

Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 6 2015

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Драчук К.О., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф.</i> Донор сірководню NANS відновлює конститутивний синтез NO та ендотеліязалежне розслаблення в аорті старих щурів	3
<i>Ісаєва О.В., Лунько О.О., Романов А.К., Ісаєв Д.С.</i> Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну пластичність соматосенсорної кори мозку щурів	11
<i>Будько А.Ю., Струтинська Н.А., Охай І.Ю., Семеніхіна О.М., Сагач В.Ф.</i> Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу	17
<i>Тихомиров А.О., Жерносеков Д.Д., Рока-Мойя Я.М., Діордієва С.І., Гриненко Т.В.</i> Вплив LYS-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини	26
<i>Гончар О.О., Носар В.І., Братусь Л.В., Тимченко І.М., Стешенко М.М., Маньковська І.М.</i> Енергетичний та антиоксидантний статус мітохондрій печінки щурів за умов гіпоксії-реоксигенації різної тривалості	35
<i>Маньківська О.П., Мазниченко А.В., Пількевич Н.О., Майський В.О., Власенко О.В., Довгань О.В.</i> НАДФН-діафоразна активність у вентральному розі спинного мозку котів при гострому м'язовому запаленні	46
<i>Вовкун Т.В., Янчук П.І., Штанова Л.Я., Шаламай А.С.</i> Кровотік в органах травлення щурів з гострим панкреатитом за умов застосування корвітину	53
<i>Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Гаєвська Ю.О., Челомбітько О.В., Бондарович М.О., Дубрава Т.Г., Останков М.В., Клочков В.К., Кавок Н.С., Малюкін Ю.В.</i> Функціональна активність клітин аденокарциноми Ерліха після обробки гібридними наноконплесами	60
<i>Чернозуб А.А., Радченко Ю.А.</i> Особливості визначення оптимальних безпечних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців при підготовці та в умовах, близьких до бойових дій	69

<i>Довбинчук Т.В., Закордонець Л.В., Путніков А.В., Варенюк І.М., Тяпко О.П., Рослова Н.М., Сергійчук Т.М., Линчак О.В., Держинський М.Е., Берегова Т.В., Толстанова Г.М.</i> Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу	76
<i>Горенко З.А., Грінченко О.А., Весельський С.П., Бабан В.М.</i> Склад шлункового соку та жовчі щурів при хронічному панкреатиті	86
<i>Кузнєцова М.Ю., Галенова Т.І., Савчук О.М., Верещак В.В., Остапченко Л.І.</i> Вуглеводний обмін при цукровому діабеті 1-го типу у щурів за умов застосування водного екстракту лушпиння квасолі звичайної	96
<i>Останів Р.Д., Манько В.В.</i> Дихання та окисне фосфорилювання мітохондрій тканин щурів за перорального введення таурину	104
<i>Забуга О.Г., Коляда О.К., Кухарський В.М., Бажинова А.І., Вайсерман О.М.</i> Вплив обмеження харчування в період розвитку <i>Drosophila melanogaster</i> на активність ферментів системи антиоксидантного захисту	114
<i>Думанська Г.В., Рихальський О.В., Веселовський М.С.</i> Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus в умовах кокультури	119
ОГЛЯДИ	
<i>Чекман І.С.</i> Фізіологічні та фармакологічні властивості нанорозмірних структур	129
РЕЦЕНЗІЇ	
Монографія П.І. Янчука «Нейрогуморальна регуляція кровообігу і тканинного дихання печінки» (Київ: «Вік принт», 2014. – 304 с.)	139
ХРОНІКА	
19-й з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (Львів, 24-26 травня 2015 р.)	143

Донор сірководню NaHS відновлює конститутивний синтез NO та ендотелійзалежне розслаблення в аорті старих щурів

К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: 8701dk@ukr.net

Вивчали вплив донора сірководню NaHS на показники окисного (як оксидативного, так і нітрозативного) стресу, стан спряження конститутивних NO -синтаз (cNOS) та ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) у аорті старих щурів. Встановили розвиток оксидативно-нітрозативного стресу у старих тварин, які не отримували NaHS . Наслідком цього в аорті викликався неспряжений (uncoupling) стан cNOS і зниження конститутивного синтезу NO . Результатом цих біохімічних процесів було порушення ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти, амплітуда якого становила у старих тварин $7,5 \pm 1,4\%$ порівняно з $64,9 \pm 3,5\%$ в контрольній групі дорослих тварин. Показано, що NaHS суттєво пригнічував оксидативний і нітрозативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез NO . Це сприяло поліпшенню ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти, амплітуда якого у старих тварин, що отримували NaHS , збільшувалася до $48,8 \pm 1,9\%$.

Ключові слова: старіння; ендотеліальна дисфункція; оксидативний стрес; нітрозативний стрес; неспряження cNOS ; сірководень; оксид азоту.

ВСТУП

Оксид азоту (NO) – ключовий фактор, що забезпечує нормальну реалізацію ендотелійзалежного розслаблення. Основним шляхом його синтезу в судинах є окисний метаболізм L -аргініну під дією кальційзалежних конститутивних NO -синтаз ($\text{cNOS} = \text{eNOS} + \text{nNOS}$). Синтезований в ендотелії NO дифундує в гладенькі м'язи (ГМ), активує розчинну гуанілатциклазу (рГЦ) і збільшує утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). В результаті активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка зменшує вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що викликає розслаблення ГМ [1]. Існують докази і про прямий релаксуючий вплив NO на ГМ, при якому відбувається рГЦ/цГМФ-незалежна активація Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума і зменшення цитозольного Ca^{2+} [2]. Також показана здатність NO викликати

релаксацію ГМ судин не зменшенням внутрішньоклітинного вільного Ca^{2+} , а через зниження спорідненості до нього скоротливих білків [3].

Оснóву порушення ендотелійзалежного розслаблення судин при старінні становить зниження вмісту NO , яке зумовлене такими патофізіологічними механізмами, як окисний стрес, зростання активності ренінангіотензинової системи, неспряження cNOS , підвищення активності вазоконстрикторних факторів тощо [4].

Однією із речовин, вплив яких стимулює утворення NO , пригнічує окисний стрес і активність ренінангіотензинової системи є сірководень (H_2S) [5–7]. Особливої уваги потребує питання взаємодії H_2S і NO . Згідно з останніми даними, H_2S може збільшувати синтез NO як через фосфорилування cNOS за PI3K/Akt -сигнальним механізмом, так і незалежно від нього [5, 8]. Також відомо, що

© К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

сірководень здатен пригнічувати фосфодіестеразу, фермент, що розщеплює цГМФ у клітині, і пролонгувати цим самим дію NO на ГМ [9–11]. Це дає можливість припустити, що H_2S відновлює порушену при старінні ендотеліальну функцію судин, покращує NO-залежне розслаблення, його можна розглядати як фактор профілактики таких асоційованих зі старінням захворювань, як артеріальна гіпертензія, атеросклероз, діабетична ангіопатія тощо.

Метою нашої роботи було дослідити в аорті старих щурів вплив донора H_2S , NaHS на конститутивний синтез NO, ендотелійзалежне розслаблення ГМ, показники оксидативно-нітрозативного стресу та спряження cNOS.

МЕТОДИКА

Ендотелійзалежне розслаблення ГМ проводили на ізольованих препаратах грудної аорти щурів-самців лінії Вістар віком 8 міс (дорослі, $n=10$) та 22–24 міс (старі, $n=20$), масою 300–370 г з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

У щурів виділяли грудну аорту, нарізали на кільцеві препарати і за загальноприйнятою методикою в режимі, наближеному до ізотонічного, реєстрували скоротливу активність ГМ [12]. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін (10^{-5} моль/л, “Sigma”, США). Стійкий рівень залежного від цієї речовини скорочення («плато») приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін (10^{-5} моль/л, “Sigma”, США). Вплив модулятора ендогенного сірководню вивчали за допомогою екзогенного донора H_2S – NaHS (10^{-3} моль/л, “Sigma”, США), у якому інкубували кільцеві препарати аорти (30 хв), а також його додавали в перфузійні розчини. Для пригнічення утворення NO *in vivo* використовували метиловий ефір NG-нітро-L-аргініну (L-NAME, 3×10^{-4} моль/л,

“Sigma”, США), інгібітор активності cNOS.

У цільних препаратах аорти визначали біохімічні показники, які є маркерами оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного ($^*O_2^-$) і гідроксильного (*OH) радикалів, пули пероксиду водню (H_2O_2). Для встановлення шляхів генерації супероксиду визначали його утворення за дії циклооксигенази (маркер тромбоксан B_2 (TxB_2)) та ліпоксигенази (маркер лейкотрієн C_4 (LTC_4)), а також потужної пуринової ксантинооксидази (маркер сечова кислота). Маркерами вільно-радикального перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) були пули дієнових кон’югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) [13]. Крім того, визначали активність конститутивного синтезу NO, оцінюючи кальційзалежну активність cNOS і показники нітрозативного стресу: надлишкового *de novo* синтезу NO, оцінюючи кальційнезалежну активність індукцибельної NO-синтази (iNOS), реутилізаційного (salvage) синтезу NO — визначаючи активність нітрат-редуктази, а його декомпозиційного синтезу — оцінюючи пули низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). Утворення пероксинітриту оцінювали за допомогою визначення пулів стабільного метаболіту NO – нітрат-аніона (NO_3^-) – продукту нерадикального розпаду пероксинітриту. Визначали також пули нітрит-аніона (NO_2^-) як маркера оксигенації аорти та пули ендогенного H_2S , що може бути, згідно з нашою гіпотезою [12, 14], регулятором спряженого-неспряженого стану cNOS [15]. Активність cNOS-залежного шляху утворення $^*O_2^-$ оцінювали за зміною індексу спряження cNOS, який розраховували через відношення активності cNOS до швидкості генерації $^*O_2^-$ [16]. Крім стаціонарних пулів у контрольних дорослих і старих тварин, визначали також зміни цих показників за підвищення ендогенного вмісту H_2S за допомогою введення *in vivo* NaHS (56 мг/кг, внутрішньоочеревино за 30 хв до декапітації). Отримані результати представлені у відсотках відносно значення показників у дорослих тварин, які приймали за 100 %.

Результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 8,5 (Microcall Inc., США). Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що додавання ацетилхоліну (10^{-5} моль/л) до перфузійного розчину завжди призводило до типового розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти. У дорослих щурів середнє значення амплітуди становило $64,9 \pm 3,5\%$, $P < 0,05$ ($n=10$). У старих щурів амплітуда розслаблення ГМ була майже в 9 разів меншою за контроль. Середнє її значення становило $7,5 \pm 1,4\%$, $P < 0,05$ ($n=10$). Додавання до перфузійного розчину

NaHS і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв збільшувало амплітуду розслаблення на ацетилхолін більш ніж у 6 разів. Середнє її значення становило $48,8 \pm 1,9\%$, $P < 0,05$ ($n=10$; рис 1).

