному рівні після 20–60 діб введення дексаметазону виявилася меншою за контрольне значення ($P < 0,05$, див. рис. 5), що, мабуть, спричинене підвищеною стомлюваністю м'яза, яка є наслідком порушення енергетичного забезпечення скорочувального акту, викликаного хронічним введенням дексаметазону.

По закінченні 2-місячного періоду введення дексаметазону тривалість активного стану м'яза, швидкість розвитку одиночного скорочення, частота тетанізації м'яза й максимально досяжна амплітуда його скорочення поверталися до рівня контролю, а маса м'яза мала тенденцію до нормалізації (див. рис. 1, 4). Усе це побічно свідчить про нормалізацію гістохімічного профілю м'яза, зумовленого поступовою нормалізацією функціонального стану швидких м'язових волокон.

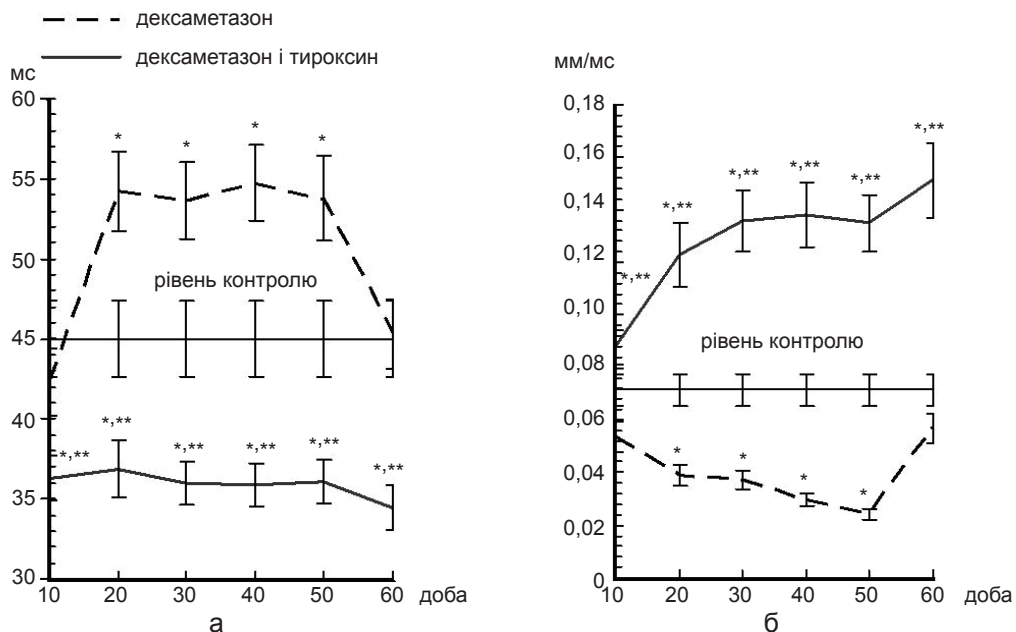


Рис. 4. Динаміка тривалості активного стану (а) та швидкість розвитку одиночного скорочення (б) переднього великогомілкового м'яза при збільшенні кількості ін'єкцій тироксину. * $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна відносно відповідних значень контрольної групи; ** $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна між значеннями дослідних груп, що отримали однакову кількість ін'єкцій дексаметазону та дексаметазону в комплексі з тироксином; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

Водночас все-таки зберігалися ознаки підвищеної стомлюваності м'яза, котрі проявлялись у скороченні періоду максимальної стійкої працездатності м'яза (див. рис. 5). Деяка нормалізація функціонального стану швидких м'язових волокон, яка відбувалася, незважаючи на введення дексаметазону, найбільш імовірно, пов'язана з поступовим зниженням чутливості до глюкокортикоїдів у зв'язку з десенситизацією їхніх рецепторів, активацією в них власних компенсаторних механізмів, котрі перешкоджають подальшому катаболізму білків, а також посиленням метаболічної активності печінки з інактивації гормону.

Введення тироксину в комплексі з дексаметазоном модулювало проявлення ефектів глюкокортикоїдів на швидкісні показники переднього великогомілкового м'яза. Зокрема,

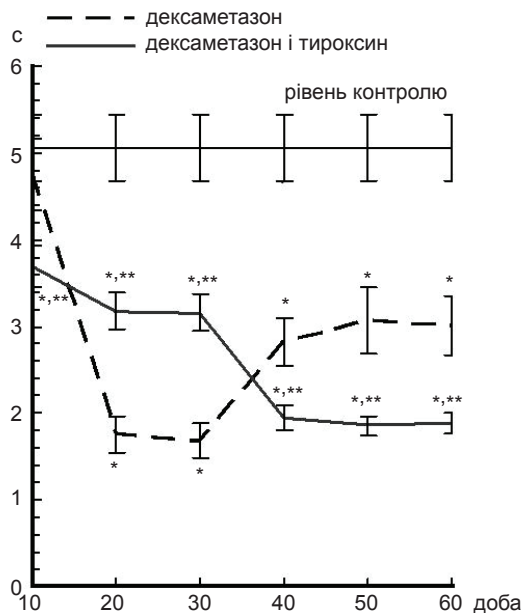


Рис. 5. Динаміка тривалості стійкої максимальної працездатності переднього великогомілкового м'яза при збільшенні кількості ін'єкцій дексаметазону, застосовуваного ізольовано й у комбінації з тироксином. * $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна відносно відповідних значень контрольної групи; ** $P < 0,05$ різниця статистично вірогідна між значеннями дослідних груп, що отримали однаково кількість ін'єкцій дексаметазону та дексаметазону в комплексі з тироксином; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

уже після 10 діб спостерігалось скорочення тривалості активного стану м'яза (на 19,3 %) і збільшення швидкості розвитку одиночного його скорочення (на 72,4 %, $P < 0,05$ відносно контролю, див. рис. 4), які зберігалися протягом усього періоду введення цих гормонів в організм і свідчили про поліпшення швидкісних характеристик м'яза під впливом тироксину. Крім того, про покращення цих показників свідчило і збільшення після 40–60 діб введення пари препаратів частоти тетанізації м'яза (до 30–35 імп./с).

Покращення швидкісних показників переднього великогомілкового м'яза під дією тиреоїдного гормону могло бути зумовлено двома обставинами: або безпосередньою прискорювальною дією тироксину на м'язові волокна, або зміною під його впливом вихідного гістохімічного профілю м'яза у бік збільшення питомої частки швидких м'язових волокон у ньому. У літературі існують відомості [4], згідно з якими тиреоїдні гормони здатні підсилювати експресію міозину швидкого типу в повільних або проміжного типу волокнах, сприяючи тим самим їхньому перепрофілюванню у швидкі. Водночас такий ефект йодованих тиронинів проявлявся на повільному м'язі в умовах порушеної його іннервації [16]. Проте наскільки ефективною виявиться здатність тироксину змінювати вихідний гістохімічний профіль у досліджуваному нами передньому великогомілковому м'язі змішаного типу за умов нормальної його іннервації, і на тлі хронічного введення дексаметазону, який підсилює катаболізм білків переважно в гліколітичних волокнах, важко прогнозувати.

Таким чином, тироксин згладив негативний вплив дексаметазону на гліколітичні м'язові волокна, про що свідчить відсутність зниження амплітуди скорочення та швидкісних характеристик переднього великогомілкового м'яза й навіть деяке їхнє поліпшення в порівнянні з контролем.

Разом із тим уже після перших 10 діб введення дексаметазону в комплексі з ти-

роксином спостерігалось скорочення відносно контролю (на 29,1 %, $P < 0,05$) тривалості максимальної стійкої працездатності м'яза, яке зберігалось й у разі подальшого їх введення (див. рис. 5). Підвищення стомлюваності переднього великогомілкового м'яза може бути пов'язане як з негативним впливом дексаметазону на енергетичне забезпечення м'язових волокон, так і з деяким прискоренням під дією тироксину м'язових скорочень і збільшенням їх амплітуди, що супроводжується більшою витратою енергії й у зв'язку з цим призводить до підвищення стомлюваності м'яза.

Підводячи підсумок викладеному, слід зазначити, що тироксин, застосований у комплексі з дексаметазоном у дозі, що не викликає ознак гіпертиреозу (10 мкг/кг), згладив негативні ефекти синтетичного глюкокортикоїду на силові та швидкісні характеристики переднього великогомілкового м'яза й навіть зумовив деяке їхнє поліпшення, яке спостерігалось вже після 20 діб й зберігалось протягом усього подальшого періоду. Крім того, тироксин, що вводився у комплексі з дексаметазоном, запобіг зниженню маси переднього великогомілкового м'яза (вже після перших 10 діб введення дексаметазону при ізольованому його застосуванні) і навіть спричинив деяке її збільшення по закінченні 2-місячного періоду введення цих гормонів.

Проте як у разі ізольованого, так і комплексного з тироксином хронічного введення дексаметазону, уже після перших 10–20 діб спостерігалися ознаки підвищеної стомлюваності м'яза, котрі зберігалися й при подальшому введенні цих гормонів.

В.В. Труш, В.И. Соболев

МОДУЛЯЦИЯ ТИРОКСИНОМ ЭФФЕКТОВ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА СКЕЛЕТНУЮ МЫШЦУ БЕЛЫХ КРЫС

На половозрелых белых крысах-самках в условиях *in situ* с помощью электрофизиологических методов исследовали модулирующее влияние тироксина в дозе, не вызывающей признаков гипертиреоза (10 мкг/кг), на проявление эффек-

тов дексаметазона на функциональное состояние передней большеберцовой мышцы. Установлено, что хроническое изолированное применение дексаметазона сопровождалось снижением относительно контроля амплитуды сокращения (на 29,7–59,3 % после 10–50 сут) и массы передней большеберцовой мышцы (на 22,4–12,7 % после 10–60 сут). Действие тироксина в комплексе с дексаметазоном сгладило негативные эффекты синтетического глюкокортикоида на амплитуду сокращения мышцы и даже обусловило некоторое ее повышение (на 41,2–62,1 % относительно контроля после 20–60 сут), а также предотвратило снижение массы мышцы. Изолированное применение дексаметазона уже после первых 20 сут обуславливало снижение скоростных параметров мышцы, в пользу чего свидетельствовало удлинение продолжительности активного состояния мышцы (на 20,5 %) и уменьшение скорости развития одиночного ее сокращения (на 45,3 %), а также уменьшение частоты тетанизации мышцы (до 12–20 против 26–28 имп./с в контроле). Применение тироксина в комплексе с дексаметазоном уже после 10 сут сопровождалось укорочением продолжительности активного состояния мышцы (на 19,3 %) и увеличение скорости развития одиночного ее сокращения (на 72,4 %), которые сохранялись на протяжении всего дальнейшего периода введения препаратов и свидетельствовали в пользу улучшения скоростных характеристик мышцы под влиянием тироксина. Вместе с тем в случае как изолированного, так и комплексного с тироксином, хронического введения дексаметазона уже после первых 10–20 сут наблюдались признаки повышенной утомляемости мышцы.

Ключевые слова: дексаметазон, тироксин, сокращение мышцы, амплитуда сокращения мышцы, скорость сокращения мышцы, максимальная устойчивая работоспособность мышцы.

V.V. Trush, V.I. Sobolev

THYROXINE CAUSED MODULATION OF DEXAMETHASONE EFFECTS ON THE SKELETAL MUSCLE OF WHITE RATS

Experiments *in situ* on mature white female rats performed with the use of electrophysiological methods allowed to investigate the modulatory influence of thyroxine at the dose which does not cause the signs of hyperthyroidism (10 mkg/kg), upon the manifestation of the dexamethasone effects on the functional state of the anterior tibial muscle. It has been established that the chronic isolated application of dexamethasone was accompanied by reduction of the amplitude of muscle contraction (by 29.7–59.3 per cent after 10–50 days of the drug injection) and the weight of anterior tibial muscle (by 22.4–12.7 per cent after 10–60 days of the drug injection). Combination of thyroxine with dexamethasone smoothed the negative effects of the synthetic glucocorticoid upon the muscle contraction amplitude and even caused its increase (by 41.2–62.1 per cent after 20–60 days of injection of the pair of preparations), as well as prevented the reduction of the

muscle weight. The isolated application of dexamethasone after the first 20 days of injections caused the decrease of the muscle speed that was confirmed through a lengthened control of the muscle active state duration (by 20.5 per cent) and the reduction of its single contraction development speed (by 45.3 per cent), as well as the decrease of frequency of muscle tetanization (to 12-20 imp/s against 26-28 imp/s in control). The application of thyroxine with dexamethasone shortened the active state of the muscle (by 19.3 per cent) and increased the speed of single contraction development (by 72.4), which remained throughout whole further period the preparations were injected. These observations favor for improvement of high-speed characteristics of the muscle under the influence of thyroxine. At the same time, during chronic injection of dexamethasone either alone or in combination with thyroxin, an increased muscle fatigue during the first 10–20 days has been observed.

Key words: dexamethasone, thyroxine, muscle contraction, muscle contraction amplitude, muscle contraction speed, maximum steady working capacity of a muscle.

Donetsk National University

REFERENCES

1. Borisova EO. Clinical pharmacology of the parenteral forms of glucocorticoids. *Med Act.* 2007; 3: 17-24.
2. Bowes SB, Jackson NC, Papachristodoulou D. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J. Endocrinol.* 1996; 3: 501-507.
3. Brodie C, Sampson SR. Characterization of thyroid hormone effects on membrane potential and Na-K pump in cultured rat skeletal myotubes. *Neuromuscular Function.* Amsterdam etc. 1989.
4. Calozzo VJ, Baldwin KM. The influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity of slow and fast skeletal muscle. *FASEB J.* 1990; 1: 815.
5. Caroccia L, Williams DA, Wrigth A. Effects of thyroid and parathyroid hormones on muscular activity. *Proc. Austral. Physiol. and Pharmacol. Soc.* 1988; 19-71.
6. Connelly TJ, Hayek R, Sukhareva M. L-thyroxine activates the intracellular Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994; 32 (3): 441-448.
7. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 2008; 29: 211-218.
8. Gardahaut ME, Fontaine-Perus J, Rouaud T, Bandman E, Ferrand R. Developmental modulation of myosin expression by thyroid hormone in avian skeletal muscle. *Development.* 1992; 115 (1): 1121-1131.
9. Gloss B, Villegas S, Villarreal FJ, Moriscot A, Dillmann WH. Thyroid hormone-induced stimulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene is inhibited by LIF and IL-6. *Am J Physiol.* 2000; 278 (4): E738-E743.
10. Guid book to experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances (under the editorship of Fisenko V.P.). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, RF ZAO «IIA «Remedium»»; 2000.
11. Harrison AP, Clausen T. Thyroid hormone-induced upregulation of Na⁺ channels and Na⁺-K⁺ pumps: implications for contractility. *Am J Physiol.* 1998; 274 (5): R864-R867.
12. Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev.* 2000; 75: 519-631.
13. Kaasik P, Seene T, Umnova M. The mechanism of action of glucocorticoids in the rat skeletal muscle. *Balt. J. Lab. Anim. Sci.* 2000; 3-4: 185-193.
14. Mac-Comas AJ. Skeletal muscles (structure and functions). Kiev: Olympic literature; 2001.
15. Marchal S, Cassar-Malek I, Magaud JP, Rouault JP, Wrutniak C, Carello G. Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway. *Exp Cell Res.* 1995; 220 (1): 1-10.
16. Poletayev GI. Humoral regulation of a neuromuscular transmission and neurotrophic control of skeletal muscular fiber. *Kazan Med J.* 2001; 5: 321-325.
17. Sampson SR, Bannett RR, Shainberg A. Effects of thyroxine on transmembrane resting potentials of skeletal muscle cells in culture. *J. Neurosci. Res.* 1982; 8 (4): 595-601.
18. Tata JR. Looking for the mechanism of action of thyroid hormone. *Journal of Thyroid Research.* 2011; 2011 [Electronic resource]. Access mode <http://www.hindawi.com/journals/jtr/2011/730630/>
19. Teppermen J, Teppermen H. Physiology of metabolism and endocrine system: the translate from English. Moscow: Peace; 1989.
20. Usova NN. Iodinated thyroid hormones and its influence on nervous system. *Med News.* 2012; 4: 1-15.
21. Yen PM. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev.* 2001; 81 (3): 1097-1142.

Донецьк. нац. ун-т
E-mail: ver.trush@yandex.ru

Матеріал надійшов
до редакції 23.12.13

В.Я. Березовський, О.Г. Чака, І.Г. Літовка, М.І. Левашов, Р.В. Янко

Вплив зміненого парціального тиску кисню на резистентність до гіпоксії та експресію киснечутливих генів *Drosophila melanogaster*

*За результатами тестування на чутливість до низького P_{O_2} виділено субпопуляції високостійких (ВГ) та низькостійких до гіпоксії (НГ) дрозофіл *Melanogaster* лінії Oregon, яких утримували протягом 10 поколінь в умовах постійної нормобаричної гіпоксії ($P_{O_2}=62-64$ мм рт. ст.). Досліджували це ВГ-дрозофіл, котрі зазнавали лише короткочасного впливу гострої гіпоксії ($P_{O_2}=1,5$ мм рт. ст. протягом 5 хв) у кожному поколінні. Виявлено підвищення відносно контролю експресії гена сіртуїна (*Sir2*) та гена, асоційованого з активністю цитратсинтази (*CG14740*) у личинок дрозофіл усіх дослідних груп. У личинок ВГ-дрозофіл експресія гена *CG14740* була більшою, ніж у НГ-дрозофіл. У ВГ-дрозофіл час реституції після гіпоксичного шоку скоротився на 31 % порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про те, що адаптація в ряду поколінь до низького P_{O_2} у ВГ-дрозофіл істотно скорочує час реституції та супроводжується підвищенням експресії генів *Sir2* та *CG14740*. Ключові слова: гіпоксія, дрозофіла, експресія генів, сіртуїни, ген, асоційований з активністю цитратсинтази, ген піруваткінази.*

ВСТУП

Безперервне споживання організмом кисню є необхідною умовою існування людини та тварин. Його нестача знижує інтенсивність окисного метаболізму та кількість молекулярної аденозинтрифосфорної кислоти. Внаслідок гіпоксії змінюється співвідношення потужності аеробного та анаеробного шляхів вивільнення енергії, активуються молекулярні сенсори кисневого гомеостазу, стимулюється експресія киснечутливих генів, що забезпечують адаптацію організму до зниженого парціального тиску кисню (P_{O_2}). Зі 110 киснечутливих генів, 63 регулюються активністю фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1) [1–3]. Водночас активність HIF-1 α та HIF-2 α залежить від рівня експресії генів родини сіртуїнів (*Sir*) [4, 5]. Зниження активності останніх погіршує HIF-залежне пристосування клітин до гіпоксії. Встановлено одночасне зростання рівня експресії *Sir1*

та HIF-1 α в культурі клітин за умов гіпоксії (1% O_2) [5]. Киснезалежні гени регулюють численні функції, завдяки яким живі істоти пристосовуються до низького P_{O_2} [6, 7]. Показано, що експресія ендотеліального фактора росту судин (VEGF) ініціює процеси адаптивного ангиогенезу, гемопоезу, підвищує активність гексокінази, прискорює окиснення глюкози в анаеробних умовах [1, 3, 7, 8].

Дослідження молекулярних шляхів реакції клітин на зниження P_{O_2} та адаптивних процесів у ряду поколінь доцільно проводити на такому класичному модельному об'єкті з коротким терміном розвитку та життя, як *Drosophila melanogaster* [7–9]. Плодова мушка, як і інші комахи, має еволюційні адаптації, які забезпечують їй високу резистентність до гіпоксії [9, 10]. Відомо, що фізіологічні ефекти нестачі O_2 залежать від типу гіпоксії (нормо-, гіпо- або гіпербарична), ступеня зниження P_{O_2} , тривалості та режиму (переривчастий або постійний). За останні роки

© В.Я. Березовський, О.Г. Чака, І.Г. Літовка, М.І. Левашов, Р.В. Янко

вивченню впливу гіпоксії на експресію генів у дрозофіл присвячена значна кількість наукових досліджень [6–9]. Проте умови проведення експериментів суттєво відрізнялися. Так, у роботі американських вчених [11, 12] було виведено *Drosophila melanogaster*, здатних виживати та розмножуватися при вмісті 4 % O_2 в середовищі. У личинок таких дрозофіл змінилася експресія 2749 генів (у 1534 – підвищилась, а у 1215 – знизилась). Водночас у дорослих комах цієї субпопуляції змінилася експресія лише 138 генів (у 95 – підвищилась, у 43 – знизилась) [8–10]. Інші автори порівнювали зміни експресії генів під впливом жорсткої (1 % O_2) протягом 2,5 год і переривчастої гіпоксії з таким самим вмістом O_2 . Показано, що під впливом переривчастої або постійної гіпоксії змінюється експресія різних генів [6, 13]. Зростання експресії генів білків теплового шоку, генів ферментів, які регулюють метаболізм вуглеводів і клітинне дихання, після 6 год дії жорсткої гіпоксії (0,5 % O_2) описано Liu та співавт. [7]. Виявлено також, що дрозофіли однієї лінії мають різну стійкість до гіпоксії, що зумовлено неоднаковою активністю ферментів аеробного дихання [14]. Однак у літературі немає даних про дію довготривалої жорсткої гіпоксії на експресію генів, що відповідають за адаптацію організму до низького PO_2 у дрозофіл із різною вихідною стійкістю до гіпоксії. Немає відомостей і відносно кількісної оцінки інтенсивності гіпоксичного впливу.

Мета нашої роботи – дослідження в ряду поколінь короткочасного або постійного впливу зниженого PO_2 на експресію генів *Sir*, піруваткінази, цитратсинтази та резистентність *Drosophila melanogaster* до гострої гіпоксії.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на *Drosophila melanogaster* лінії Oregon у кількості приблизно 4000 особин по 1000 в кожній групі. Дрозофіл усіх груп вирощували на стандартному

поживному середовищі (агар, цукор, манна крупа, дріжджі з додаванням пропіонової кислоти) при 24 ± 1 °C. Мушок розділили на чотири групи. I група (контрольна) дрозофіли, яких утримували в атмосферному повітрі ($PO_2 = 159,6$ мм рт.ст.). До II групи увійшли високостійкі (ВГ), до III – низькостійкі (НГ) до впливу гіпоксії, дрозофіли, які як першого, так і всіх наступних поколінь постійно (24 год на добу) знаходилися в окремих контейнерах в атмосфері дозованої гіпоксії ($PO_2 = 62–64$ мм рт.ст.) при нормальному атмосферному тиску. Для формування цих дослідних груп попередньо визначали стійкість мушок до низького PO_2 . Дрозофіл розміщували у проточній камері об'ємом 50 мл, в яку подавали 99,8%-й азот зі швидкістю 2,5 см³/с, знижуючи PO_2 в ній до 1,5 мм рт. ст. Мушок, які зберігали рухливість в таких умовах понад 30 с, вважали ВГ, а тих, що утримувалися на вертикальних стінках камери менше 30 с – НГ. Кожне покоління мушок перевіряли на стійкість до гіпоксії аналогічним методом. З нащадків ВГ-мух відбирали тільки ВГ-особин, із нащадків НГ – тільки НГ особин наступного покоління. До IV групи увійшли ВГ-дрозофіли, які в кожному поколінні зазнавали лише короткочасного (5 хв) впливу гіпоксії ($PO_2 = 1,5$ мм рт.ст.). Для їх формування в кожному поколінні відбирали для подальшого розведення тільки ВГ-особин методом, описаним вище.

Селекційний відбір ВГ- та НГ-особин проводили протягом десяти поколінь. Оскільки фізіологічні ефекти гіпоксії, в тому числі на рівні генних механізмів регуляції, залежать від інтенсивності її впливу, виникла необхідність введення нового інтегрального показника, який дав би змогу порівнювати результати різних дослідників. Тому нами був розроблений спосіб кількісної оцінки інтенсивності гіпоксичного впливу, який базується на розрахунку дефіциту O_2 в газовій суміші та тривалості дихання цією сумішшю [15]. Сила гіпоксичного впливу (СГВ) розраховується за формулою: $СГВ = \Delta PO_2 \cdot T_n$, де

T_n – тривалість дихання гіпоксичною газовою сумішшю в годинах, ΔP_{O_2} – різниця P_{O_2} в атмосферному повітрі та в газовій суміші. У наших дослідженнях дрозофіли II та III групи знаходилися в умовах гіпоксії (8 % O_2) протягом 10 поколінь, що становить 140 днів або 3360 год. Тобто для цих груп дрозофіл $СГВ = 98,27 \cdot 3360 = 330187,2$, де 98,27 – різниця P_{O_2} в атмосферному повітрі та в газовій суміші, яка містить 8 % O_2 . Для дрозофіл IV групи $СГВ = 158,1 \cdot 0,08 \cdot 10 = 126,5$, де 158,1 різниця P_{O_2} в атмосферному повітрі та в газовій суміші.