Ми припустили, що NaHS відновлює ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти старих щурів внаслідок збільшення секреції ендотеліальними клітинами конститутивного NO. Для підтвердження цього у наступній серії дослідів NaHS додавали одночасно із блокатором синтезу NO – L-NAME. На фоні NaHS та L-NAME спостерігалось значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на ацетилхолін. Середнє значення його амплітуди було $2,5 \pm 1,4\%$, $P < 0,05$ ($n=10$).

Для встановлення можливих механізмів

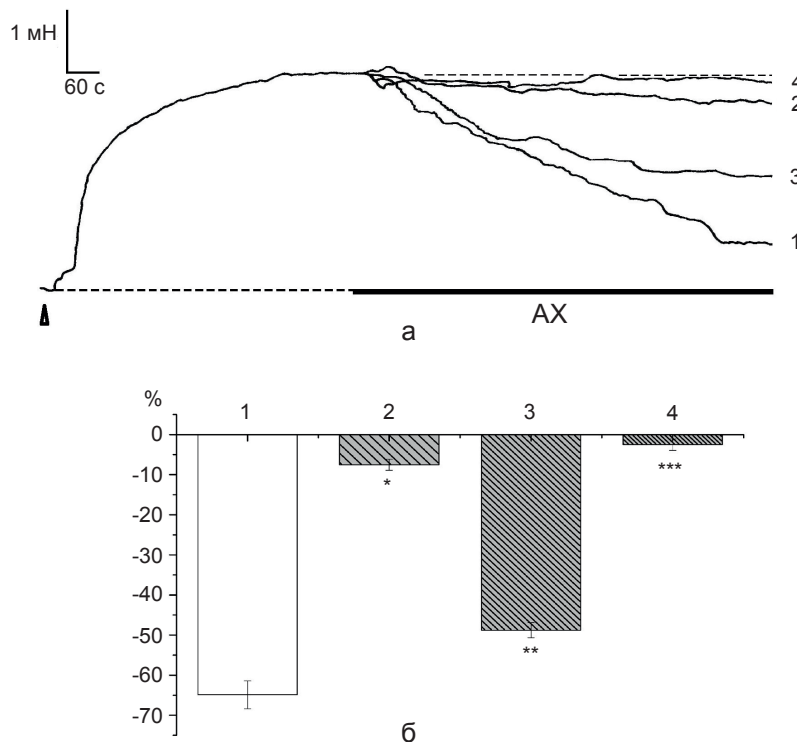


Рис. 1. Вплив NaHS на ацетилхолін (AX)-індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: а – нативна крива, б – стовпчикова діаграма; 1 – дорослі (контроль), 2 – старі, 3 – старі після введення в перфузійний розчин NaHS, 4 – старі при одночасному введенні в перфузійний розчин NaHS та L-NAME. Темна лінія під кривими – тривалість дії AX. 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. * $P < 0,05$ відносно значення у дорослих тварин, ** $P < 0,05$ відносно значення у старих тварин, яким не вводили NaHS; *** $P < 0,05$ відносно значення у старих тварин при дії NaHS

впливу NaHS на ендотелійзалежне розслаблення ми провели серію біохімічних дослідів. Як видно з рис. 2, в аорті старих щурів розвивається оксидативний стрес. Так, сумарна швидкість генерації $^*O_2^-$ перевищувала контрольні (у дорослих) значення в 5,8 разів. Дисмутація нестабільного радикала $^*O_2^-$ в стабільний H_2O_2 перевищувала контрольні значення в 4,3 раза. Швидкість утворення найбільш активного радикала кисню *OH , який утворюється із H_2O_2 в реакції Фентона, була збільшена майже в 12 разів. Як відомо, *OH -радикал ініціює ПОЛ, первинними і вторинним продуктами якого є ДК і МДА відповідно [17]. Пули ДК були збільшені у 4,4, а МДА – у 6,5 разів, що є свідченням високої інтенсивності ПОЛ в аорті старих тварин. Ми дослідили також інтенсивність декількох основних шляхів утворення $^*O_2^-$ (ініціатора оксидативного стресу) в цільних гомогенатах аорти щурів різних експериментальних груп. Так, пули LTC_4 , які характеризують активність ліпоксигеназного генератора $^*O_2^-$ і пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантиноксидази і одночасно є

маркером гіпоксії та деградації АТФ, перевищували контрольні значення у 2,7 і 8,3 разів відповідно. Вірогідно не відрізнявся від контролю лише вміст TxB_2 , який є маркером циклооксигеназного шляху генерації супероксиду (див. рис. 2).

Одночасно з розвитком оксидативного стресу і ПОЛ в аорті старих щурів спостерігали і нітрозативний стрес (рис. 3). Про це свідчить значне підвищення надлишкового *de novo* синтезу NO (підвищення активності іNOS), його реутилізаційного (підвищення активності нітратредуктази) і декомпозиційного синтезу (зниження пулів НМНТ). Результати також показали, що розвиток оксидативно-нітрозативного стресу і значна інтенсифікація вільнорадикального процесу ПОЛ в аорті старих тварин призводила до зниження активності cNOS у 3 рази, що може свідчити про дефіцит вазорелаксуючої фракції NO – конститутивного NO через порушення його конститутивного синтезу ферментами cNOS. Причиною останнього може бути неспряжений стан cNOS (синтез ним більшою мірою $^*O_2^-$ замість NO), на що

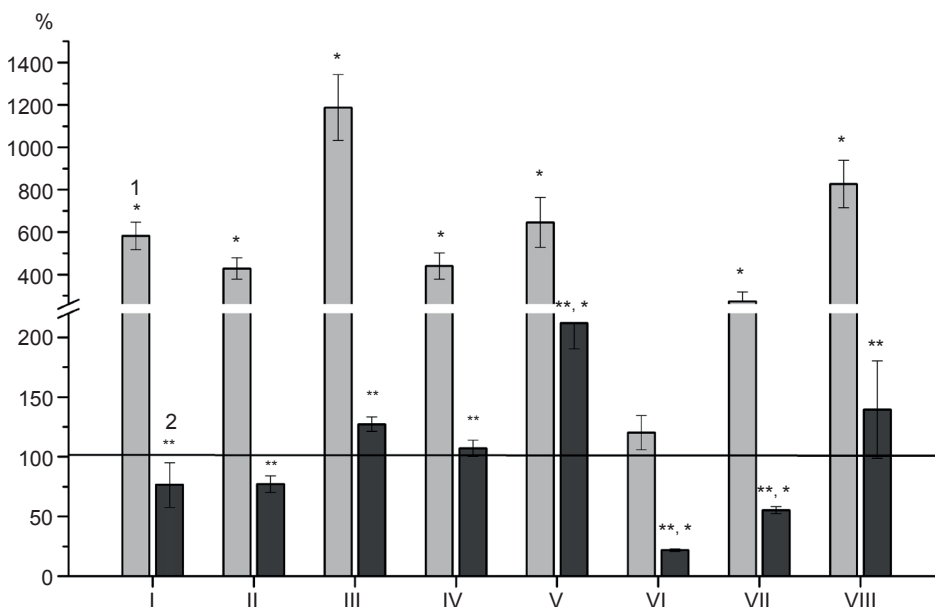


Рис. 2. Відносні значення показників оксидативного стресу в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS: I – швидкість генерації $^*O_2^-$; II – вміст H_2O_2 ; III – швидкість генерації *OH ; IV – вміст дієнових кон'югатів; V – вміст малонового діальдегіду; VI – вміст тромбоксану B_2 ; VII – вміст лейкотрієну C_4 ; VIII – вміст сечової кислоти. * $P < 0,05$ відносно значення у дорослих тварин (100 %). ** $P < 0,05$ відносно значення у старих щурів, яким не вводили NaHS

вказує зниження майже у 20 разів розрахованого нами індексу спряження cNOS (рис 4). Неспрямлення cNOS може розвиватися внаслідок зменшення пулів субстрату синтезу NO de novo L-аргініну через посилення аргіназної активності в аорті старих щурів у 3,4 раза, (див. рис. 3) або зниження пулів кофактора cNOS — тетрагідробіоптерину (BH_4), в результаті його окиснення радикалом $^*\text{O}_2^-$ або пероксинітридом (ONOO^-) [4]. Нами було встановлено достовірне посилення генерації супероксиду (див. рис.2), і утворення пероксинітриду, про що свідчить вірогідне (майже в 6 разів) підвищення пулів нітрат-аніона — продукту нерадикального розпаду пероксинітриду (див. рис. 3) в аорті старих щурів. Так що обидві вищезгадані причини неспряження cNOS можуть спостерігатися при старінні, призводячи, з одного боку до підвищення генерації супероксиду неспряженою cNOS в аорті старих тварин, з іншого — до зниження синтезу конститутивного NO цими ферментами, тим самим зменшуючи ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти цих тварин (див. рис. 1).

Таким чином, підвищення декомпозиції НМНТ у старих тварин є компенсаторною реакцією на зниження конститутивного de novo синтезу вазодилаторного NO ферментами cNOS. У наших дослідженнях пули НМНТ були достовірно зниженими майже у 2 рази (див. рис. 3). У свою чергу надлишковий, недилаторний NO (синтезований de novo ферментом iNOS, або реутилізацією нітрат-чи нітрит-аніонів відповідними редуктазами в гіпоксичних умовах) при взаємодії з $^*\text{O}_2^-$ утворює пероксинітрид (ONOO^-) із широким спектром пошкоджувальної дії — від ПОЛ, інактивації ферментів і іонних каналів до інгібування мітохондріального дихання [18–20]. Продуктом нерадикального розпаду ONOO^- (після його протонування) є NO_3^- , пули якого в аорті старих тварин перевищували контрольні значення в 5,6 раза (див. рис. 3). Продуктами радикального розпаду протонowanego пероксинітриду є ОН-радикал і радикал діоксиду азоту ($\cdot\text{NO}_2$) — обидва радикали — ініціатори ПОЛ.

Окремо слід відмітити в аорті старих тварин достовірне зниження (в 1,6 разів)

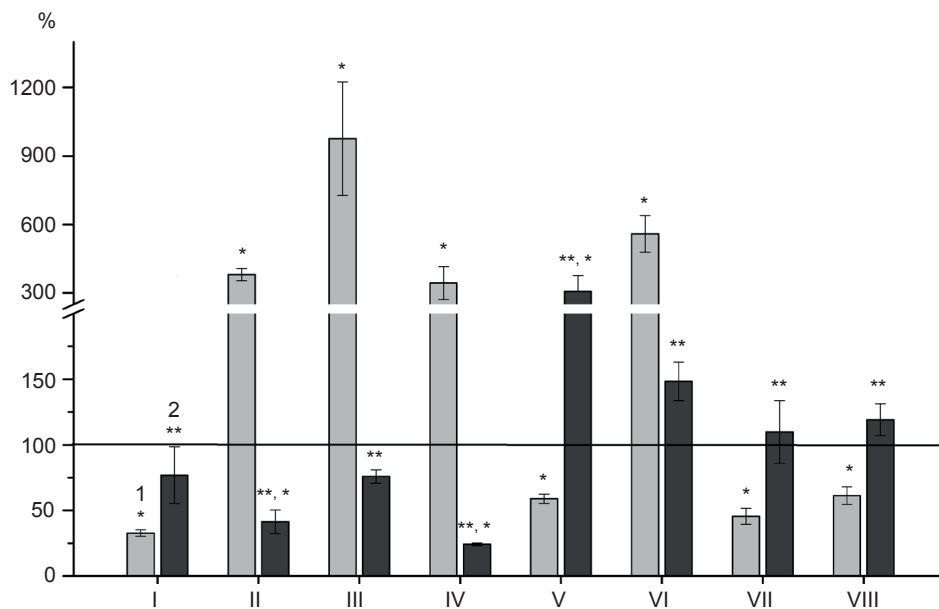


Рис. 3. Відносні значення показників нітрозативного стресу, конститутивного синтезу дилаторного NO та H_2S в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS: I – активність cNOS, II – активність iNOS, III – нітратредуктазна активність, IV – аргіназна активність, V – вміст NO_2^- , VI – вміст NO_3^- , VII – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, VIII – вміст H_2S . * $P < 0,05$ відносно дорослого контролю (100 %); ** $P < 0,05$ відносно значення у старих щурів

ендогенних пулів H_2S , регулятора спряжено-неспряженого стану cNOS, тобто конститутивного синтезу дилататорного NO і потужного кардіо- і васкулопротектора (див. рис. 3, 4).