У 10-му поколінні личинок третього віку визначали експресію Sir2, гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, піруваткінази (PyK). Сумарну РНК одержували кислотно-фенольною екстракцією за допомогою комплексу для виділення РНК «РИБО-золь-А» («AmpliSens», РФ), згідно з рекомендаціями виробника. Методом диференційного центрифугування виділяли очищену РНК. Для отримання кДНК використовували стандартний набір «РЕВЕРТА-L-100» («AmpliSens», РФ). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою M-MLV-транскриптази в об'ємі 20 мкл, використовуючи 5 мкг сумарної РНК. Готовий препарат зберігали при -70°C . Експресію на рівні мРНК досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Для ЗТ-ПЛР-аналізу були підібрані специфічні праймери: для Sir2 – GTCGGACAACGATGATTC ACT GTCGCTCGCTCTCTGA, для гена CG14740, який асоційований з активністю цитратсинтази – CGATGACCCCTCCGATGAAG та TGCAGTGCTTCATGGCAAAC, для PyK – GCTGACCACCAACAAGGAAT GTGAGATCAGACCGTCATCG. Послідовності генів взято з бази NCBI [16]. Для цитратсинтази використана послідовність CG14740 з FlyBase [17]. Як внутрішній контроль рівня експресії застосовували експресію гена Gapdh2 (гліцеральдегід-фосфат-дегідрогенази) праймери CGTTCATGCCACCACCGCTA CCACGTCCATCACGCCACAA. Всі вони

синтезовані НПФ «ЛИТЕХ» (РФ). Як негативний контроль реакції ЗТ-ПЛР використовували ПЛР-ампліфікацію продукту реакції зворотної транскрипції без додавання РНК-проби та ПЛР-ампліфікацію без додавання кДНК проби. Вміст мРНК досліджуваного гена визначали за числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу гена Gapdh2 для стандартизації вихідної кількості РНК. Зміни експресії генів розраховували за різницею між числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу експериментальної та контрольної групи.

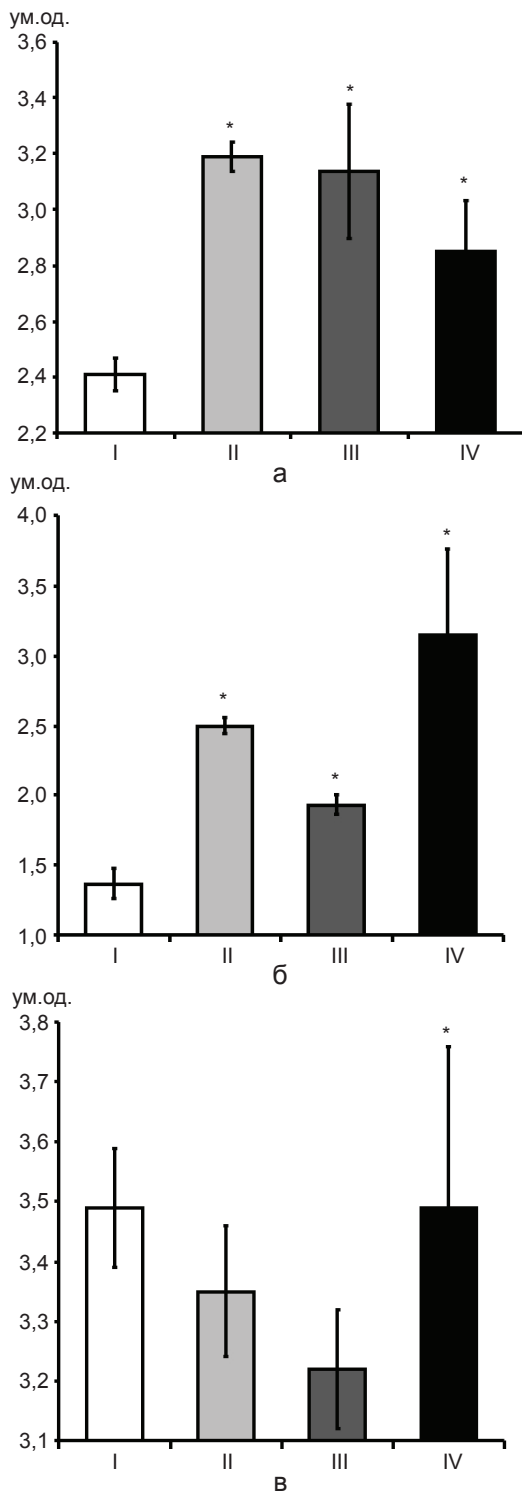
Визначали стійкість 10-го покоління дослідних дрозофіл різних груп до гострої гіпоксії ($P_{O_2} = 1,5$ мм рт.ст.). Вимірювали час утримання мушок на вертикальних стінках та час відновлення рухової активності (реституції) після гіпоксичного знерухомлення першої та останньої дрозофіли. Розраховували середній час та коефіцієнт швидкості реституції дрозофіл.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою пакета програм Statistica 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Вірогідність різниці між середніми значення оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У личинок, відкладених ВГ-дрозофілами експресія гена Sir2 зростала на 32 %, а НГ-дрозофіл – на 30 %. У личинок IV групи, що виростили в умовах нормоксії, експресія цього гена збільшилася на 16 % порівняно з контролем. Тобто під впливом постійної гіпоксії у личинок як ВГ-, так і НГ-дрозофіл, експресія гена Sir2 зростає значно більше, ніж у личинок IV групи, які зазнавали лише короточасного впливу гіпоксії (див. рисунок).

Відомо, що існує 7 гомологічних генів родини Sir. Вони знайдені в усіх видах організмів від бактерій до людини [4, 5]. Показано, що Sir знаходяться як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин. Вони беруть участь у деацетилюванні протеїнів і в антиоксидантному захисті клітин.



Експресія гена Sir2 (а), CG14740 (б), PyK (в) у личинок дрозофіл після впливу постійної або переривчастої гіпоксії: I – контроль, II – високостійкі, III – низькостійкі, IV – високостійкі дрозофіли. $P < 0,05$ порівняно з контролем

Згідно з літературними даними, гени Sir регулюють процеси старіння, транскрипції, апоптозу, запалення [18, 19]. У дослідженнях на клітинах дріжджів встановлено, що сіртуїни можуть не тільки змінювати щільність гістонової упаковки і таким чином регулювати активність генів, а й брати участь у репарації пошкодженої ДНК [20, 21]. Встановлено, що сіртуїни відіграють важливу роль у регуляції тривалості життя та розвитку нейродегенеративних захворювань дрозофіл [18, 19, 21]. Показано, що збільшення експресії Sir2 втричі у жировій тканині дрозофіл збільшує тривалість життя як самців, так і самиць на 13 % [22].

Доведено [4, 5, 18], що активність сіртуїнів залежить від енергетичного стану клітини, вмісту НАД, НАДН і концентрації нікотинаміду. В умовах гіпоксії знижується співвідношення НАД⁺/НАДН та редокс-потенціал клітини. Зниження концентрації НАД⁺ в умовах гіпоксії пригнічує діяльність Sir2, що в свою чергу стимулює HIF-2 α та сприяє пристосуванню клітин до зниженого Po_2 [18]. Навпаки, пригнічення активності гліколізу підвищує рівень НАД⁺, що призводить до зростання експресії генів Sir [20]. Водночас інші дослідники на культурі клітин хребетних показали, що Sir2 пригнічує активність HIF-1 α деацетилюванням Lys 674 [5].

У нашому дослідженні експресія гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, у личинок, відкладених ВГ-дрозофілами, підвищилася на 82 % (див. рисунок), а у НГ-особин – лише на 40 %. Експресія гена CG14740 у личинок ВГ-дрозофіл була більшою на 30 %, ніж у групі НГ. У личинок дрозофіл IV групи вона зросла на 129 %, і стала на 63 % вище, ніж у НГ-дрозофіл. Таке зростання експресії, на нашу думку, може свідчити про інтенсифікацію аеробного окиснення у дрозофіл після їх адаптації до низького Po_2 . Отримані нами результати збігаються з літературними даними про підвищення активності цитратсинтази при зниженні Po_2 . Показано збільшення активності

цитратсинтази та зростання експресії генів, асоційованих з активністю цитратсинтази [6, 12] у дрозофіл, яких протягом 32 поколінь утримували в умовах гіпоксії (4 % O₂). На думку авторів, підвищення стійкості до нестачі кисню у дрозофіл, адаптованих до гіпоксії, пов'язано зі зростанням аеробної потужності та окисної здатності мітохондрій [7, 10]. З'ясовано також, що треновані до низького Po₂ дрозофіли швидше відновлюють рухову активність після гіпоксичного впливу. Автори вважають, що збільшення активності ферментів аеробного окиснення у популяцій, які знаходяться в умовах гіпоксії, забезпечує ефективну адаптацію до низького Po₂, хоча конкретні механізми підвищення резистентності до гіпоксії залишаються нез'ясованими [9–11].

Встановлено, що у дрозофіл, яких утримували в умовах гіпоксії (6 % O₂), знижується експресія генів, що кодують ферменти аеробного окиснення (цитратсинтази, ізоцитратдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, фумарази) [12]. При цьому дослідні комахи мали значно менші розміри, ніж ті, що виростили в умовах нормоксії. Автори стверджують, що в умовах гіпоксії такої інтенсивності пригнічується енергетичний метаболізм, що дає змогу мінімізувати невідповідність між постачанням кисню та його потребою [11, 12].

Піруватдегідрогеназа – поліферментний комплекс, який каталізує окиснювальне декарбоксилювання пірвіноградної кислоти з утворенням ацетил-КоА в тканинах тварин, рослин та аеробних мікроорганізмів. Завдяки цій реакції вуглеводи включаються до циклу Кребса. В наших дослідженнях експресія гена Рук у личинок дрозофіл II та III групи мала тенденцію до зниження на 5 і 8 % відповідно відносно контрольної групи. Не виявлено вірогідних відмінностей між рівнем експресії цього гена у личинок ВГ- та НГ-дрозофіл і між личинками II та IV групи (див. рисунок).

Відомо, що активність піруваткінази кодується сімома генами [12]. У дрозофіл, яких протягом 32 поколінь утримували в

середовищі зі вмістом кисню 4 %, експресія більшості генів, які кодують піруваткіназу, зменшувалась, а одного з цих генів (CG12229) – не змінювалась. У цій праці також показано, що у дослідних дрозофіл активність піруваткінази зростала порівняно з контролем.

При аналізі даних літератури складно порівняти результати досліджень. Автори використовують різний ступінь гіпоксії і тривалість її дії, не враховуючи дозу гіпоксичного впливу. У наших дослідженнях експресія генів Sir2 та CG14740 підвищилась у личинок II та IV груп. СГВ для цих груп становила 330187,2 ум.од. та 126,5 ум.од відповідно. Такі результати свідчать, що активація експресії генів в умовах гіпоксії відбувається навіть при невеликих рівнях СГВ. Подальше її збільшення не призводить до ще більшого підвищення рівня експресії досліджуваних генів.

Ми порівнювали стійкість до нестачі кисню контрольних дрозофіл та тих, що протягом 10 поколінь постійно знаходилися в гіпоксичних умовах (8 % O₂). Час утримання на стінках пробірок в умовах аноксії у ВГ-дрозофіл, які виростили в умовах гіпоксії, був вірогідно більшим на 46 %, ніж у дрозофіл, що зростали в умовах нормоксії. У НГ-дрозофіл цей показник мав лише тенденцію до збільшення на 23 % (таблиця).

Важливим показником адаптивних змін метаболізму може бути час відновлення вихідного стану комах після гіпоксії. Середній час реституції ВГ-мух II групи після впливу гострої гіпоксії знизився і становив 194 с порівняно з 281 с у контрольних комах. У дрозофіл III та IV груп тривалість реституції не відрізнялася від показників контролю (див. таблицю). Коефіцієнт швидкості реституції (відношення тривалості відновлення до тривалості утримання на стінках пробірок) у ВГ-дрозофіл II групи був нижче на 20 % порівняно з контрольною групою, що свідчить про підвищення їх резистентності до гострої гіпоксії після довготривалої адаптації до низького парціального тиску кисню.

Показники стійкості до гострої гіпоксії дрозофіл контрольних та дослідних груп

Групи дрозофіл	Час утримання на стінках пробірок, с	Середня тривалість реституції, с	Коефіцієнт швидкості реституції
Контроль	13,1±2,02	281±25,03	21,45±3,06
Високостійкі	19,2±2,04	194,57±32,18*	17,75±6,63*
Низькостійкі	16,5±2,37	263,50±32,32	28,35±3,48
Високостійкі, які зазнавали короткочасного впливу гострої гіпоксії	12,85±1,11	252,92±18,05	21,68±2,02

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Зменшення часу реституції може бути наслідком зміни експресії генів, які кодуєть активність мітохондріальних ферментів [10, 23]. Залежність тривалості реституції після гіпоксичного знерухомлення від активності киснечутливих генів показано також у дослідженні, проведеному на дрозофілах [11], яких протягом 6 год утримували в середовищі зі вмістом кисню 0,5 % .