Таким чином, в аорті старих тварин в результаті окисного стресу і неспряження cNOS знижується конститутивний синтез дилататорного NO і збільшується утворення високотоксичного пероксинітриду. Наслідок цих процесів – глибоке порушення ендотелій-залежного розслаблення ГМ аорти у старих тварин.

Введення *in vivo* NaHS старим тваринам значно збільшувало ендогенні пули H_2S в аорті (див. рис. 3). Це супроводжувалося суттєвим пригніченням як окисного стресу, в результаті інгібування генерації $^*O_2^-$ (див. рис.2), так і нітрозативного стресу (див. рис. 3) через зменшення надлишкового утворення NO і його високотоксичного похідного ONOO $^-$. Одночасно відновлювався спряжений стан cNOS і посилювався конститутивний синтез

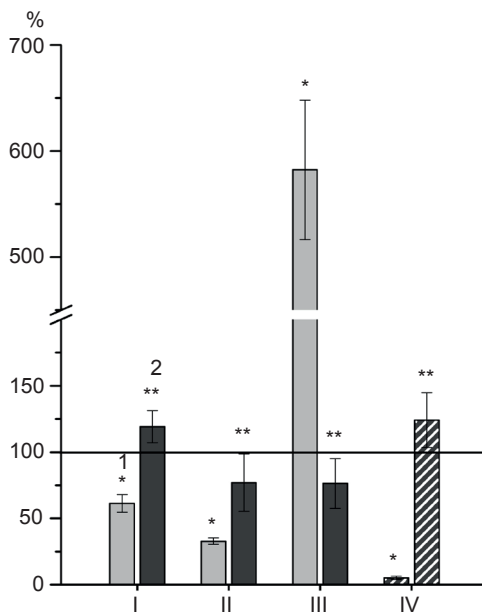


Рис. 4. Відносні значення індексу спряження конститутивних NO-синтаз та пов'язаних з ним показників в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS: I – вміст H_2S , II – активність cNOS, III – швидкість генерації $^*O_2^-$, IV – індекс спряження. * $P < 0,05$ відносно дорослих щурів (контроль, 100%); ** $P < 0,05$ відносно старих щурів

вазорелаксуючого NO (див. рис. 4). Останнє покращувало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти у старих тварин після введення в організм донора сірководню. Ці результати підтверджують нашу гіпотезу [12, 14, 15] про важливу роль сірководню у відновленні спряженого стану cNOS і конститутивного синтезу дилататорного NO (такі речовини називають декаплерами (decapler). Таким чином, результати нашої роботи свідчать про те, що сірководень – потужний декаплер, як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*.

ВИСНОВКИ

1. У старих тварин значно порушується ендотелійзалежне ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів аорти.

2. Введення *in vitro* донора сірководню (NaHS) в перфузійний розчин підвищувало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів, яке знижувалося при введенні в перфузійний розчин інгібітора конститутивного синтезу дилататорного NO – L-NAME.

3. В ГМ і ендотеліальних клітинах аорти старих щурів знижуються ендогенні пули H_2S , розвивається окисативний і нітрозативний стрес, наслідком якого є розвиток неспряженого стану cNOS, за якого ці ферменти (eNOS і nNOS) кальційзалежного конститутивного *de novo* синтезу NO більшою мірою генерують $^*O_2^-$ замість дилататорного NO.

4. NaHS (донор H_2S), введений *in vivo* в організм старих тварин, пригнічував окисативний і нітрозативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез дилататорного NO.

K.O. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach

HYDROGEN SULFIDE DONOR, NAHS, RECOVERS CONSTITUTIVE NO SYNTHESIS AND ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION OF ISOLATED AORTA IN OLD RATS

The objective of this study was to show the effect of H_2S donor, NaHS on the endothelium-dependent vasorelaxation, free

radical state and cNOS uncoupling in old rats. In the aorta of old rats a combined oxidative and nitrosative stress develops that leads to cNOS uncoupling and decreased constitutive synthesis of the NO. That biochemical changes correlate with lowering of the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles ($7,5 \pm 1,4\%$, compared with $64,9 \pm 3,5\%$ in adults). It was found that, due to the combined inhibition of oxidative and nitrosative stress, NaHS restores constitutive de novo synthesis of NO by restoring cNOS coupling. Additionally, NaHS improves endothelium-dependent vasorelaxation by increasing (by 6,5 times) Ach-induced relaxation of aortic smooth muscles.

Key words: aging; endothelial dysfunction; oxidative stress; nitrosative stress; cNOS uncoupling; hydrogen sulfide; nitric oxide.

К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

ДОНОР СЕРОВОДОРОДА NAHS ВОССТАНАВЛИВАЕТ КОНСТИТУТИВНЫЙ СИНТЕЗ NO И ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ В АОРТЕ СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияния донора эндогенного сероводорода, NaHS на показатели окислительного (как оксидативного, так и нитрозативного) стресса, состояние сопряжения конститутивных NO-синтаз (cNOS) и эндотелийзависимое расслабление гладких мышц (ГМ) аорты у старых крыс. Установили развитие оксидативного и нитрозативного стресса у животных, которые не получали NaHS, следствием чего было несопряжение (uncoupling) состояния cNOS и снижение конститутивного синтеза NO. В результате данных биохимических сдвигов нарушалось ацетилхолиндуцированное расслабление ГМ аорты, амплитуда которого $7,5 \pm 1,4\%$ по сравнению с $64,9 \pm 3,5\%$ в контрольной группе взрослых животных. Показано, что NaHS существенно угнетал оксидативный и нитрозативный стресс, восстанавливал сопряжение cNOS и увеличивал конститутивный синтез NO. Это способствовало улучшению ацетилхолиндуцированного расслабления ГМ аорты, амплитуда которого у старых животных, получавших NaHS, увеличивалась до $48,8 \pm 1,9\%$.

Ключевые слова: старение; эндотелиальная дисфункция; оксидативный стресс; нитрозативный стресс; несопряжение cNOS; сероводород; оксид азота.

REFERENCES

- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525-63.
- Van Hove CE, Van der Donckt C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(3):920-30.
- Soloviev A, Lehen'kyi V, Zelensky S, Hellstrand P. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. *Cell Calcium.* 2004;36(2):165-73.
- El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* 2012;28;3:132.
- 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.
- Streeter E, Ng HH, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res.* 2013;3(1):9.
- Qiao WL, Yang WX, Liu L, Shi Y, Cui J, Liu H, et al. Exogenous hydrogen sulfide reduces vascular aging in D-galactose-induced subacute aging rats. *Sheng Li Xue Bao.* 2014;66(3):276-82.
- 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 U S A.* 2014;111(8):3182-7.
- Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(10):1998-2004.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9161-6.
- Beltowski J, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules.* 2014; 19(12):21183-99.
- Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh.* 2014; 60(4):3-10. [Ukrainian].
- Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
- Dorofeyeva NA, Kotsuruba AV, Kopjak BS, Sagach VF. Physical exercise training cancels constitutive NOS uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamics in hypertension (part III). *Fiziol Zh.* 2015; 61(4):11-21 [Ukrainian].
- Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
- Kotsiuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. NOS uncoupling is accompanied with induction of the oxidative stress and the cardiohemodynamics disturbances in hypertension. *Fiziol Zh.* 2015; 61(3):3-10. [Ukrainian].

17. Sergent O, Morel I, Cogrel P, Chevanne M, Padeloup N, Brissot P, et al. Simultaneous measurements of conjugated dienes and free malondialdehyde, used as a micromethod for the evaluation of lipid peroxidation in rat hepatocyte cultures. *Chem Phys Lipids*. 1993; 65(2):133-9.
18. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5):1424-37.
19. Szabó C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 1996; 6(2):79-88.
20. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995;268(5):699-722.

*Матеріал надійшов
до редакції 07.05.2015*

Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну пластичність соматосенсорної кори мозку щурів

О.В. Ісаєва, О.О. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Ісаєв

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

З використанням експериментальної моделі неонатальних повторюваних судом досліджено вплив епілептичних нападів на різні форми синаптичної пластичності нейронів соматосенсорної кори. Встановлено, що судомні напади, індуковані флуротилом у ранній період життя, не впливають на депресію постсинаптичних потенціалів нейронів II шару соматосенсорної кори головного мозку, викликану високочастотною стимуляцією IV шару відповідної колонки та посттетанічну потенціацію амплітуди постсинаптичних потенціалів, але призводять до хронічного підвищення довготривалої потенціації збуджувальної синаптичної передачі цих нейронів. Описані зміни синаптичної пластичності можуть впливати на обробку сенсорної інформації у пацієнтів, у яких спостерігалися рекурентні судоми в період раннього розвитку.

Ключові слова: епілепсія; соматосенсорна кора; синаптична пластичність; флуротил

ВСТУП

Судомні напади у новонароджених дітей – часті клінічні прояви уражень нервової системи і пов'язані зі значним ризиком хронічних наслідків, у тому числі з епілепсією, когнітивними та поведінковими порушеннями [1, 2]. Багато клінічних, а також фундаментальних досліджень вказують, що епілептичні напади незалежно від етіології негативно впливають на розвиток нервової системи [3, 4].

У попередніх дослідках, з використанням флуротилової моделі повторюваних епілептичних судом в неонатальний період, показано, що рекурентні конвульсії у перші тижні життя помітно підвищують вірогідність виникнення епілептичних нападів протягом наступних періодів постнатального розвитку, а також призводять до порушення балансу збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в нейронах II шару соматосенсорної кори [5–7].

Метою нашої роботи було дослідження впливу рекурентних епілептичних нападів

© О.В. Ісаєва, О.О. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Ісаєв

на різні форми синаптичної пластичності в цих нейронах.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Sprague-Dawley. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами виконувалися з дотриманням правил роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України, а також відповідно до вимог міжнародної Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують із експериментальною та науковою метою. Протокол індукції судомних нападів включав розміщення дослідних тварин у пластиковій камері та повільне (30 – 40 мкл/хв) додавання флуротилу на фільтрувальний папір, розміщений у верхній її частині. Інгаляція флуротилу викликала повторні короткотривалі конвульсії, що проявлялося у поведінці та у характерній судомній активності в складі електроенцефалограми. Щури були

піддані дії флюротилю (дослідна група) з 1-ї по 15-ту добу після народження (п'ять-шість нападів на добу) [7]. Контрольним тваринам проводили всі процедури, що і дослідним, за винятком використання флюротилю.

Електрофізіологічні дослідження проводили на свіжоізольованих зрізах мозку 46 – 60-добових щурів. Після виділення мозок швидко занурювали в холодний базовий розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 126; KCl – 3,5; CaCl₂ – 2,0; MgCl₂ – 1,3; NaHCO₃ – 25; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 11 (pH 7,3). Зрізи товщиною 400 мкм отримували за допомогою вібратора («Campden Instruments LTD», Велика Британія) та залишали на одну годину (20 – 22 °C) у базовому розчині, що постійно насичували газовою сумішшю (95 % O₂ і 5 % CO₂).

Зрізи були перенесені до термостатичної камери, де їх постійно перфузували оксигенованим базовим розчином зі швидкістю 2 мл/хв. Досліди проводили при 30 – 32°C. Позаклітинні потенціали вимірювали з II шару соматосенсорної кори щурів за допомогою скляних мікроелектродів (1 – 3 МОм), заповнених базовим розчином, та з використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму («A-M Systems», США). Записи оцифровували із використанням аналогово-цифрового перетворювача («National Instruments», США) та накопичували на комп'ютері за допомогою програми WinWCP.

Для реєстрації синаптичної пластичності подразнювали IV шар соматосенсорної кори. Викликані постсинаптичні потенціали (ВПСП) фіксували у II шарі відповідної колонки. Базову лінію вимірювали за таким протоколом: наносили прямокутні (0,1 с) стимули амплітудою 30 – 80 мкА, здатні викликати половину максимальної амплітуди ВПСП. Подразнення наносили кожні 30 с. Запис стабільної базової активності тривав 10 – 30 хв. Короткотривалу депресію вимірювали під час прикладання серії з 10 стимулів з частотою 100 с⁻¹. Довготривалу потенціацію (ДП) викликали згідно з протоколом тетаніч-

ної стимуляції [8]. Наявність ДП визначали як статистично достовірне збільшення амплітуди ВПСП, що спостерігалось більше ніж 30 хв після тетанічної стимуляції порівняно з амплітудою ВПСП під час реєстрації базової лінії (P < 0,05). Аналіз результатів досліджень проводили з використанням критерію t Стьюдента та ANOVA-тесту.

РЕЗУЛЬТАТИ

Стимуляція IV шару соматосенсорної кори викликала постсинаптичні потенціали в II шарі відповідної колонки на зрізах мозку. Максимальна амплітуда ВПСП не відрізнялася між групами: 208,4 ± 5,7 мкВ, n = 12 у контрольній та 205,5 ± 9,9 мкВ, n = 7 у дослідній групі, P = 0,8 (рис. 1). При додаванні блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531 (50 мкмоль/л) у позаклітинний розчин амплітуда ВПСП несуттєво збільшилась як у контрольній (217,2 ± 5,8 мкВ, n = 16), так і в дослідній (214,4 ± 7,4 мкВ, n = 14) групі (див. рис. 1).

Досліджуючи вплив повторюваних епілептичних нападів, викликаних флюротилом, на синаптичну пластичність використовували протокол високочастотної стимуляції IV шару соматосенсорної кори на зрізах мозку

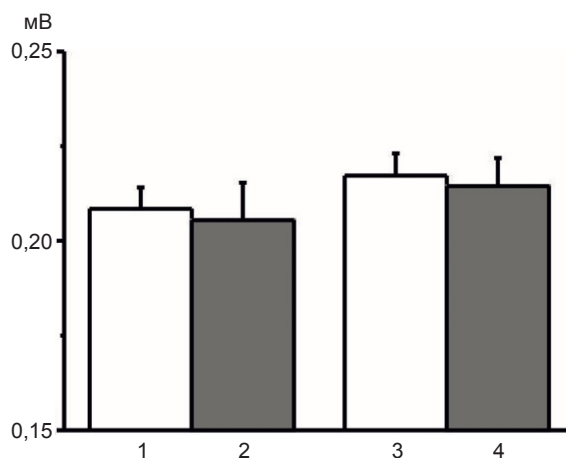


Рис. 1. Амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) до (1,2) і після (3,4) додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531 в контрольній (1,3) та дослідній (2,4) групі

тварин обох груп [8]. Після подразнення ВПСП відводили від II шару соматосенсорної кори протягом 1 год із частотою $0,05 \text{ с}^{-1}$. Довготривалу потенціацію ВПСП (понад 30 хв) спостерігали в чотирьох із дванадцяти (33,3 %) зрізах контрольної групи та в двох із десяти зрізів (20 %) дослідної групи. В решті зрізів високочастотна стимуляція викликала короткотривалу потенціацію ВПСП (менше 2 – 3 хв). Підвищення амплітуди ВПСП після стимуляції в зрізах обох груп статистично не відрізнялося і становило $120,2 \pm 13,0 \%$ ($n = 8$) у контролі та $130,1 \pm 9,8 \%$ ($n = 8$) у дослідній групі від середнього значення базової активності.

Відомо, що пригнічення гальмівної синаптичної передачі може сприяти індукції довготривалої потенціації синаптичних відповідей [9]. За наявності SR 95531 в позаклітинному розчині тривале підвищення ВПСП спостерігали в шести з дев'яти (66,7 %) зрізах контрольної групи та в шести з семи зрізах (85,7 %) дослідної групи. Додавання специфічного блокатора N-метил-D-аспартат (НМДА)-рецепторів аміно-5-фосфоновалеріанова кислоти в концентрації 50 мкмоль/л пригнічувало потенціацію синаптичних відповідей в обох групах, що свідчить про залучення НМДА-рецепторів до індукції ДП в досліджуваних синапсах. Середня максимальна потенціація ВПСП суттєво не відрізнялася між групами: контроль ($n = 6$), $157,8 \pm 6,5 \%$ та дослід ($n = 6$), $152,0 \pm 11,9 \%$, $P = 0.7$ (Рис. 2). Через 50 хв після стимуляції потенціація амплітуди ВПСП спостерігалася лише в дослідній групі ($126,1 \pm 7,5 \%$). В контрольній групі через 50 хв після стимуляції амплітуда ВПСП повністю відновилася до базового рівня ($98,8 \pm 7,8\%$). Довготривала її потенціація була значно збільшена в дослідній групі порівняно з контролем ($P < 0,001$, див. рис. 2).

Упродовж високочастотної стимуляції амплітуда ВПСП значно знижувалась (Рис. 3). Ця форма короткотривалої синаптичної пластичності спостерігається в різних ділянках мозку [10–14] і, як вважають, забезпечує

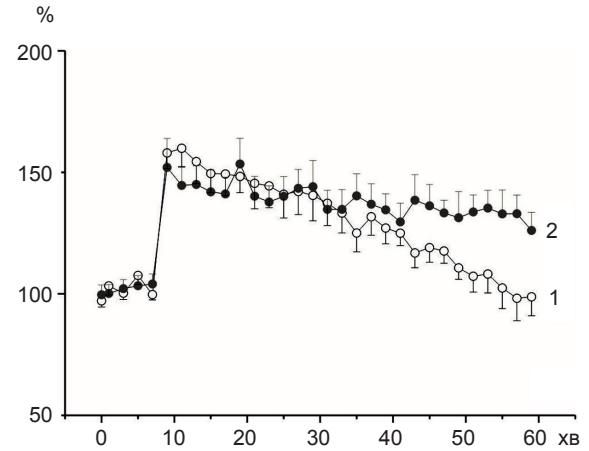


Рис. 2. Вплив флюротиліндукованих судом на довготривалу потенціацію синаптичних відповідей нейронів II шару соматосенсорної кори головного мозку, викликану високочастотною стимуляцією нейронів IV шару відповідної колонки. Представлено нормалізовані за середнім значенням базової активності амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) до і після додавання тетанічної стимуляції: 1 – середні амплітуди ВПСП у контролі; 2 – у досліді

специфічний синаптичний контроль кортикальних мереж [15]. У нашому дослідженні амплітуда ВПСП знизилася до $15,8 \pm 0,1\%$ ($n = 7$) в контролі та $25,2 \pm 0,1\%$ ($n = 5$) у

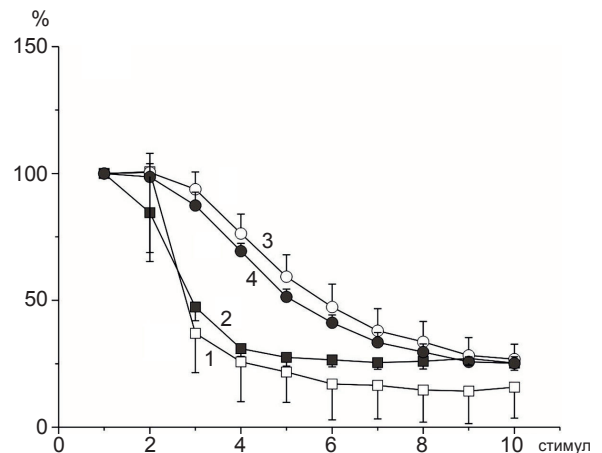


Рис. 3. Вплив судом, індукованих флюротилом, на короткотривалу депресію викликаних постсинаптичних потенціалів. Залежність викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) нормалізованих за значенням амплітуди ВПСП викликаних у відповідь на перший стимул від порядкового числа стимулу: 1,3 – середні амплітуди ВПСП в контролі 2,4 – у досліді до (1,2) і після (3,4) додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531

дослідній групі ($P = 0,4$). За умов наявності SR 95531 в позаклітинному розчині зниження постсинаптичної відповіді під час високочастотної стимуляції відбувалося повільніше в обох досліджуваних групах порівняно з експериментами без додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі (див. рис. 3), але впродовж 100 мс стимуляції амплітуда ВПСР знизилася до значень, які спостерігали без додавання SR 95531 ($26,8 \pm 0,1\%$ ($n = 10$) в контрольній та $25,2 \pm 0,1\%$ ($n = 7$) в дослідній групі, $P = 0,9$). Не виявлено достовірної різниці між значенням амплітуд ВПСР в обох групах за наявності або без SR 95531 в позаклітинному розчині ($P < 0,05$, див. рис. 3).

ОБГОВОРЕННЯ

У попередній роботі показано, що епілептичні напади, спровоковані дією флуротилу в неонатальний період життя, викликають хронічні зміни балансу збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в нейронах II шару соматосенсорної кори та підвищення збудливості нервових мереж [5–7]. У нашому дослідженні амплітуда ВПСР у II шарі соматосенсорної кори, викликана подразненням IV шару, не відрізнялася між досліджуваними групами, що вказує на те, що неонатальні напади не впливають на синаптичну передачу в цьому вертикальному шляху неокортекса.