Внаслідок проведеного нами селекційного відбору у ВГ-дрозофіл збільшився відсоток ВГ-комах. Так, у 1-му поколінні ВГ-особини становили 37 % від загальної кількості, а у 10-му поколінні ВГ-дрозофіл II групи цей показник підвищився до 69 %. Збільшення відносної кількості ВГ-дрозофіл у субпопуляції та зменшення часу реституції свідчать про підвищення їх резистентності до низького P_{O_2} . Таким чином, після селекційного відбору ВГ-дрозофіл протягом 10 послідовних поколінь отримано субпопуляцію особин зі значно вищою резистентністю до нестачі O_2 .

Підвищення стійкості дрозофіл до низького P_{O_2} при повторних підйомах на висоту 1600 м показано також у дослідах, проведених на різних лініях плодових мушок [24, 25]. У дрозофіл лінії дикого типу спостерігали збільшення часу утримання на вертикальних стінках на 83 % та скорочення тривалості реституції на 31 %.

Деякі автори довели, що стійкість до гіпоксії зумовлена мутаціями, які передаються у спадок. Дрозофіл, які протягом 32 поколінь розвивалися в умовах гіпоксії, повернули в нормоксичні умови [12]. Через 8 поколінь їх

знову перемістили в середовище зі вмістом кисню 4 %. Більше ніж 80 % дрозофіл жили і давали нащадків у такому середовищі. Контрольні дрозофіли в цих умовах виявилися не здатними до розмноження. На думку авторів, це свідчить про те, що стійкість до гіпоксії – видова спадкова риса, що зумовлена мутаціями та зміною експресії певних генів [12, 13]. Проведені нами дослідження показали, що після довготривалого гіпоксичного впливу, інтенсивність якого сягала 330187,2 ум.од., у ВГ-дрозофіл експресія гена CG14740 зросла на 32 % порівняно з НГ-дрозофілами. Це може свідчити про те, що стійкість дрозофіл до гіпоксії пов'язана з рівнем експресії цього гена.

Під дією постійної гіпоксії експресія гена Sir2, який опосередковано впливає на активність HIF [4, 5], зростала у дрозофіл усіх дослідних груп. Але за рівнем експресії цього гена між ВГ- та НГ-дрозофілами різниці не виявлено. Це свідчить про те, що рівень експресії Sir2 не залежить від стійкості дрозофіл до гіпоксії.

Відомо [2, 7, 10, 11], що стійкість до гіпоксії зумовлюється комплексом генів (більше 300), що кодуєть ферменти аеробного та анаеробного метаболізму. У загальному «комплексі» всіх складових реакції організму на гіпоксію проблематично кількісно визначити роль того чи іншого ферменту. Виявлене нами статистично вірогідне зростання рівня експресії гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, після довготривалого впливу жорсткої гіпоксії дає можливість

вважати, що вона є одним з компонентів, які забезпечують високу резистентність комах до гіпоксії.

ВИСНОВКИ

1. У личинок 10-го покоління ВГ до нестачі кисню дрозофіл як після короточасного, так і довготривалого впливу нормобаричної гіпоксії ($P_{O_2}=62-64$ мм рт.ст.) встановлено підвищення експресії генів Sir2 та CG14740.

2. Експресія гена CG14740 у личинок ВГ-дрозофіл, що зазнавали постійного або короточасного впливу гіпоксії, була більшою, ніж у НГ.

3. У ВГ-дрозофіл 10-го покоління внаслідок селекційного відбору скоротився час та коефіцієнт швидкості реституції після впливу гострої гіпоксії.

В.А. Березовский, Е.Г. Чака, И.Г. Литовка, М.И. Левашов, Р.В. Янко

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ГИПОКСИИ И ЭКСПРЕССИЮ КИСЛОРОД-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ DROSOPHILA MELANOGASTER

По результатам тестирования на резистентность к гипоксии выделено субпопуляции исходно высокоустойчивых (ВГ) и низкоустойчивых к гипоксии (НГ) дрозофил *Melanogaster* линии Oregon, которых содержали в течение 10 поколений в условиях постоянной нормобарической гипоксии ($P_{O_2}=62-64$ мм рт.ст.). Исследовали еще ВГ-дрозофил, которых подвергали кратковременному воздействию аноксии ($P_{O_2}=1,5$ мм рт.ст.) в каждом поколении. Выявлено достоверное повышение относительно контроля экспрессии гена сиртуина (Sir2) и гена, ассоциированного с активностью цитратсинтазы (CG14740) у личинок дрозофил всех исследованных групп. У личинок ВГ-дрозофил экспрессия гена CG14740 была достоверно больше, чем у личинок НГ-дрозофил. Время реституции после воздействия острой гипоксии достоверно сократилось на 31 % у ВГ-дрозофил относительно контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что долговременная адаптация к низкому парциальному P_{O_2} у ВГ-дрозофил существенно сокращает время реституции и сопровождается повышением экспрессии генов Sir2 и CG14740. Ключевые слова: гипоксия, дрозофила, экспрессия генов, сиртуины, ген, ассоциированный с активностью цитратсинтазы, ген пируваткиназы.

V.A. Berezovskyi, E.G. Chaka, I.G. Litovka, M.I. Levashov, R.V. Yanko

THE EFFECT OF ALTERED OXYGEN PARTIAL PRESSURE ON THE RESISTANCE TO HYPOXIA AND EXPRESSION OF OXYGEN-SENSITIVE GENES IN DROSOPHILA MELANOGASTER

As a result of resistance test to hypoxia of *Drosophila melanogaster* of Oregon strain, we identified a high resistance (Group II) and low resistance (Group III) subpopulations of flies. Flies from groups II and III were incubated in a constant normobaric hypoxia ($P_{O_2}=62-64$ mm Hg) for 10 generations. A highly resistant group (Group IV) were exposed to a short-term anoxia ($P_{O_2}=1,5$ mm Hg, 5 min) every generation. Larvae from Groups II, III, and IV demonstrated significantly elevated levels of Sir and CG14740 expression. Larvae from Group II had a significantly higher expression of CG14740 compared to group III. The restitution time after exposure to anoxia was significantly reduced in Group II (on 31% of the control values). Our results suggest that long-term adaptation to low oxygen partial pressure of highly resistant *Drosophila* significantly reduces the time of restitution and increases the expression of Sir2 and CG14740 genes.

Key words: hypoxia, drosophila, expression of genes Sir2, CG14740, PyK.

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

REFERENCES

- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Semenza G.L. Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 1998; 12 (2): 149–162.
- Semenza G.L., Shimoda L.A., Prabhakar N.R. Regulation of gene expression by hypoxia-inducible factor 1. *Novartis Found. Symp.* 2006;272: 2–8.
- Shen C., Nettleton D., Jiang M., Kim S. K., Powell-Coffman J.A. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol chem.* 2005; 280: 20580–20588.
- Hubbi M.E., Hu H., Kshitiz, Gilkes D.M., Semenza G.L. Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem.* 2013; 288 (29): 20768–20775.
- Laemmle A., Lechleiter A., Roh V., Schwarz C., Portman S., Furer C., Keogh A., Tschann M., Candinas D., Vorbuerger S.A., Stroka D. Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 α protein under hypoxic conditions. *PLoS One.* 2012; 7 (3): 33433
- Feala J.D., Coquin L., Zhou D. Metabolism as means for hypoxia adaptation: metabolic profiling and flux balance analysis. *BMC Systems biology.* 2009; 3 (1): 91.
- Liu G., Roy J., Johnson E.A. Identification and function

- of hypoxia-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Genomics*. 2006; 25(1):134–141.
8. Ma E., Xu T., Haddad G.G. Gene regulation by O₂ deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. *Brain res. mol. brain res.* 1999; 63: 217–224.
 9. Charette M., Darveau C., Perry S.F., Rundle H. Evolutionary consequences of altered atmospheric oxygen in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2011;6(10): e26876
 10. Zhao H.W., Haddad G.G., Jiang M., Kim S., Powell-Coffman A. Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Placenta*. 2011; 32 (2): 104 – 108.
 11. Zhou D., Xue J., Chen J., Morcillo P., Lambert J.D. Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely low O₂ environment . *Plos One*. 2007; 2 (5): e. 490.
 12. Zhou D., Xue J., Lai J.C. Schork N.J, White K.P., Haddad G.G. Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch *PLoS Genet*.2008; 4 (10): e1000221.
 13. Azad P., Haddad G.G. Survival in acute and severe low O₂ environment: use of a genetic model system. *Ann N Y acad sci*. 2009; 1177: 39 – 47.
 14. Berezovskyi V.A. Hypoxia: individual special features of reactivity. – Kyiv: Nauk. dumka, 1978. – 215 p.
 15. Berezovskyi V.A. Patent for the useful model № 67049. Method of quantitative evaluation of intensivity of hypoxia influence. – 28.07.2011, Bul. № 2.
 16. Wheeler D., Barrett T., Yaschenko E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34 (1): 173 – 180.
 17. Marygold S.J., Leyland P.C., Seal R.L., Goodman J.L., Thurmond J., Strelets V.B., Wilson R.J.; FlyBase consortium. FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res*. 2013;- Jan; 41 (Database issue).
 18. Dioum E. M., Chen R., Alexander M. S., Zhang Q., Hogg R. T., Gerard R. D., Garcia J. A. Regulation of hypoxia-inducible factor 2 alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*.2009; 324 (5932): 1289 – 1293.
 19. Frankel S., Ziafazeli T., Rogina B. dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Exp gerontol*. 2011; 46(5): 391–396.
 20. Ji-Hong L., Yoon-Mi L., Yang-Sook C. , Junjie C., Ja-Eun K., Jong-Wan P. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular cell*. 2010; 38 (6): 864–878.
 21. Rogina B., Helfand S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc nat acad sci U S A*. 2004; 101 (45):15998–16003.
 22. Hoffmann J., Romey R., Fink C., Yong L., Roeder T. Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5 (4): 315 – 327.
 23. Chen N., Rinner O., Czernik D., Nytko K.J., Zheng D., Stiehl D.P., Zamboni N., Gstaiger M., Frei C. The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase. *Cell Res*. 2011; 21(6): 983 – 986.
 24. Berezovskyi V.A. Natural and instrumental orotherapy. – Donetsk: Zaslavskyi, 2012 – 301 p.
 25. Chaka E., Berezovskyi V.A., Levashov M.I., Litovka I.G., Janko R.V. Influence of normobaric hypoxia on the stability of *Drosophila melanogaster* to the stress // III International conference «*Drosophila* in experimental genetics and biology» Digest of scientific papers. – Kyiv. – 2012. – P. 44 – 46.

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

Матеріал надійшов
до редакції 02.12.2013

Л.П. Гордієнко, Т.В. Берегова, К.С. Непорада, Т.М. Фалалєєва

Розвиток оксидативного стресу в тканинах слинних залоз щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння

Недостатньо вивченою проблемою сучасної медицини є патогенетичні механізми ушкодження слинних залоз за умов ожиріння. На експериментальній моделі глутаматіндукованого ожиріння в слинних залозах щурів досліджено вільнорадикальні процеси та система антиоксидантного захисту. Слід відмітити достовірне підвищення вмісту реактантів тіобарбітурової кислоти та зниження активності каталази і супероксиддисмутази. Таким чином, це свідчить про дисбаланс про- і антиоксидантної системи та розвиток оксидативного стресу.

Ключові слова: слинні залози, ожиріння, глутамат натрію, оксидативний стрес.

ВСТУП

Ожиріння – одне з найбільш поширених захворювань у світі, яке характеризується надлишковим відкладанням жиру в організмі, та сприяє розвитку серцево-судинних, нейроендокринних, онкологічних захворювань, що призводить до втрати працездатності і значного зменшення тривалості життя. Глобальні зміни в способі життя людства, низький рівень фізичної активності, особливості харчової поведінки, зростання в раціоні вмісту висококалорійних продуктів, а також широке і неконтрольоване використання в харчовій промисловості та в мережі підприємств громадського харчування харчових добавок, насамперед глутамату натрію, призводять до пандемії ожиріння [1, 2].

Важливе значення при ожирінні має надмірна активація вільнорадикальних процесів, і як наслідок, порушення балансу між про- та антиоксидантною системою та розвиток оксидативного стресу [3]. Активні форми кисню ініціюють переокислення фосфоліпідів мембран і білків клітини, порушуючи їх цілісність, інактивують клітинні та мембранні ферменти, що викликає некробіоз.