Епілептичні напади, індуковані флуротилом в неонатальний період, не впливали на депресію постсинаптичних відповідей, викликану високочастотною стимуляцією та середню максимальну посттетанічну потенціацію амплітуди ВПСР. Експерименти з блокатором НМДА-рецепторів показали, що останні залучені у фазу індукції довготривалої потенціації в досліджуваних синапсах. Відсутність впливу неонатальних нападів на максимальну посттетанічну потенціацію ВПСР узгоджується з нашим попереднім дослідженням [6], де було показано, що амплітуда мініатюрних НМДА-залежних збудливих постсинаптичних струмів (як індикатор

постсинаптичної зміни) не змінювалась у II шарі соматосенсорної кори в дослідній групі порівняно з контролем.

У нашому дослідженні довготривала потенціація синаптичних відповідей була значно підвищена в дослідній групі. Під час високочастотної стимуляції активація НМДА-рецепторів збільшує внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію. Внаслідок цього активуються різноманітні внутрішньоклітинні кальційзалежні месенджери, що мають вирішальне значення у підтриманні ДП [16, 17]. Вплив протеїнкіназ, аденілатциклаз, дофамінових рецепторів, а також пресинаптичних факторів у підтриманні ДП було встановлено на різних ділянках мозку [16]. Попередні роботи показали, що судомні напади впливають на довготривалу синаптичну пластичність, і ДП може бути змінена у тварин з генетичною схильністю до судом. Дослідження з використанням кіндлінгової моделі довели, що епілептичні напади знижують вірогідність виникнення ДП у відповідь на високочастотну стимуляцію, а також змінювати характеристики посттетанічної потенціації ВПСР [18]. Проте хронічне зниження порогу збудження нервової системи не завжди пов'язане з погіршенням спроможності синапсів до потенціації, яка швидше залежить від клітинних механізмів, що лежать в основі збільшення активності нейронів. Так, було встановлено, що у тварин з генетичною схильністю до судом підвищувалася ДП [19]. Відомо, що неонатальні напади, викликані інгаляцією флуротилу, значно знижують ДП у гіпокампі [20]. У нашому дослідженні вона була значно підвищена в соматосенсорній корі щурів дослідної групи, що вказує на вибіркового характеру впливу неонатальних судом на різні ділянки мозку. Той факт, що повторювані судомні, індуковані у новонароджених щурів, по-різному впливають на НМДА-опосередковану збуджувальну синаптичну передачу в соматосенсорній корі і гіпокампі щурів, підтримує це припущення [6, 21].

Отже, неонатальні судомні напади призводять до хронічного підвищення довготривалої потенціалії синаптичних відповідей у нейронах соматосенсорної кори головного мозку. Зміни синаптичної пластичності можуть впливати на обробку сенсорної інформації у пацієнтів, у яких спостерігалися рекурентні судоми в період раннього розвитку, а також порушувати сенсорні процеси.

Е.В. Исаева, А.А. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Исаев

ВЛИЯНИЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ СУДОРОЖНЫХ ПРИСТУПОВ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС

С использованием экспериментальной модели неонатальных повторяющихся эпилептических судорог исследовано их влияние на различные формы синаптической пластичности нейронов соматосенсорной коры. Установлено, что судорожные приступы, индуцированные флуротилом в ранний период жизни, не влияют на депрессию постсинаптических потенциалов нейронов II слоя соматосенсорной коры головного мозга, вызванную высокочастотной стимуляцией IV слоя соответствующей колонки и посттетаническую потенциацию амплитуды постсинаптических потенциалов, но приводят к хроническому повышению долговременной потенциации возбуждающей синаптической передачи этих нейронов. Описанные изменения синаптической пластичности могут влиять на обработку сенсорной информации у пациентов, у которых наблюдались рекуррентные судороги в период раннего развития. Ключевые слова: эпилепсия; соматосенсорная кора; синаптическая пластичность; флуротил.

E.V. Isaeva, O.O. Lunko, A.K. Romanov, D.S. Isaev

EFFECT OF NEONATAL SEIZURES ON THE SYNAPTIC PLASTICITY OF RAT SOMATOSENSORY CORTEX

Using an experimental model of neonatal recurrent seizures we investigated the influence of epileptic seizures in the various forms of synaptic plasticity in neurons of the somatosensory cortex. We found that early seizures do not affect the post-tetanic potentiation of the amplitude of the postsynaptic potentials and the depression of postsynaptic potentials during high-frequency stimulation. However they result in the chronic increase of the long-term potentiation of synaptic transmission. These changes of synaptic plasticity may affect the processing

of the sensory information in patients with a history of recurrent seizures during early development.

Key words: epilepsy; somatosensory cortex; synaptic plasticity; flurothyl

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

REFERENCES

1. Holmes GL. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:101–5.
2. Ronen GM, Buckley D, Penney S, Streiner DL. Long-term prognosis in children with neonatal seizures: A population-based study. *Neurology.* 2007;69:1816–22.
3. Glass HC, Hong KJ, Rogers EE, Jeremy RJ, Bonifacio SL, Sullivan JE, et al. Risk factors for epilepsy in children with neonatal encephalopathy. *Pediatr Res.* 2011;70:535–40.
4. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Clinical Neonatal Seizures are Independently Associated with Outcome in Infants at Risk for Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *J Pediatr.* 2009;155:318–23.
5. Isaeva E, Isaev D, Khazipov R, Holmes GL. Long-term suppression of GABAergic activity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex. *Epilepsy Res.* 2009;87:286–9.
6. Isaeva E, Isaev D, Savrasova A, Khazipov R, Holmes GL. Recurrent neonatal seizures result in long-term increases in neuronal network excitability in the rat neocortex. *Eur J Neurosci.* 2010;31(8):1446–55.
7. Isaev DS, Isaeva E V., Savrasova A V., Holmes GL. Effect of Neonatal Epileptic Attacks on the Activity of Neocortical Neurons. *Neurophysiology.* 2011; 43(3):227–8.
8. Diamond DM, Dunwiddie T V, Rose GM. Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat. *J Neurosci.* 1988;8:4079–88.
9. Wigström H, Gustafsson B. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature.* 1983 Feb 17;301(5901):603–4.
10. Varela JA, Sen K, Gibson J, Fost J, Abbott LF, Nelson SB. A Quantitative Description of Short-Term Plasticity at Excitatory Synapses in Layer 2/3 of Rat Primary Visual Cortex. *J Neurosci.* 1997 Oct 15;17(20):7926–40.
11. Castro-Alamancos MA, Donoghue JP, Connors BW. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J Neurosci.* 1995;15:5324–33.
12. Galarreta M, Hestrin S. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci.* 1998;1:587–94.
13. Hernan AE, Holmes GL, Isaev D, Scott RC, Isaeva E. Altered short-term plasticity in the prefrontal cortex after early life seizures. *Neurobiol Dis.* 2013;50:120–6.
14. Hernan AE, Alexander A, Jenks KR, Barry J, Lenck-Santini P-P, Isaeva E, et al. Focal epileptiform activity in the prefrontal cortex is associated with long-term attention and sociability deficits. *Neurobiol Dis.* 2014

- Mar;63:25–34.
15. Abbott LF, Varela JA, Sen K, Nelson SB. Synaptic depression and cortical gain control. *Science*. 1997; 275:220–4.
 16. Malinow R, Madison D V, Tsien RW. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature*. 1988;335:820–4.
 17. Matthies Jr. H, Behnisch T, Kase H, Matthies H, Reymann KG. Differential effects of protein kinase inhibitors on pre-established long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 1991;121:259–62.
 18. Hesse GW, Teyler TJ. Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electroconvulsive seizures. *Nature*. 1976 Dec 9;264(5586):562–4.
 19. Luthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, et al. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 1997;17:4688–99.
 20. Zhou JL, Shatskikh TN, Liu X, Holmes GL. Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. *Eur J Neurosci*. 2007;25(12):3667–77.
 21. Isaeva E, Isaev D, Khazipov R, Holmes GL. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures. *Eur J Neurosci*. 2006;23(6):1559–66.

*Матеріал надійшов до
редакції 29.01.2015*

Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу

А.Ю. Будько, Н.А. Струтинська, І.Ю. Охай, О.М. Семенихіна, В.Ф. Сагач

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

Досліджували накопичення різних концентрацій Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях серця щурів за умов підтримання в них потенціалу. Навантаження органел флуоресцентним барвником Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) проводили при 26°C протягом 30 хв. За цих умов підтримувався достатньо високий рівень мітохондріального потенціалу, що необхідно для функціонування кальційтранспортної системи органел. Встановлено, що мітохондрії мають обмежену здатність накопичувати іонізований кальцій, оскільки внесення у суспензію Ca^{2+} у концентраціях 10, 20, 50 мкмоль/л забезпечувало певний рівень його акумуляції в органелах з подальшим припиненням зростання флуоресцентного сигналу. Навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призводило до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції (на 46% на 5-й хвилині порівняно з флуоресценцією при внесенні 20 мкмоль/л) і, ймовірно, до активації процесів вивільнення катіона. Використання неспецифічного інгібітора Ca^{2+} -уніпортера рутенію червоного (10^{-5} моль/л) на тлі дії 100 мкмоль/л Ca^{2+} попереджало його накопичення в органелах на 89%. Показано, що для акумуляції Ca^{2+} мітохондріям серця необхідний комплекс Mg^{2+} -АТФ (3 мкмоль/л), ймовірно для підтримання потенціалу на внутрішній мембрані, збереження активності уніпортера і енергозалежних процесів в органелах. Отже, процес акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях серця щурів відбувається головним чином за умов функціонування мітохондріального уніпортера та підтримання потенціалу в органелах, залежить від концентрації цитозольного Ca^{2+} і наявності комплексу Mg^{2+} -АТФ.

Ключові слова: ізольовані мітохондрії; серце; Ca^{2+} ; протокова цитофлуориметрія; флуоресцентний зонд Fluo-4 AM.

ВСТУП

Мітохондрії – субклітинні органели, які відіграють істотну роль у регуляції життя та смерті клітини. З одного боку, вони забезпечують енергетичний метаболізм клітин, оскільки є основними постачальниками аденозинтрифосфату (АТФ) [1, 2]. Зокрема, у кардіоміоцитах мітохондрії займають 35% об'єму клітини і продукують 90 % енергії у вигляді АТФ, яка потрібна для роботи серцевого м'яза [2, 3]. Під час окисного фосфорилування органела генерує мітохондріальний потенціал за допомогою транспортування протонів з матриксу у міжмембранний простір, що є рушійною силою для АТФ-синтази [1]. З іншого боку, дуже важлива участь мітохондрій у процесі запрограмованої клітинної смерті, тому що вони

© А.Ю. Будько, Н.А. Струтинська, І.Ю. Охай, О.М. Семенихіна, В.Ф. Сагач

відповідають за вихід цитохрому c і протеїнів, які індукують апоптоз, а також протеїнів, котрі нейтралізують ендогенні інгібітори апоптозу (SMAC/DIABLO) та містять фактор індукції апоптозу [4].