Загальновідомо, що слинні залози є чутливими до метаболічних і функціональних

змін в організмі, особливо в патологічних умовах. За даними літератури, ожиріння та асоційовані з ним патологічні стани можуть призвести до реактивно-дистрофічних змін у слинних залозах і порушення їх функції у вигляді зниження саливації, ксеростомії, підвищення в'язкості слини. Порушення метаболізму і функції слинних залоз спричинює розвиток патологічних процесів в органах ротової порожнини, а також шлунково-кишкового тракту [4, 5]. Водночас недостатньо вивченою проблемою сучасної медицини є патогенетичні механізми ушкодження слинних залоз за умов ожиріння.

Метою нашого дослідження було вивчення вільнорадикальних процесів, системи антиоксидантного захисту у тканинах слинних залоз щурів за умов експериментального ожиріння, викликаного дією глутамату натрію.

МЕТОДИКА

Експерименти виконані на 20 щурах обох статей з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. У щурів моделювали експериментальне ожиріння, викликане дією глутамату натрію. На початку

© Л.П. Гордієнко, Т.В. Берегова, К.С. Непорада, Т.М. Фалалєєва

експерименту щури були розділені на 2 групи: I – інтактний контроль (4-місячні щури), новонародженим щурам II групи вводили глутамат натрію у дозі 4 мг/г підшкірно у верхню частину спини на 2, 4, 6, 8, 10-ту добу життя [6]. Через 4 міс у дослідних тварин визначали індекс маси тіла (ІМТ) [7], після чого їх декапітували. В гомогенаті слинних залоз щурів досліджували вміст реактантів тіобарбітурової кислоти [8], активність каталази [КФ 1.11.1.6] [9] та супероксиддисмутази [КФ 1.15.1.1] [10]. Результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у щурів II групи, яким вводили глутамат натрію, ІМТ достовірно підвищився у 1,21 раза ($0,69 \pm 0,03$ г/см², $P < 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи ($0,57 \pm 0,02$ г/см²). Це свідчить про розвиток ожиріння. За даними літератури, введення глутамату натрію новонародженим щурам, викликає руйнування вентромедіального і дугоподібних (аркуатних) ядер гіпоталамуса, що призводить до розвитку ожиріння у дорослих щурів з відсутністю контролю між поглинанням їжі і витратами енергії [6]. Одержані нами результати говорять про те, що глутамат натрію може бути однією з причин розвитку ожиріння.

Для дослідження вільнорадикальних процесів визначали вміст реактантів тіобарбітурової кислоти в тканинах слинних залоз щурів. Встановлено, що у слинних залозах

дослідних щурів достовірно підвищується у 1,79 раза вміст реактантів тіобарбітурової кислоти порівняно з контролем (таблиця).

За цих умов у тканинах слинних залоз щурів активність каталази та супероксиддисмутази достовірно знизилася у 1,53 і 1,82 раза відповідно щодо контрольних значень (див. таблицю). Таким чином, спостерігається дисбаланс про- та антиоксидантної системи слинних залоз щурів за умов глутаматіндукованого ожиріння.

Таким чином, за умов глутаматіндукованого ожиріння у слинних залозах щурів отримано достовірне підвищення вмісту реактантів тіобарбітурової кислоти і зниження активності каталази та супероксиддисмутази, що свідчить про дисбаланс про- та антиоксидантної системи і розвиток оксидативного стресу.

Л.П. Гордиенко, Т.В. Береговая, К.С. Непорада, Т.М. Фалалеева

РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ТКАНЯХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫС В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ

Недостаточно изученной проблемой современной медицины являются патогенетические механизмы повреждения слюнных желез при ожирении. На экспериментальной модели ожирения, индуцированного глутаматом натрия, изучены свободнорадикальные процессы и система антиоксидантной защиты в слюнных железах крыс. Следует отметить достоверное повышение содержания реактантов тиобарбитуровой кислоты и снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы. Таким образом, это свидетельствует о дисбалансе про- и антиоксидантной системы и развитии оксидативного стресса.

Ключевые слова: слюнные железы, ожирение, глутамат натрия, оксидативный стресс.

Вміст реактантів тіобарбітурової кислоти та активність каталази і супероксиддисмутази в тканинах слинних залоз щурів за умов експериментального ожиріння, викликаного дією глутамату натрію ($M \pm m$)

Групи тварин	Вміст реактантів тіобарбітурової кислоти, мкмоль/г	Активність	
		каталази, нкат/г	супероксиддисмутази, од/г
Контроль (n=9)	30,45±1,13	2,68±0,09	0,79±0,01
Ожиріння (n=11)	54,42±1,14*	1,76±0,05*	0,43±0,01*

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

**L.P. Gordienko, T.B. Beregova, K.S. Naporada,
T.M. Falaleyeva**

**OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN
THE TISSUES OF SALIVARY GLANDS OF
RATS UNDER MONOSODIUM GLUTAMATE-
INDUCED OBESITY**

Pathogenic mechanisms of damage of salivary glands under obesity are an insufficiently studied problem of modern medicine. On experimental model of obesity induced by monosodium glutamate, free-radical processes and antioxidant defense system were studied in the tissues of salivary glands of rats. Under experimental obesity induced by monosodium glutamate there is a significant increase of the content of thiobarbituric acid reactive substances and a significant decrease in the activity of superoxide dismutase and catalase. Thus, it indicates to the misbalance of prooxidant and antioxidant systems and the development of oxidative stress.

Key words: salivary glands, obesity, monosodium glutamate, oxidative stress.

Ukrainian Medical Dental Academy, Poltava

*The Institute of Biology, Taras Shevchenko National
University, Kyiv.*

REFERENCES

1. Benza TM. Dietary therapy of obesity. *Endokrynologia.* 2012;17(1):102-5. [Russian].

2. He K, Zhao L, Daviglius ML, Dyer AR, Horn LV, Garside D, et al. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP Study. *Obesity.* 2008;16(8):1875-80.
3. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes.* 2006;30(3):400-18.
4. Afanas'ev VV, Striuk RI, Arutiunian SE, Eliseeva LV, Bychkov RA. Reactive-dystrophic processes in salivary glands (sialoadenoses) running on the background of metabolic syndrome. *Stomatologiya.* 2011;90(4):49-53. [Russian].
5. Denisov AB. Salivary glands. *Saliva.* Moscow: RAMS Publishing House; 2003. [Russian].
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;8(4):731-4.
7. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F et al. Antropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-19.
8. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for determination of malondialdehyde using the thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry.* Moscow: Medicine; 1977. p. 66-8. [Russian].
9. Koroliuk MA, Ivanov LI, Mayorov Y.H. Method for determining of catalase activity. *Laboratornoye delo.* 1988;(1):16-9. [Russian].
10. Berkalo LV, Bobovich OV, Bobrova NO. Methods of Clinical and experimental studies in medicine. Kaidashev IP, editor. Poltava (UA): Polimet; 2003. [Ukrainian].

*ВДНЗ України "Укр. мед. стоматол. академія", Полтава;
ННЦ «Ін-т біології» Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка
E-mail: ljudmila.8@mail.ru*

*Матеріал надійшов
до редакції 12.09.2013*

VIII Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини» (14–17 травня 2014 р.)

Здоров'я населення світу неухильно погіршується. Успіхи фармакології незаперечні, однак потрібні додаткові зусилля та розробка альтернативних напрямків забезпечення здоров'я і тривалості активного життя. Одним з таких шляхів може бути використання природних факторів навколишнього середовища. Насамперед це кліматичні чинники, впроваджені в практику медицини періоду Гіппократа й Авіценни. Розвиток природничих наук і фізіології, починаючи з відкриттів Гальвані та Вольта про роль електрики в життєдіяльності організму, послужили основою для створення фізіотерапевтичної та діагностичної апаратури. Електрична та електронна апаратура дає змогу моделювати природні впливи і широко використовується в сучасній медицині. Однак прискорення темпів життя та прагнення до економії часу спонукали до переважного використання швидкодійних фармакологічних засобів. Вони створюють враження поліпшення стану здоров'я, яке триває короткочасно і, головним чином, усуває вторинні прояви захворювання. Кліматичні та біофізичні чинники вимагають більш тривалого застосування, однак стабільно покращують стан здоров'я. Саме таким проблемам був присвячений VIII міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини», проведений Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України 14–17 травня 2014 р. у місті Києві. У його роботі взяли участь фізики-теоретики, електроніки, біохіміки, математики, синергетики, фізіологи, патофізіологи та практикуючі лікарі. Таке поєднання дало можливість всебічно розглядати як теоретичні, так і практичні аспекти біофізичної

медицини. В завдання входить детальна інструментальна діагностика стану людини, оцінка ступеня її здоров'я, розробка заходів щодо збереження природної резистентності організму до несприятливих впливів середовища. Особливу увагу дослідників привернули доповіді акад. НАН України І.С. Магури (Київ) «Метапластичність інтегральних функцій нейронів головного мозку» і проф. В.К. Кольтовера (Москва) «Ядерний спіновий каталіз в біосистемах: передумови та перспективи». Із зацікавленням було прослухано доповідь про механізми кліматичного впливу на здоров'я людини, представлену групою авторів з центру вивчення біометеорології (Рим, Італія), зачитану проф. В. Валензі. Можливості індивідуального прогнозування результату захворювань на основі оцінки рівня окисного стресу були розглянуті в доповіді проф. Т. Щербатюк (Нижегородська державна медична Академія МОЗ Росії). Цікаві міркування про можливості як позитивного, так і негативного впливу магнітних полів на населення та операторів електромагнітної апаратури представили дослідники з університету фізичної медицини та реабілітації «Tor Vergata» (Рим, Італія). Аналогічне зіставлення діаметрально протилежних ефектів низького та високого парціального тиску кисню на здоров'я людини були приведені в доповіді проф. В.Я. Березовського «Бінарні ефекти гіпоксії». Проблеми старіння населення і можливості біофізичних впливів, що перешкоджають розвитку деменції у літніх людей, була присвячена доповідь проф. Дж. Доре з Риму, яка викликала багато питань і пропозицій. Досвід застосування вібротерапії, як ефективного методу реабілітації

хворих на дитячий церебральний параліч та артрогрипоз, було викладено проф. Б. Лазаретніком (кафедра дитячої хірургії Національної медичної Академії післядипломної освіти (Київ)). Учасники симпозіуму за три дні інтенсивної роботи прослухали та обговорили 74 доповіді. На останньому засіданні симпозіуму обговорені, доповнені і прийняті спільним голосуванням основні положення резолюції, повний текст якої наводиться нижче.

РЕЗОЛЮЦІЯ

Ми, представники медичних, фізико-хімічних і біофізичних дисциплін країн Західної та Східної Європи в результаті осмислення заслуханих доповідей зазначаємо таке.

1. Антропогенне забруднення навколишнього середовища, надмірне або неправильне використання фармацевтичних засобів істотно збільшили захворюваність населення світу. Різко знизилася антитоксична функція печінки, зросла кількість алергічних станів, знизився вихідний рівень імунітету до інфекційних хвороб. З'явилися штами бактерій, стійкі до будь-яких антибіотиків. Для покращення стану здоров'я потрібні альтернативні методи, в тому числі використання природних факторів середовища (кліматотерапія) та інструментальних, преформованих біофізичних впливів.

2. Для підвищення ефективності лікувальних і профілактичних зусиль медицини доцільно створити Європейську організацію біофізичної медицини, яка повинна об'єднати

роботу науково-дослідних і лікарських колективів, забезпечити розробку нових варіантів використання кліматотерапевтичних і біофізичних процедур для попередження розвитку захворювань, лікування різних форм «хвороб цивілізації». Саме вони складають основну масу сучасних форм патології здоров'я.

3. Варто посилити інформаційну підтримку в періодичних наукових виданнях сучасних біофізичних методів профілактики та лікування за допомогою кліматичних, бальнеологічних, радіофізичних, магнітних, акустичних, пневматичних та інших немедикаментозних технологій покращення стану здоров'я та тривалості активного життя.

4. Для забезпечення оперативного обміну інформацією між фахівцями в галузі біофізичної медицини треба створити в інтернеті спеціалізований міжнародний форум.

5. Учасники міжнародного симпозіуму з біофізичної медицини вважають за доцільне звернутися до відповідних міністерств з пропозицією ввести в навчальні програми медичних закладів курс біофізичної медицини з використанням сучасних відомостей про можливості природних та інструментальних біофізичних впливів на фізіологічні системи організму людини.

6. Продовжувати регулярне проведення міжнародних симпозіумів з біофізичної медицини в різних містах Європи не рідше одного разу на 2–3 роки.