Відомо, що мітохондрії разом з ендоплазматичним ретикуломом є внутрішньоклітинними депо кальцію, які потрібні для миттєвої регуляції цитоплазматичного його вмісту у м'язових клітинах [5]. Більше того, Ca^{2+} в мітохондріях стимулює окисне фосфорилування. Цей процес відбувається на декількох рівнях, що включає алостеричну активацію піруват-, ізоцитрат- та α -кетоглутаратдегідрогеназ, а також стимуляцію АТФ-синтази, α -глицеролфосфатдегідрогенази і аденіннуклеотид-трансферази (АНТ) [6]. Загалом, зростання вмісту внутрішньомітохондріального каль-

цію активує роботу електронно-транспортного ланцюга і, як наслідок, утворення АТФ [3]. Наприклад, β -адренергічна стимуляція кардіоміоцитів потребує посилення скорочення серцевого м'язу. Підвищення вмісту кальцію в мітохондріях забезпечує утворення потрібної кількості АТФ для збільшення сили скорочення органа [7].

Перевантаження мітохондрій кальцієм призводить до формування неспецифічної мітохондріальної пори перемінної проникності (МП) [8]. Вона описана близько 35 років тому Хавортом і Хантером як сукупність протеїнів внутрішньої та зовнішньої мембран, що формують великий канал, проникний для молекул масою до 1500 Да. МП активується кальцієм у високих концентраціях та іншими стимулами, включаючи оксиданти та нестачу аденілових нуклеотидів. Її інгібування відбувається за низького рівня рН, такими антиоксидантами, як відновлений глутатіон, мелатонін, коензим Q, а також імунодепресантом циклоспорином А, який зв'язується зі структурним компонентом МП циклофіліном Д [7, 9, 10]. Відкривання МП призводить до вивільнення цитохрому *c* з органел, що є основним пусковим механізмом розвитку апоптозу. Якщо ж у клітині недостатньо АТФ – розвивається некроз [8]. Тобто дисфункція мітохондрій внаслідок утворення МП – один з найважливіших чинників патологічних станів серця, а її фармакологічне інгібування відіграє кардіопротекторну роль. Отже, ефекти іонів Са в мітохондріях залежать від їх концентрації. Так, у низьких концентраціях вони активують дихальний ланцюг, збільшуючи синтез АТФ, а у високих – призводять до утворення МП і, як наслідок до загибелі кардіоміоцитів. Нині кальційакумулювальна здатність ізольованих мітохондрій клітин серця недостатньо вивчена. Для нас надзвичайно важливо було дослідити накопичення кальцію мітохондріями за фізіологічних умов, коли підтримується мітохондріальний потенціал а також за дії високих позамітохондріальних концентрацій іона.

Наразі для дослідження вмісту кальцію у мітохондріях та його внутрішньоклітинного обміну застосовують різні методи, зокрема Ca^{2+} -селективні електроди, ізотопну техніку ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), двопроменеву спектрофлуориметрію з використанням кальційчутливих металохромних барвників (арсеназо), конфокальну мікроскопію, де як зонди є біоломінесцентні акварини, флуоресцентні протеїни та низькомолекулярні кальційфлуоресцентні індикатори [11]. У сучасній літературі [11 – 14] доводиться можливість використання протокової цитофлуориметрії для дослідження метаболізму кальцію в ізольованих мітохондріях.

Мета нашої роботи – дослідження акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу та дії фізіологічних і високих концентрацій позамітохондріального Ca^{2+} з використанням методу протокової цитофлуориметрії.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220 – 250 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. При дослідженні враховано міжнародні принципи Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Мітохондрії серця виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [15]. Для проведення досліджень було використано три середовища: виділення, зберігання (ресуспендування) та інкубації. Серця ретельно промивали охолодженням 0,9%-м розчином KCl (2 – 4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища виділення (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 25, EGTA – 1; рН 7,2 – 7,4. Гомогенат центрифугували при 700g 8 хв (4°C). Супернатант повторно центрифугували при 11000g 16 хв (4°C). Отриманий

осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в середовищі зберігання, яке містило (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НCl – 25; рН 7,2 – 7,4, і одразу використовували в дослідах. Одержану суспензію мітохондрій зберігали на льоду. Концентрацію в ній білка визначали за методом Лоурі [16]. Вміст білка в пробі становив 50 мкг/мл.

Для дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, органели навантажували флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв при 37, 26 і 22°C. Цей барвник використовується у вигляді ацетоксиметильного естеру, незарядженої сполуки, що вільно проникає у клітини, а у нашому випадку – мітохондрії, де потім неспецифічні естерази розщеплюють складноефірні зв'язки, перетворюючи його в заряджену кислотну форму зонда, який не може вийти з місця локалізації. Збудження Fluo-4 AM відбувається за довжини хвилі 488 нм, що дає змогу використовувати його на приладах, обладнаних аргонним лазером, а інтенсивність флуоресценції зростає у відповідь на зв'язування з Ca^{2+} . Для покращення процесу навантаження барвник змішували з Pluronic F-127 (0,02%-й), як описано у протоколі навантаження для Fluo-3 AM [11]. Виміри здійснювали у середовищі інкубації з наступним складом (ммоль/л): KCl – 120; KH_2PO_4 – 3; тріс-НCl – 25; сукцинат Na – 5, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін (БСА). Вимірювання флуоресценції проводили до внесення розчину CaCl_2 у середовище інкубації (вихідні значення) і після – на 1, 3, 5, 7, 9, 11 та 23-й хвилині. Отримані результати представлено в умовних одиницях інтенсивності флуоресценції.

Накопичення кальцію мітохондріями реєстрували на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XLTM («Beckman Coulter», США) з аргонним лазером, який дає змогу якісно та кількісно досліджувати біологічні і фізичні властивості клітин і субклітинних структур. Створений робочий протокол містив логічне обмеження для

реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюванням. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10 000 подій в обмеженій ділянці.

Для дослідження мітохондріального потенціалу методом, запропонованим Брандом, органели інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-НCl – 25, KH_2PO_4 – 3, 5% знежиреного БСА; рН 7,2 – 7,4 [17]. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану TPMP-селективним електродом (від англ. triphenylmethylphosphonium sensitive electrode) і електродом Кларка, вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат натрію (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія), а зміни концентрації TPMP – рН-метра PP-25 «Sartorius» (Німеччина). Мембранний потенціал мітохондрій розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [18].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програм MS Excel, OriginPro 7.5., FCS Express.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створений попередньо робочий протокол [11, 12] дав змогу здійснювати дослідження в ділянці, де 95 % подій, які реєстрував прилад були мітохондріального походження (рис. 1, а). Для цього було введено два «логічних обмеження» для відокремлення лише сигналу з мітохондрій, оскільки суспензія органел могла містити немітохондріальні домішки. Введення першого «логічного обмеження» – за показником прямого світлорозсіювання (вісь абсцис – FS Log) проти бічного світлорозсіювання (вісь ординат – SS Log) дало можливість не реєструвати ушкоджені клітинні структури під час дослідження.

Друге «логічне обмеження» було застосовано за параметром флуоресцентного сигналу від акридин-оранж-10-ноніл бромід-позитивних частинок (НАО-позитивних). Використання НАО у концентрації 100 нмоль/л дає змогу виявити саме мітохондріальний сигнал, оскільки барвник зв'язується з кардіоліпіном – специфічним фосфоліпідом внутрішньої мембрани мітохондрій. Наявність флуоресцентного сигналу (див. рис. 1, б, крива 1) свідчить про зв'язування барвника з вільним Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, а його зміщення вправо (див. рис. 1, б, крива 2) – про акумуляцію іонів ізольованими мітохондріями. У літературі описано, що навантаження клітин зондом у концентрації 2 – 10 мкмоль/л може здійснюватися протягом 30 – 45 хв при 4, 22, 30 або 37°C. [13]. Оскільки об'єктом нашого дослідження є мітохондрії кардіоміоцитів ми намагалися підібрати оптимальні умови навантаження Fluo-4 АМ. Використовували барвник у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв за різних температур, зокрема 37, 26 і 22°C. Високу інтенсивність сигналу флуоресцентного зонда в енергізованих мітохондріях реєстрували за наявності іонів Ca^{2+} у разі навантаження мітохондрій маркером протягом 30 хв при 26°C (рис. 2, різниця між

групами на кожній хвилині, починаючи з 3-ї, є вірогідною).

При навантаженні мітохондрій зондом протягом 30 хв при 37°C інтенсивність флуоресценції на 5-й хвилині була нижчою на 72% порівняно зі значеннями в цей час при 26°C (див. рис. 2). Зменшення температури навантаження до 22°C знижувало інтенсивність флуоресценції, ймовірно, внаслідок зменшення активності роботи внутрішньомітохондріальних естераз, які перетворюють зонд в активну форму, і в результаті відсутності достатньої кількості барвника в органелах.

Оскільки основним шляхом надходження кальцію у мітохондрії є мітохондріальний кальцієвий уніпортер (МКУ), робота якого залежить від потенціалу на внутрішній мембрані органел, ми припустили, що зниження акумуляції Ca^{2+} мітохондріями, які навантажувалися барвником при 37°C може бути пов'язане з деполяризацією їхньої мембрани під час такого режиму. Адже відомо, що деполяризація мітохондріальної мембрани роз'єднувачами FCCP, CCCP окремо або в комбінації з інгібітором F_1F_0 АТФ-синтази олігоміцином призводить до інгібування входу Ca^{2+} через уніпортер внаслідок елімінації електричної рушійної сили (потенціалу) [8].

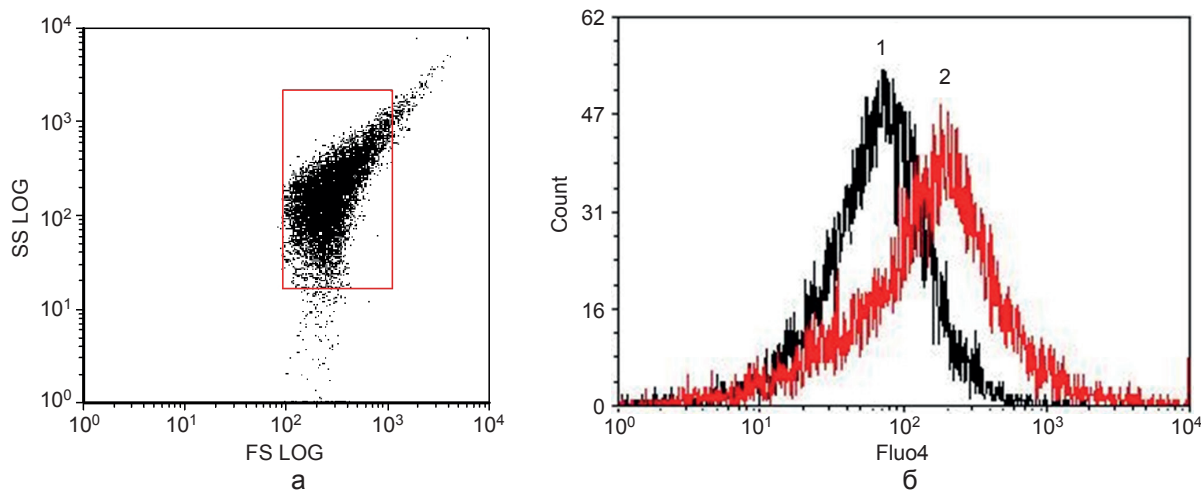


Рис. 1. Характеристика препарату мітохондрій на протоковому цитофлуориметрі: а – виділена ділянка дослідження; б – типові криві накопичення Ca^{2+} мітохондріями кардіоміоцитів (1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} у концентрації 100 мкмоль/л); за віссю абсцис – інтенсивність флуоресценції, за віссю ординат – кількість подій, зареєстрованих приладом

Тому ми дослідили мембранний потенціал ізольованих мітохондрій серця щурів і, як видно з рис. 3, він знижується після 30-хвилинної інкубації як при 26°C, так і 37°C. Проте зниження за вищої температури є більш значним і становить 65 мВ порівняно з рівнем потенціалу при інкубації за нижчої температури (різниця становить 27 мВ), що й зумовлює зниження накопичення кальцію органелами.