7. Просити Оргкомітет симпозіуму направити подяку за його проведення Президії Національної академії наук України та дирекції Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Відповідальний секретар оргкомітету
І.Г. Літовка

Інформація про роботу V всеукраїнської науково-практичної конференції «Індивідуальні психофізіологічні особливості людини та професійна діяльність» (16–18 травня 2014 р., Черкаси)

Науково-практична конференція з вивчення індивідуальних психофізіологічних властивостей людини, їхня роль в успішності навчання, набутті професійних навичок у трудовій і спортивній діяльності та використання в реальних умовах – це вже п'ята за роки їх зачаткування. Організаторами були Науково-дослідний інститут фізіології ім. Михайла Босого Черкаського національного університету ім. Богдана Хмельницького Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України, Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України та Науково-дослідний центр гуманітарних проблем Збройних Сил України Міністерства Оборони України. Конференцію присвячено 100-річчю від дня народження професора Босого Михайла Кононовича та 65-річчю Навчально-науковому інституту фізичної культури, спорту та здоров'я Черкаського національного університету ім. Богдана Хмельницького. На адресу оргкомітету надійшло 93 тез від 180 авторів з 17 міст України, які представлені 30 різними науково-дослідними та навчальними закладами і відомчими структурами.

Зі вступним словом виступила заступник голови оргкомітету, про- ректор з наукової роботи Черкаського національного університету, доктор педагогічних наук, професор Тарасенкова Н.А. та голова наукового комітету, провідний науковий співробітник відділу воєнно-психологічних досліджень Науково-дослідного центру гуманітарних проблем Збройних Сил України, доктор біологічних наук, професор Макаренко М.В. З доповіддю «Життєвий і творчий шлях професора Босого М.К.» виступив директор Науково-дослідного інституту ім. Михайла Босого, доктор біологічних наук, професор Лизогуб В.С.

Тематика конференції умовно була розподілена на три секції: «Психофізіологічні

властивості успішності навчання, трудової та спортивної діяльності людини», «Психофізіологічні аспекти когнітивної та фізичної праці» та «Психофізіологічне забезпечення професійної діяльності військових спеціалістів».

На пленарних засіданнях було заслухано чотири доповіді: «Психофізіологічні властивості успішності фахової діяльності антарктичних зимівників» (професор Мойсеєнко Є.В., Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ); «Особливості варіабельності серцевого ритму в умовах нейродинамічного навантаження чоловіків різної типології дихання» (професор Коваленко С.О., Науково-дослідний інститут фізіології ім. Михайла Босого); «Про загальні закономірності динаміки функціонального стану мозку при різних розумових та фізичних навантаженнях» (професор Босенко А.І., ДЗ «Південноукраїнський національний педагогічний університет ім. К.Д.Ушинського», м. Одеса) та «Фізіолого-гігієнічна оцінка фізичного виховання школярів із порушеннями в стані здоров'я», (доцент Светлова О.Д., Черкаський національний університет ім. Богдана Хмельницького). Як і в попередніх конференціях і симпозіумах, що проведені в м. Черкаси, найбільша кількість матеріалів надійшла з Києва та Черкас, а також з Херсонського державного університету та Східноєвропейського національного університету ім. Лесі Українки м. Луцьк. Прикро, але ні з Луганського державного медичного університету та ДЗ «Луганський національний університет ім. Тараса Шевченка», ні з Донецького національного університету, які завжди брали участь у цих наукових зібраннях, не було представників та не надіслано жодної роботи. Кримський регіон (Таврійський університет ім. В.Вернадського,

ДУ «Кримський медичний університет ім. С.І.Георгієвського», Кримський інженерно-педагогічний університет, Національний університет «Юридична академія України ім. Я. Мудрого» Кримського юридичного інституту м. Сімферополь) надіслав тези від 11 чоловік, але вчені на конференцію не приїхали.

Було заслухано й обговорено 26 доповідей за участю 80 учасників. Нове на конференції – озвучення методичних підходів в обстеженнях. Це імунологічні тести, реєстрація викликаних потенціалів та потенціалу Р300, реографія, реоенцефалографія, ортопроби та гіподинамія. Розширився діапазон об'єкта обстежень, в т.ч.: оператори мобільного зв'язку, пожежники-рятувальники, правоохоронці, діти-близнюки, діти-сироти, спортсмени-ветерани та спортсмени з вадами здоров'я тощо. Майже кожна доповідь викликала зацікавленість у слухачів і супроводжувалася жвавими диспутами.

У загальному обговоренні взяли участь професори Запорожець О.П., Босенко А.І., Коваленко С.О., Лизогуб В.С. та Макаренко М.В. Вони наголосили на важливість подальшого розвитку напрямків фізіології у вивченні надійності трудової діяльності людини на основі властивостей нервових процесів, започаткованих М.В. Макаренко, та фізіології нейродинамічних функцій, започаткованого В.С. Лизогубом. Починаючи з 1991 р., коли на базі тоді ще Черкаського державного педагогічного інституту ім. 300-річчя возз'єднання України з Росією, була проведена перша конференція «Індивідуальні психофізіологічні особливості людини та професійна

діяльність», а дещо пізніше симпозіум «Формування та становлення психофізіологічних функцій людини в онтогенезі» і дотепер, учасниками цих зібрань захищено 90 кандидатських та 30 докторських дисертацій. Нині наголошується на необхідності зв'язку фундаментальних і прикладних обстежень. Саме в цих працях чітко віддзеркалюється такий зв'язок, адже кожна із них закінчується висновками про можливість застосування отриманих експериментальних результатів у практику народного господарства. І, незважаючи на те, що ці напрямки ще декілька років тому вважалися пріоритетними, з приходом у директивні органи чиновників нового покоління, які ніколи такими обстеженнями не займалися і не займаються, їх почали планомірно гальмувати та знищувати. Ініціатори цього – окремі академіки й особи контролюючих структур, зокрема керівники та члени експертної ради, в якій десятки років працюють одні й ті самі представники, і вони не допускають в її членство науковців, котрі б могли об'єктивно оцінити значимість згаданих досліджень. Звичайно, це ненормальне явище і, як ми писали раніше, воно існувати довго не може. Ми впевнені, що ці напрямки знову займуть належне їм місце в науці. Вселяє надію реорганізація в системі освіти і науки.

Учасники конференції висловили щиру подяку колективу Науково-дослідного інституту фізіології ім. Михайла Босого, Навчально-наукового інституту фізичної культури, спорту і здоров'я, ректорату, усім хто брав участь в організації та проведенні конференції.

М.В.Макаренко
В.С.Лизогуб

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

Я.М. Шуба

П.Г. Костюк – учений, який виявив нові грані «живого» кальцію

Перший понеділок вересня 2014 р. – біля дверей у кабінет академіка П.Г. Костюка на другому поверсі нового корпусу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України не спостерігається метушні усміхнених, пожвавлених співробітників відділу загальної фізіології нервової системи з квітами і солодошами в руках, яка ще декілька років тому було такою типовою для цього дня. Річ у тім, що день народження Платона Григоровича припадає на 20-те серпня – розпал відпускового сезону, коли більшість співробітників та часто-густо і сам Платон Григорович були відсутні на робочому місті, а тому у відділі стало вже доброю традицією відкривати новий академічний рік після загального повернення у перший понеділок вересня саме з вітань імениннику. В цьому році йому б виповнилося 90, але вже 5 років як цей традиційний ритуал перервався, і нас вже ніколи не зустріне привітне обличчя академіка, який, побачивши нас, починав жваво викладати на довгий стіл для засідань незвичні для повсякдення напої. Ми вже не почуємо історії його життя, кожен раз збагачені новими цікавими подробицями, і не отримаємо від нього напуття на нові наукові здобутки в черговому академічному році. Вже 5-й рік поспіль доводиться в цей час надихатися тільки спогадами.

Платон Григорович про свій день народження говорив, що для нього це тільки привід черговий раз усвідомити наскільки доля була до нього прихильною. Йому пощастило в

© Я.М. Шуба

тому, що з чотирьох своїх захоплень – музики, іноземних мов, медицини і біології віддав перевагу, як справі свого життя, саме біології, в тому, що залишився неушкодженим під час бомбардувань Сталінграда фашистами та служби військовим фельдшером у Польщі та Східній Пруссії, в тому, що його дружиною стала Людмила Василівна Хохол-Зеленська, в тому, що його першим наставником у науці виявився видатний електрофізіолог академік Данило Семенович Воронцов, в тому, що його роботами зацікавився майбутній Нобелівський лауреат з фізіології і медицини (1963 р.) Джон Екклз (John Eccles) і запросив його на стажування до своєї лабораторії в Австралії, в тому, що у 1960 р., в часи щільної «залізної завіси» радянська влада все-таки дозволила йому виїхати до капіталістичної Австралії, в тому, що керівництво АН УРСР звернуло на нього увагу і в 1966 р. запропонувало очолити Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР, зрештою в тому, що в житті і науці його завжди оточували розумні, мотивовані і енергійні люди. Звичайно, апелювання до «прихильної долі» було тільки ознакою надзвичайної скромності Платона Григоровича, який ніколи не підкреслював значимості своєї персони. Насправді ж без його прекрасних людських якостей, непересічних здібностей, велетенської працездатності жодні досягнення були б не можливі. Зате всі ці якості Платона Григоровича добре помічали ті, хто будь коли з ним спілкувався – вітчизняні і зарубіжні колеги-науковці, співро-

бітники, партнери з науково-організаційної і громадської роботи. Свідченням цього є хоча б той факт, що такі всесвітньовідомі вчені, як винахідник найбільш популярної електрофізіологічної методики patch-clamp, Нобелівський лауреат Ервін Неєр (Erwin Neher), відкривач низькопорогових кальцієвих спайків Родольфо Лінас (Rodolfo Llinas), дослідник калієвої мембранної провідності Девід Браун (David Brown), авторитет у галузі кальцієвого сигналювання Оле Петерсен (Ole Petersen), спеціаліст із спряження збудження-скорочення Мартін Морад (Martin Morad) та багато інших, незважаючи на всю свою зайнятість, охоче відгукувалися на запрошення приїхати в Україну, щоб узяти участь у наукових конференціях, організовуваних на честь ювілейних дат до народження Платона Григоровича, та мати зайву можливість особисто з ним поспілкуватися.

Писати про видатного ученого і організатора науки, відомого громадського діяча, яким був Платон Григорович, невдячна справа. Здається вже все було сказано і написано, всі факти висвітлені і всі фотографії показані. Досить подивитися україно-, російсько- і англійськомовну версії Вікіпедії, прочитати книгу його особистих спогадів і роздумів «Над океаном часу» (Київ, «Наукова думка», 2005), переглянути низку документальних фільмів та пройти по численним посиланням в інтернеті, щоб отримати повне уявлення про його біографію, кар'єрне зростання, громадську роботу та науковий доробок. Тому я не буду повторюватись, а зосереджусь не на особі Платона Григоровича, як такої, а на улюбленому предметі його наукового інтересу – іонах кальцію та на співробітниках, які під його натхненням допомагали йому цей науковий інтерес задовольнити.

Історичне підґрунтя наукового інтересу

Ідеї про особливу роль кальцію не тільки як складової мінералізованих тканин, а і як важливого фактора скорочення м'язів, нейросекреції та клітинного електрогенезу поступово

розвивалися ще з кінця 19-го сторіччя, але тільки на початку 70-х років 20-го вдалося отримати дані, які вказували на універсальність кальцієвої сигнальної системи. Перші експерименти, які узгоджувались із сигнальною роллю для кальцію, були проведені на м'язах. Сідней Рінгер (S. Ringer) ще у 1883 р. встановив, що ізольоване серце зберігає свою скоротливість виключно у розчинах, які містять кальцій [1], але пройшло більш ніж 60 років до того як Хейльбран (L.V. Heilbrunn) і Вієрчинські (F.J. Wiercinski) за допомогою ін'єкції кальцію у м'язове волокно жаби довели, що ефект кальцію є специфічним і здійснюється внутрішньоклітинно [2]. М'язові препарати ще досить довгий час залишалися чи не єдиним об'єктом для такого роду досліджень, і розширення концепції кальцієвого сигналювання як на інші тканини, зокрема нервову, так і за межі процесів м'язового скорочення, відбувалося доволі повільно. Саме в таке розширення, яке найбільш бурно проходило в 60-70-ті роки минулого сторіччя, П.Г. Костюку поряд з такими корифеями світової фізіології, як Бернард Кац (Bernard Katz), Рікардо Міледі (Ricardo Miledi), Поль Фетт (Paul Fatt), Сузуму Хагівара (Suzumu Nagiwaru) довелося зробити вагомий внесок.

Учених перш за все цікавили шляхи постачання кальцію в цитоплазму клітин та які наслідки для її фізіологічної функції це має. Проведені дослідження дали початок концепції кальцієвої проникності клітинних мембран, тобто участі іонів кальцію в переносі трансмембранного струму, а звідси і у біоелектрогенезі, та їх ролі в активації нейросекреції.

Перші прямі вимірювання кальцієвого струму були здійснені Феттом і Гінсборгом (P. Fatt and B. Ginsborg) у 1958 р. на м'язових клітинах ракоподібних [3], які позбавлені здатності генерувати «натрієві» потенціали дії, зате мають у своїй мембрані потужну систему кальцієвої провідності. Водночас завдяки класичним працям Ходжкіна і співавт. було відомо, що гігантські нервові волокна

головоногих моллюсків генерують чисто «натрієві» потенціали дії, а кальцієва провідність їх мембрани є надзвичайно малою і не робить помітного внеску в електрогенез як потенціалу спокою, так потенціалу дії волокна [4]. Складалося враження, що кальцієвий струм потрібен тільки там, де слід зробити дещо більше, ніж просто згенерувати електричний сигнал. У зв'язку з цим поставало питання, а чи існує кальцієва провідність у сомі нейрона, де проходять основні метаболічні процеси, і в нервових закінченнях, з яких вивільняються нейромедіатори? Необхідність входу кальцію для активації секреції нейромедіаторів була переконливо продемонстрована в працях Каца і Міледі 60-70-х років, а от наявність специфічної кальцієвої провідності в сомі нейрона ще потрібно було довести.

У 1964 р. П.Г. Костюк у співавторстві з В.Д. Герасимовим і В.О. Майським за допомогою мікроелектродної техніки, в користуванні якою, до речі, Платон Григорович був піонером на теренах СРСР, показали здатність гігантських нейронів деяких видів прісноводних моллюсків генерувати потенціали дії в безнатрієвому середовищі за наявності іонів кальцію [5]. Можливість генерації «кальцієвих» потенціалів дії в безнатрієвому середовищі була незабаром підтверджена на нейронах морського моллюска – аплізії в низці інших лабораторій світу, а впродовж 60-70-х років продемонстрована на нейронах членистоногих, амфібій та багатьох типах нейронів ссавців. Отримані дані непрямо вказували на наявність кальцієвої провідності в соматичній мембрані нервової клітини, але для доведення факту існування в ній специфічного трансмембранного кальцієвого струму потрібні були прямі докази з використанням методу фіксації потенціалу.

Загалом, розповсюджена на той час мікроелектродна техніка електрофізіологічних досліджень давала змогу такі докази отримати і відповідні спроби були здійснені, але ця техніка зустрічалася з труднощами, коли потрібно було дослідити біофізичні власти-

вості кальцієвого струму. Найістотнішою з них була неможливість виділення в чистому вигляді компонента, який переноситься саме іонами кальцію, із загального трансмембранного струму нейрона, в створенні якого, як відомо, беруть участь і інші фізіологічні іони – Na^+ , K^+ , Cl^- . При цьому найбільше «клопоту» завдавали внутрішньоклітинні іони калію (зовнішньоклітинні натрію і хлору, зрештою, можна було легко замінити), потужний вихідний струм яких мав протилежний напрямок до вхідного кальцієвого струму, практично повністю його маскуючи. Оскільки мікроелектродна техніка можливості маніпуляцій з іонним складом цитоплазматичного середовища нейрона не надавала, то при її використанні доводилося сподіватися тільки на єдиний існуючий на початок 70-х років блокатор калієвого струму – тетраетиламоній, 100%-ва ефективність якого залишалася під великим сумнівом.

Ще одна проблема, яка поставала перед мікроелектродними дослідженнями полягала в тому, що вони проводилися на нейронах у складі гангліїв. Це перешкоджало ефективній заміні зовнішньоклітинних середовищ через обмеженість дифузії в міжклітинних просторах, огорожених сполучнотканинними оболонками, і не давало впевненості у повному усуненні натрію.

Тріумф внутрішньоклітинного діалізу

Отже, сподіватися на реальний прорив у вивченні кальцієвої провідності плазматичної мембрани нервової клітини можна було тільки з вирішенням двох ключових методичних проблем: 1) можливості роботи на ізольованих нейронах і 2) отримання доступу до цитоплазматичного середовища нейронів безпосередньо в процесі електрофізіологічного експерименту. І це саме той випадок, коли геній Платона Григоровича не тільки як вченого-експериментатора, а і як лідера командної роботи, що вмів розпізнати потенціал людини і правильно підібрати кадри для вирішення надскладних завдань, проявився сповна.

Електрофізіологія – це наука, пов’язана з вимірюванням надмалих електричних сигналів від живих об’єктів і тому вимагає прецензійного електронного обладнання. В 60–70-ті роки минулого сторіччя в світі ще не існувало індустрії, яка б займалася розробкою і виготовленням апаратного забезпечення електрофізіологічних досліджень, а тому кожна електрофізіологічна лабораторія світу здебільшого покладалася на власні сили в цих питаннях. Платон Григорович добре усвідомлював, що за таких умов, особливо коли ставляться амбіційні завдання з розробки нових методичних підходів, спиратися варто на кадри не стільки з хорошими біологічними знаннями, як з фізико-технічними. В цьому плані він часто зауважував, що фізика легше навчити біології, ніж біолога фізиці. Підібрана ним на початку 70-х років команда молодих, енергійних науковців відділу загальної фізіології нервової системи з базовою фізичною освітою, ключовими «гравцями» якої стали Олег Олександрович Кришталь і Володимир Іванович Підоплічко, змогла не тільки успішно подолати безліч конкретних методичних проблем, а і створити принципово нову, цілісну, як тепер прийнято говорити, «екосистему» електрофізіологічних досліджень. Стрижнем цієї системи став метод так званого «внутрішньоклітинного діалізу» клітин, а її допоміжними, обслуговуючими складовими – все від способів ферментативно-механічної ізоляції різних типів нейронів до технологій виготовлення діалізуючих пластикових мікропіпеток і вимірювальних електронних схем з усією супутньою оснасткою. Відтоді і до появи методу patch-clamp в середині 80-х трійка прізвищ – П.Г. Костюк, О.О. Кришталь, В.І. Підоплічко на всіх мовах стала асоціюватися із найпередовішою технікою електрофізіологічних досліджень у світі, а Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця АН УРСР, очолюваний П.Г. Костюком, перетворився у «Мекку» паломництва електрофізіологів світу, які бажали цю техніку освоїти.

Метод «внутрішньоклітинного діалізу»

описаний в багатьох вітчизняних і зарубіжних джерелах (див. [6] і [7] відповідно), в тому числі і в об’єкті прагнення всіх науковців світу – журналі «Nature» [8]. Сутність методу у його останній модифікації до болю проста (все геніальне – просто, але приходить у голову тільки вибраним!) і полягала у «вклеюванні» нейрона у отвір мікроскопічних розмірів, проколотий на вістрі виготовленої з поліетилену мікропіпетки. При цьому якщо мембрану нейрона, звернуту всередину мікропіпетки, механічно зруйнувати, то штучний, безкалієвий внутрішньоклітинний розчин, яким заповнювали мікропіпетку, за допомогою дифузії через отвір у мембрані проникне всередину нейрона, зрештою замінивши собою його природне цитоплазматичне середовище (на це потрібно було 1-2 хв). Тобто відбудеться «діаліз» нейрона штучно створеним експериментатором середовищем. Відсутність калію з цитоплазматичного боку мембрани нейрона гарантувала повне усунення калієвого струму і надавала можливість реєструвати кальцієвий струм в абсолютно чистому вигляді. Остання модифікація методу «внутрішньоклітинного діалізу» фактично стала прообразом методу patch-clamp, що прийшов на заміну, і єдина принципова відмінність якого полягала тільки у використанні скла замість поліетилену для виготовлення мікропіпеток.

П.Г. Костюк і очолювана ним команда сповна скористалися новими експериментальними можливостями, які відкрились, провівши впродовж 70-80-х років ґрунтовний опис ключових біофізичних властивостей (потенціалзалежність, кінетика, селективність) кальцієвого струму соматичної мембрани нервової клітини, довівши наявність в ній специфічних потенціалкероаних кальцієвих каналів, які його переносять, і зробивши на основі отриманих експериментальних даних важливі висновки щодо структурно-функціональної організації цих каналів. За результатами проведених досліджень було опубліковано безліч статей не тільки у віт-

чизняних журналах, а і в таких популярних міжнародних наукових виданнях, як «Nature», «Journal of Physiology» (London), «Journal of General Physiology», «Pflugers Archive», «Neuroscience», які привернули увагу всіх науковців світу і ввійшли в анали класики цитування (Citation Classics).

У зв'язку з цим відзначаю ще одну рису Платона Григоровича – його бажання донести отримані результати до якомога ширшого кола міжнародної наукової спільноти і тим самим утвердити лідируючий статус у світі як своєї наукової школи та Інституту, так і вітчизняної науки в цілому. Нагадаю, що це були роки тотального радянського контролю за всіма сферами діяльності, коли, навіть всі друкарські машинки обліковувались. Тому опублікування статті не те що у зарубіжному, а і у вітчизняному журналі вимагало проходження спеціальних експертних комісій, які давали заключення, що рукопис не містить секретних, антирадянських або інших заборонених до друку матеріалів. У випадку ж зарубіжних видань таких комісій було декілька відповідно до ієрархії відомчого підпорядкування організації, звідки виходила робота, а рукописи на розгляд потрібно було подавати у прошитому вигляді як на мові видання, так і їх дослівний переклад. Незважаючи на всі ці складнощі Платон Григорович наполягав, щоб кожен достойний результат був опублікований в англійській науковій літературі, всіяко стимулював до цього співробітників і сам докладав до цього значних зусиль. Важливість такого підходу стала особливо очевидною після розпаду СРСР, коли багато учнів Платона Григоровича виявилися за кордоном. При цьому їм не доводилося довго пояснювати, хто вони такі – їх імена були вже відомі, а коли поряд стояло ще і прізвище П.Г. Костюка, то це гарантувало ще і високу кваліфікацію.

«Постдіалізний» період

Після тріумфального опису кальцієвої провідності мембрани нервової клітини за допо-

могою методу внутрішньоклітинного діалізу Платон Григорович звертається до більш детальної характеристики різних аспектів функціонування нейрональних кальцієвих каналів. При цьому знову-таки велике значення має його прозорливість у підборі молодих співробітників, здатних реалізувати ідеї і концептуальні задуми свого Учителя. Саме з цією метою у 1980 р. Платоном Григоровичем на базі нашого Інституту була створена кафедра мембранної біофізики Московського фізико-технічного інституту, яка стала справжньою кузницею нових кадрів. На початку 80-х років світовий резонанс отримало доведення того факту, що селективність потенціалкеро-ваних кальцієвих каналів регулюється самими іонами кальцію: за фізіологічних умов вони пропускають виключно кальцій, але при відсутності зовнішньоклітинного кальцію вони стають проникними для натрію та низки інших одновалентних катіонів. Всебічне експериментальне обґрунтування цього факту було завершено П.Г. Костюком разом С.Л. Міроновим і Я.М. Шубою в 1983 р. і опубліковане в «Journal of Membrane Biology» [9]. При цьому була висунута революційна гіпотеза про існування із зовнішньоклітинного боку кальцієвого каналу високоафінного сайту зв'язування кальцію, який алостерично модулює властивості іонопровідної пори. Важливо зазначити, що це «структурне передбачення» було зроблено виключно на основі функціонально-реконструктивного підходу (тобто аналізом поведінки трансмембранних струмів за наявності різних концентрацій кальцію) і протирічило загальноприйнятій на той час точці зору. Підтвердження йому знаходиться тільки тепер з клонуванням кальцієвих каналів і розшифровкою їх структури.

При дослідженні кальцієвих струмів на діалізованих нервових клітинах був встановлений їх тісний взаємозв'язок із станом внутрішньоклітинного метаболізму (разом з С.А. Федуловою, М.С. Веселовським, П.О. Дорошенко, А.Е. Мартинюком, 1980-1983). Зокрема, були виявлені фактори, які у штуч-

ному внутрішньоклітинному середовищі є необхідною умовою для підтримання кальцієвих каналів у функціональному стані. З часу опублікування в журналі «Neuroscience» у 1981 р. [10] рецепт «коктейлю Костюка», обов'язковими компонентами якого є Mg-АТФ і цАМФ, став використовуватися всіма лабораторіями світу для забезпечення тривалої реєстрації кальцієвих струмів не тільки нервових, а і м'язових клітин в умовах діалізу. Ці дослідження показали, що у збудливих клітинах з недостатнім метаболізмом потенціалкерований вхід кальцію і, відповідно, процеси, які активуються іонами кальцію, будуть пригнічені і, таким чином, виявили один з механізмів ендогенної цитопротекції.