Тобто ми припускаємо, що зменшення інтенсивності флуоресценції в мітохондріях, які навантажувалися флуоресцентним зондом протягом 30 хв при 37°C, пов'язане зі зниженням мітохондріального потенціалу і погіршенням Ca^{2+} -транспортівальної здатності уніпортера. Спираючись на дані літератури та на отримані результати, навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л у наступних експериментах проводили при 26°C протягом 30 хв.

Відомо, що мітохондріальний уніпортер регулюється низкою інгібіторів і активаторів. Найбільш відомими інгібіторами МКУ є сполуки рутенію, зокрема рутеній червоний

(RuRed) та Ru360. У дослідженні було використано рутеній червоний – гексавалентний полікатионний барвник, неспецифічний інгібітор входу кальцію у мітохондрії у концентрації 10^{-5} моль/л. Ця сполука попереджає вхід катіона через МКУ, ріанодинові рецептори та швидкий режим входу Ca^{2+} (від англ. rapid uptake mode, RaM) [20]. На рис. 4. представлено криві накопичення Ca^{2+} у концентрації 100 мкмоль/л, без впливу інгібітора (крива 1) та під час інкубації мітохондрій протягом 3 хв з вищезазначеним інгібітором (крива 2). Чітко видно, що за попередньої дії інгібітора входу Ca^{2+} , інтенсивність флуоресценції знижується на 5-й хвилині на 89%, що свідчить про відсутність акумуляції іонів кальцію ізольованими органелами.

Ми також встановили, що накопичення Ca^{2+} мітохондріями клітин серця відбувається за наявності комплексу Mg^{2+} -АТФ у концентрації 3 ммоль/л (див. рис. 4). У 2007 р. на ізольованих мітохондріях клітин гладеньких м'язів матки було показано, що відсутність у середовищі інкубації мітохондрій MgCl_2 і АТФ під час внесення 100 мкмоль/л Ca^{2+}

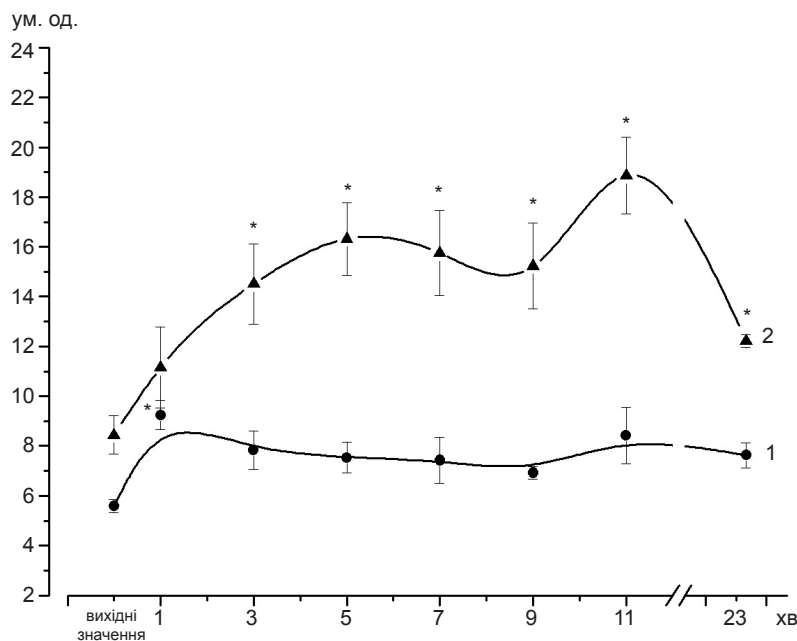


Рис. 2. Зміна інтенсивності флуоресценції кальційчутливого зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за умов наявності у середовищі інкубації Ca^{2+} (100 мкмоль/л) і комплексу Mg^{2+} -АТФ (3 ммоль/л). Навантаження зондом відбувалося протягом 30 хв: 1 – при 37°C (n=5); 2 – при 26°C (n=15). *P<0,05 відносно вихідного значення

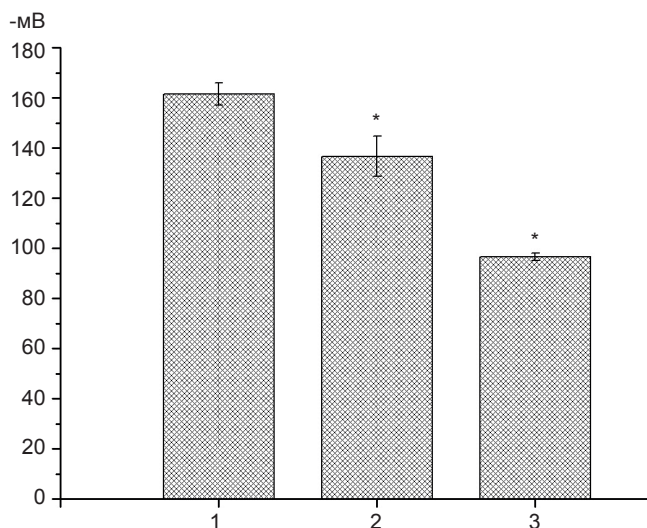


Рис. 3. Вплив температури на потенціал мітохондрій, інкубованих протягом 20 хв на льоду (1 – контроль); 30 хв при 26°C (2); 30 хв при 37°C (3). * $P < 0,05$ відносно контролю ($n=5$)

спричиняє деполяризацію мітохондріальної мембрани, що призводить до нездатності мітохондріями акумулювати Ca^{2+} [11, 12]. Слід відмітити, що інтенсивність флуоресценції зонда Fluo-4 AM вища, якщо в середовищі інкубації містяться вищезгадані

субстрати (див. рис. 4, крива 1). У наших умовах дослідження за відсутності комплексу Mg^{2+} -АТФ акумуляція Ca^{2+} в мітохондріях не спостерігалася (див. рис. 4., крива 3), що свідчить про енергозалежність цього процесу. Отже, для акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях кар-

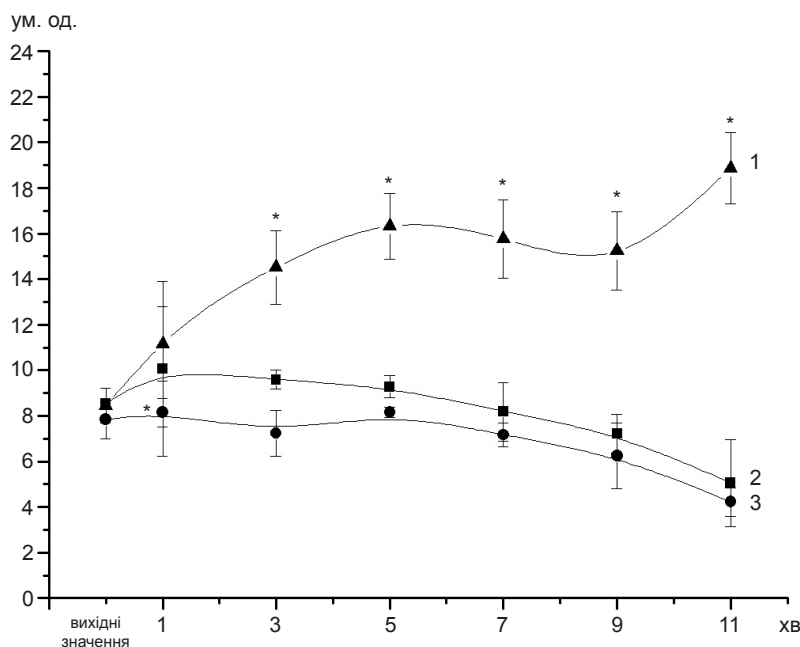


Рис. 4. Зміна інтенсивності флуоресценції зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за наявності в середовищі інкубації 100 мкмоль/л Ca^{2+} : 1 – преінкубація з Mg^{2+} -АТФ (3 ммоль/л), дія Ca^{2+} ($n=15$); 2 – преінкубація 3 хв з рутенієм червоним (10^{-5} моль/л), дія Ca^{2+} ($n=5$); 3 – дія Ca^{2+} за відсутності Mg^{2+} -АТФ у середовищі ($n=5$). * $P < 0,05$ відносно вихідного значення

діоміоцитів необхідні сполуки Mg^{2+} і АТФ.

З даних літератури відомо, що концентрація вільного кальцію в умовах спокою в мітохондріях і цитоплазмі кардіоміоцитів становить близько 100 нмоль/л [5, 21]. При цьому у саркоплазматичному ретикулумі вона набагато більша, 500 мкмоль/л, і майже сягає концентрації іона у міжклітинному просторі (близько 1 ммоль/л).

У середовищі без додавання кальцію відбувалося незначне зниження флуоресцентного сигналу з часом, що може свідчити про вивільнення внутрішньомітохондріального Ca^{2+} через Ca^{2+} - H^{+} обмінник (рис. 5). Очевидно, що мітохондрії мають обмежену здатність накопичувати іонізований кальцій, оскільки додаючи його у таких концентраціях як 10, 20 і 50 мкмоль/л, спостерігали уповільнення процесу акумуляції іонів і вихід кривої на плато. Ми припускаємо, що при цьому функціонування кальційтранспортальної системи мітохондрій відбувається за фізіологічних умов, а максимальна амплітуда накопичення іона, що визначає кальційакумулювальну здатність мітохондрій, може бути показником їх інтактності. Навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призводило до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції (на 46% на 5-й хвилині

порівняно з флуоресценцією при внесенні 20 мкмоль/л Ca^{2+}) і викликало нерівномірну динаміку його накопичення в органелах. Існує два піки акумуляції іонів Ca^{2+} (див. рис. 5, а, крива 2). Наступне зниження кальційакумулювальної здатності мітохондрій за умов наявності кальцію в інкубаційному середовищі у високих концентраціях, ймовірно, може свідчити про активацію процесів вивільнення іона (І пік) чи пошкодження мітохондріальних мембран (ІІ пік), можливо, внаслідок відкривання неспецифічної високопровідної МП. На рис. 5, б. представлено концентраційну залежність дії Ca^{2+} на 5-й хвилині реєстрації інтенсивності флуоресцентного сигналу. Найвищу інтенсивність флуоресценції спостерігали при додаванні Ca^{2+} у концентрації 100 мкмоль/л, що вказує про посилення накопичення катіона мітохондріями.