П.Г. Костюк був серед перших, кому вдалося показати неоднорідність кальцієвої провідності в межах однієї нервової клітини, чим були закладені основи сучасної класифікації потенціалкерованих кальцієвих каналів. Ним вперше був відкритий особливий тип низькопорогових кальцієвих каналів (разом з С.А. Федуловою, М.С. Веселовським, 1983), які здатні активуватися тільки після попередньої гіперполяризації потенціалу спокою нервової клітини, що їх виводить із стану стаціонарної інактивації. Ці канали виявилися виключно важливими для генерації періодичних хвиль потенціалу і пачкової активності нейрона. «Надсекретність» і «надпильність» радянської системи не дала змоги оперативно донести ці дані світовій науковій спільноті – повідомлення про це відкриття було спочатку опубліковано в «Доклады АН СССР» в 1983 р. [11], а англomовний варіант статті з'явився в «Journal of Physiology» (London) тільки в 1985 р. [12] – через що їх пріоритетність деякий час вважалася не визнаною. Знадобилося декілька років, щоб справедливість в цьому плані була відновлена. Остаточо це відбулося у 2008 р. на спеціально організованому в нашому Інституті міжнародному симпозиумі з нагоди 25-річчя відкриття низькопорогових кальцієвих каналів, на якому були присутні чи не всі причетні до їх дослідження науковці світу.

У першій половині 80-х років Платон Григорович ініціює поступовий перехід електрофізіологічного методичного арсеналу від «рідного» внутрішньоклітинного діалізу до щойно запропонованого світу методу patch-clamp. Як уже зазначалося, він базується на тих самих принципах, що і внутрішньоклітинний діаліз. Це і не дивно з огляду на те, що німецький фізіолог – один із винахідників patch-clamp Ервін Неер, який за проведені з його допомогою дослідження був удостоєний Нобелівської премії з фізіології і медицини за 1991 р., у 70-80-ті роки був частим гостем Платона Григоровича. Крім того, винахід у нас внутрішньоклітинного діалізу стимулював аналогічні пошуки і в інших лабораторіях світу, а тому подальший прогрес у цьому напрямку був неминучим. Перевагою скла над пластиком стало те, що мікропіпетки можна було виготовлювати з набагато меншим отвором і в цей отвір клітину вже не треба було «вклеювати» із застосуванням спеціальних адгезивних сумішей – за дотримання певних умов клітинна мембрана сама по собі була здатна «намертво» злипатися зі склом. Це мало два позитивні наслідки – 1) скляною мікропіпеткою можна було на поверхні клітини обмежити мікроскопічну ділянку мембрани (patch) настільки малих розмірів, що в ній міг міститися тільки один іонний канал (а це близько 1 квадратного мікрона) і 2) роздільна здатність відведення електричних сигналів підвищувалась настільки, що стало можливим вимірювати струм, який через цей канал проходить (близько одної трильйонної частинки ампера).

Платон Григорович одразу ж угледів переваги нового методу для переходу на якісно новий рівень досліджень кальцієвої провідності нейрональної мембрани – рівень активності поодиноких кальцієвих каналів. Пригадую, як наприкінці 1981 р., незабаром після виходу основоположної статті з описом методу patch-clamp [13] він підійшов до мене (я тоді був аспірантом 2-го року) і каже: «Слава, ти продовжуй працювати над темою своєї

дисертації, але паралельно, щоб не втрачати часу, намагався поставити метод patch-clamp і виміряти струм поодинокого кальцієвого каналу». Враховуючи, що метод patch-clamp – це теж своя досить складна «екосистема», поїхати і подивитися на яку «вживу» за умов СРСР годі було і думати, виконання цього завдання з нуля, можливо, зайняло трохи більше часу, ніж хотілося б для декларування повної пріоритетності, але у 1985 р. стаття з описом активності поодиноких кальцієвих каналів у мембрані нервової клітини в «Доклады АН СССР» все-таки вийшла [14] і принаймні в СРСР це були дійсно перші вимірювання такого роду. Надалі Платон Григорович приділяв велику увагу цим дослідженням, завдяки чому в численних працях 1985-1991 рр., опублікованих як у вітчизняних, так і зарубіжних виданнях, вдалося розвинути концепцію гетерогенності потенціалкерованих кальцієвих каналів нейрональної мембрани, провести всебічний аналіз відмінностей в біофізичних властивостях їх різних типів як на рівні інтегральних струмів цілого нейрона, так і на рівні елементарної активності, створити кінетичну модель активації кальцієвого каналу, яка синтезувала дані за елементарною активністю і макроскопічним струмам.

Перспективне передбачення розвитку методичного арсеналу досліджень і своєчасне впровадження передових методичних підходів загалом дуже характерне для Платона Григоровича. Так, ще на початку використання гетерологічної експресії каналних білків йому вдалося з успіхом застосувати цей підхід для того, щоб вперше за допомогою матричної РНК, виділеної з мозку щура, функціонально експресувати в чужорідній клітинній системі ооцитів (ікринок) жаби і проаналізувати біофізичні властивості низькопорогових кальцієвих каналів, характерних для мозку (разом з С.А. Федуловою, О.П. Любановою та Я.М. Шубою, 1988-1994). Застосування ж флуоресцентної кальційметрії (разом з О.В. Тепікіним і П.В. Беланом, 1987-1993) дало змогу здійснити перехід від окремого випадку

вивчення потенціалкерованого входу кальцію до створення інтегральної картини кальцієвої сигналізації нервової клітини, що включала також механізми вивільнення і захоплення внутрішньоклітинного кальцію ендоплазматичним ретикуломом, мітохондріями та його виведення назовні. Слід зазначити, що всі ці методичні інновації здійснювалися спочатку в умовах хронічного радянського дефіциту, а потім – українського безгрошів'я і супроводжувалися розробкою власної інструментальної бази, яка, подекуди, вірно служить і до цього часу.

Велику увагу Платон Григорович приділяв не тільки з'ясуванню фундаментальних основ кальцієвої сигналізації, а і її патофізіологічним аспектам, що потенційно дуже важливо для створення нових способів лікування. Ним були встановлені закономірності змін кальцієвого гомеостазу і окремих молекулярних механізмів, відповідальних за його підтримання, при старінні (разом із А.В. Шмиголем, Н.В. Войтенко і О.Н. Верхратським, 1993-1996), а також при таких патологічних станах, як епілепсія (разом з О.Н. Верхратським, 1992), діабетичні нейропатії (разом з Н.В. Войтенко и О.П. Костюк, 1999-2003), гіпоксія (разом з О.О. Лук'янець, 1999-2003), хвороба Альцгеймера (разом з О.П. Костюк, 2010). Ці дослідження показали, що для всіх патологій характерним є зменшення потенціалкерованого входу кальцію в нервову клітину і послаблення механізмів його виводу з цитоплазми. Платон Григорович до останніх днів зберігав щирий інтерес до науки, любив бути присутнім на експериментах, даючи при цьому слушні поради.

ЕПІЛОГ

Як автор великої кількості монографій і концептуальних оглядів, оснований на здобутках своєї наукової школи в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, П.Г. Костюк зробив неоцінений внесок у формування уявлень про кальцієву сигналізацію у нервовій системі.

Нервова система – це унікальне середовище, в якому електричні сигнали створюються завдяки потокам іонів. Ті в свою чергу взаємодіють з молекулами, призводячи до їх змін, а зміни в молекулах зворотно впливають на електричні і хімічні сигнали. В цій круговерті іони кальцію відіграють ключову роль і значною мірою є її рушійною силою. Прозорливість і талант нашого Учителя дали змогу спочатку передбачити важливість досліджень в цій галузі, а потім і забезпечити їх успіх. Внесок П.Г. Костюка в одну з найважливіших проблем нейрофізіології завжди залишиться в історії науки. Його учні, як ті, що тепер продовжують працювати в Інституті, так і ті, що волею долі опинилися в різних лабораторіях світу, завжди будуть надихатися його прикладом і з теплою згадувати часи роботи з ним.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ringer S. A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (London)*. 1883;4:29-43.
2. Heilbrunn LV, Wiercinski FJ. The action of various cations on muscle protoplasm. *J Cell Comp Physiol*. 1947 29:15-32.
3. Fatt P, Ginsborg BL. The production of regenerative responses in crayfish muscle fibres by the action of calcium, strontium and barium. *J Physiol*. 1958 Feb 17;140(2):59-60P.
4. Hodgkin AL, Keynes RD. Movements of labelled calcium in squid giant axons. *J Physiol*. 1957 Sep 30;138(2):253-81.
5. Gerasimov VD, Kostyuk PG, Maiski VA. Excitability of giant nerve cells of different representatives of pulmonate mollusks (Helix pomatia, Limnea stagnalis, Planorbis corneus) in solutions free of sodium ions. *Biull Eksp Biol Med*. 1964 Sep;58:3-7. Russian. [Герасимов ВД, Костюк ПГ, Майский ВА. Возбудимость гигантских нервных клеток различных представителей легочных моллюсков в растворах, не содержащих ионов натрия. *Бюл. Эксперим. Биол*. 1964;58(9):3-7].
6. Kostyuk PG, Krishtal OA. Mechanisms of electrical excitability of nerve cell. Moscow, "Nauka", 1981. Russian [Костюк ПГ, Крышталь ОА. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. Москва, «Наука», 1981].
7. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Intracellular perfusion. *J Neurosci Methods*. 1981 Oct;4(3):201-10.
8. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature*. 1975 Oct 23;257(5528):691-3.
9. Kostyuk PG, Mironov SL, Shuba YaM. Two ion-selecting filters in the calcium channel of the somatic membrane of mollusk neurons. *J Membr Biol*. 1983;76:83-93.
10. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents. *Neuroscience*. 1981;6(12):2431-7.
11. Veselovskii NS, Fedulova SA. 2 types of calcium channels in the somatic membrane of spinal ganglion neurons in the rat. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1983;268(3):747-50. Russian. [Веселовский НС, Федулова СА. Два типа кальциевых каналов в соматической мембране нейронов спинальных ганглиев крыс. *Докл Акад Наук СССР*. 1983;268(3):747-750].
12. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Two types of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*. 1985 Feb;359:431-46.
13. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981 Aug;391(2):85-100.
14. Kostyuk PG, Savchenko AN, Shuba IaM. Barium currents through single calcium channels of a nerve cell membrane. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1985;280(6):1459-62. Russian. [Костюк ПГ, Савченко АН, Шуба ЯМ. Бариевые токи через одиночные кальциевые каналы мембраны нервной клетки. *Докл Акад Наук СССР*. 1985;280(6):1459-62].

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

CONTENTS

K.O. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, O.V. Bazilyuk, L.G. Stepanenko, V.F. Sagach. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles in old rats	3
D.O. Minchenko, S.V. Danilovskyi, I.V. Kryvdiuk, N.A. Hlushchak, O.V. Kovalevska, L.L. Karbovskiy, O.H. Minchenko. Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells	11
A.I. Gozhenko, N.D. Filipets. The functional state of kidneys after adenosine triphosphate-sensitive potassium channels activation in experimental acute hypoxia	22
N.M. Voronych-Semchenko, T.V. Guranych. The changes of processes of free radical oxidation of lipids and proteins, antioxidant defence in rats with hypofunction of thyroid gland under iodine and copper deficit	30
I.V. Byelinska , O.V. Lynchak , T.V. Rybalchenko , O.M. Gurnyak. Hematological effects of the protein kinases inhibitor maleimide derivative of dimethylhydrazineinduced colorectal carcinogenesis of rats	40
A.I. Bereznyakova, V.F. Cheremisina, O.D. Jemela. Systemic and local immunity in rats with atopic dermatitis	50
B. Mankovsky, A. Urbanovych. The blood leptin content and the activity of the zonal system response in patients with diabetes mellitus type 2 with different body weight and disease duration	56
L.M. Gunina, J.D. Vynnychuk. Tissue hypoxia and related changes of homeostasis during vibration load in athletes: influence on physical performance	61
I. V. Ferents, I. V. Brodyak, M. Ya. Lyuta, O. R. Kulachkovsky, N. A. Sybirna. Effects of agmatine treatment on morphofunctional characteristics of the erythron in experimental diabetes mellitus in rats	70
Yu.O. Fedotova, G.O. Frolova. The influence of stimulation and blockade of A4 β 2 nicotinic acetylcholine receptors on learning of female rats in key phases of ovary cycle	80
V.V. Trush, V.I. Sobolev. Thyroxine caused modulation of dexamethasone effects on the skeletal muscle of white rats	87
V.A. Berezovskyi, E.G. Chaka, I.G. Litovka, M.I. Levashov, R.V. Yanko. The effect of altered oxygen partial pressure on the resistance to hypoxia and expression of oxygen-sensitive genes in drosophila melanogaster	97
L.P. Gordienko, T.B. Beregova, K.S. Neporada, T.M. Falaleyeva. Oxidative stress development in the tissues of salivary glands of rats under monosodium glutamate-induced obesity	105
CRONICLE	108
JUBILEE DATES	112