Таким чином, в нашій роботі була ідентифікована кальційакумулювальна здатність ізольованих мітохондрій серця дорослих щурів і досліджені деякі її властивості за фізіологічних умов та у разі навантаження високими концентраціями іонів кальцію, які призводять до дисфункції мітохондрій. Продемонстровано можливість застосування методу протокової цитофлуориметрії для вивчення кальцієвого гомеостазу ізольованих

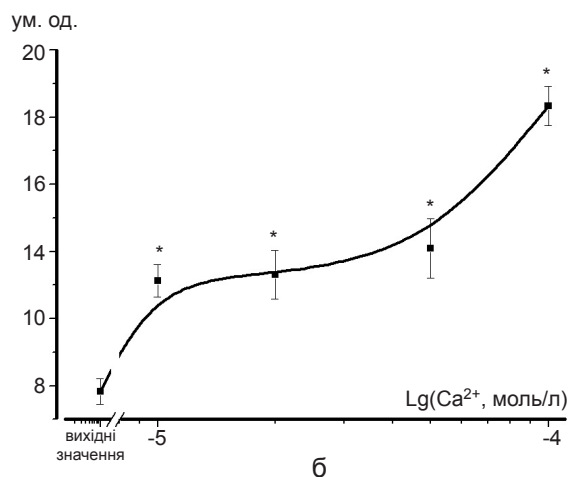
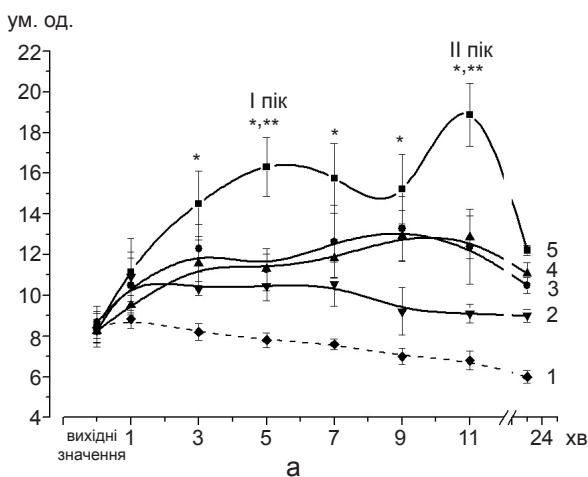


Рис. 5. Акумуляція Ca^{2+} у різних концентраціях мітохондріями серця щурів: а – дія Ca^{2+} у концентрації 10, 20, 50 і 100 мкмоль/л (криві 2, 3, 4 і 5), $n=6, 6, 8, 15$ відповідно; крива 1 – флуоресцентний сигнал у розчині без додавання Ca^{2+} ; б – концентраційна залежність дії Ca^{2+} на 5-й хвилині реєстрації інтенсивності флуоресцентного сигналу. * $P<0,05$ відносно вихідного значення, ** $P<0,05$ відносно значення на тій самій хвилині при дії 20 мкмоль/л Ca^{2+}

мітохондрій кардіоміоцитів і встановлено оптимальні умови процесу акумуляції, а саме залежність від температури інкубації, коли підтримується мітохондріальний потенціал і наявності субстрату комплексу Mg^{2+} -АТФ а також сукцинату. З'ясовано, що накопичення іонів кальцію чутливе до інгібітора МКУ – рутенію червоного, що свідчить про основну роль цієї транспортувальної системи в процесі акумуляції. Нами показано, що ізольовані мітохондрії серця мають обмежену здатність накопичувати кальцій.

Отже, висвітлені питання створюють підґрунтя для проведення наукових досліджень, які будуть актуальними насамперед для з'ясування молекулярних механізмів регуляції і підтримання кальцієвого гомеостазу в мітохондріях, що необхідно для запобігання дисфункції мітохондрій серця за умов ішемії-реперфузії та різних патологічних станів організму.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що навантаження ізольованих органел флуоресцентним барвником Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) оптимально здійснювати при 26°C протягом 30 хв. За цих умов підтримуються достатньо високі значення мітохондріального потенціалу, що необхідно для функціонування кальцієвого уніпортера.

2. Інкубація ізольованих мітохондрій кардіоміоцитів з неспецифічним інгібітором мітохондріального кальцієвого уніпортера – рутенієм червоним (10^{-5} моль/л) на тлі дії 100 мкмоль/л Ca^{2+} призводила до зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу зонда на 89%, що вказує на запобігання акумуляції Ca^{2+} мітохондріями кардіоміоцитів.

3. Встановлена енергозалежність кальційакумуляційної системи мітохондрій серця щурів, оскільки накопичення іонів кальцію не спостерігалось за відсутності комплексу Mg^{2+} -АТФ.

4. Внесення кальцію у концентраціях 10, 20 і 50 мкмоль/л дало можливість показати дозозалежність процесу акумуляції Ca^{2+} , а також обмежену здатність його накопичувати.

Натомість навантаження мітохондрій кальцієм у концентрації 100 мкмоль/л призводило до суттєвого зростання інтенсивності флуоресценції і, ймовірно, до активації процесів вивільнення катіона з органел.

Автори статті висловлюють щире подяку колегам з Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Даниловичу Ю.В., Данилович Г.В., Чуніхіну О.Ю. та Костеріну С.О. за допомогу у виконанні роботи.

А.Ю. Бudyko, Н.А. Струтинская, И.Ю. Охай, Е.Н. Семенихина, В.Ф. Сагач

АККУМУЛЯЦИЯ Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОДДЕРЖАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Исследовали накопление разных концентраций Ca^{2+} в изолированных митохондриях сердца крыс в условиях поддержания митохондриального потенциала. Нагрузку органелл проводили при 26°C в течение 30 мин флуоресцентным красителем Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л). В этих условиях поддерживался достаточно высокий уровень митохондриального потенциала, что необходимо для функционирования кальцийтранспортующей системы органелл. Показано, что изолированные митохондрии имеют ограниченную способность накапливать ионизированный кальций, поскольку внесение ионов в концентрациях 10, 20, 50 мкмоль/л обеспечивало определенный уровень его аккумуляции в органеллах с последующим прекращением увеличения флуоресцентного сигнала. Использование неспецифического ингибитора митохондриального унпортера рутения красного (10^{-5} моль/л) на фоне действия 100 мкмоль/л Ca^{2+} предупреждало накопление катиона в органеллах на 89%. Показано, что аккумуляция Ca^{2+} митохондриями сердца происходит в присутствии комплекса Mg^{2+} -АТФ (3 ммоль/л), вероятно для поддержания потенциала на внутренней мембране, сохранения активности унпортера и энергозависимых процессов в органеллах. Нагрузка митонхондрий кальцием в концентрации 100 мкмоль/л приводила к существенному росту интенсивности флуоресценции (на 46% на 5-й минуте по сравнению с флуоресценцией при внесении 20 мкмоль/л Ca^{2+}) и вероятно к активации процессов высвобождения катиона. Следовательно, процесс аккумуляции Ca^{2+} в митохондриях сердца крыс происходит главным образом в условиях функционирования митохондриального унпортера и поддержания потенциала в органеллах, зависит от концентрации цитозольного Ca^{2+} и присутствия комплекса Mg^{2+} -АТФ.

Ключевые слова: изолированные митохондрии; сердце; Ca^{2+} ; проточная цитофлуориметрия; флуоресцентный зонд Fluo-4 AM.

**A.Yu. Budko, N.A. Strutynska, I.Yu. Okhay,
O.M. Semenykhina, V.F. Sagach**

Ca²⁺ ACCUMULATION IN ISOLATED RAT HEART MITOCHONDRIA UNDER MAINTENANCE OF MITOCHONDRIAL POTENTIAL

It is known that mitochondria can accumulate calcium, which regulates energy metabolism and cell death. About 90% of energy of cardiomyocytes is synthesized in mitochondria. Heart cells are also affected by the rapid changes in the Ca²⁺ concentration in the cytoplasm. Therefore, mitochondrial Ca²⁺-accumulation ability is crucial. The aim of our work was to study the accumulation of Ca²⁺ in isolated rat heart mitochondria in the presence of mitochondrial potential and different extramitochondrial Ca²⁺ concentrations. Isolated organelles were loaded with fluorescent dye Fluo-4 AM (2,5 μmol/l) at a temperature of 26°C for 30 min. It has been revealed that under these conditions high mitochondrial potential was maintained sufficiently, which is necessary for the functioning of the calcium transporting system in organelles. We established that mitochondria have a limited ability to store ionized calcium, as addition of Ca²⁺ ion in concentrations of 10, 20, 50 μmol/l ensures a certain level of accumulation in organelles with further fluorescent signal growth cessation. Addition of 100 μmol/l Ca²⁺ to isolated mitochondria resulted in a significant increase in fluorescence intensity (46% in the fifth minute, compared to the fluorescence when 20 μmol/l Ca²⁺ was added) and likely to activation of cation release. It was shown that ruthenium red (10⁻⁵ mol/l), an inhibitor of Ca²⁺-uniporter, prevented accumulation of calcium ions in organelles by 89%, in the presence of 100 μmol/l Ca²⁺. It was clearly seen that heart mitochondria require Mg²⁺-ATP complex (3 mmol/l) to accumulate Ca²⁺, likely to maintain the inner membrane potential, activity of Ca²⁺ uniporter and energetic processes in organelles. Thus, the process of Ca²⁺ accumulation in rat heart mitochondria requires the maintenance of mitochondrial potential, activity of Ca²⁺-uniporter, depends on extramitochondrial Ca²⁺ concentration and presence of Mg²⁺-ATP complex.

Key words: isolated mitochondria; heart; Ca²⁺; flow cytometry; fluorescence probe Fluo-4 AM.

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

REFERENCES

- Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Santos PD. Cardioprotective Signaling to Mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:858-66.
- Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *J Pharmacol and Exp Therap.* 2009; 330(3):670-8.
- Dedkova EN, Blatter LA. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J Mol and Cell Cardiol.* 2012; 52:48-61.
- Frasier ChR. The role of cardiac mitochondria in myocardial ischemia/reperfusion injury [dissertation]. East

- Carolina University; 2012.
- Boyman L, Chikando AC, Williams GSB, Khairallah RJ, Kettlewell S, Ward ChW, Smith GL, Kao JPY, Lederer WJ. Calcium Movement in Cardiac Mitochondria. *Bio-physical J.* 2014; 107:1289-1301.
- Glancy B, Balaban RS. Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry.* 2012; 51:2959-73.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP-Cell Physiol.* 2004; 287:817-33.
- Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium.* 2008; 44:77-91.
- Akopova OV. The role of permeability transition pore in transmembrane Ca²⁺-exchange in mitochondria. *Ukr Biochem J.* 2008; 80(3):40-7 [Ukrainian].
- Strutynska NA, Timoshchuk SV, Vavilova GL, Kotsuruba AV, Sagach VF. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to Ca²⁺ in old rat heart under activation of biosynthesis of coenzyme Q. *Fiziol Zh.* 2009; 55(3):44-54 [Ukrainian].
- Kolomiets OV, Danylovych YuV, Danylovych GV, Kosterin SO. Ca²⁺ accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4AM. *Ukr Biochem J.* 2013; 85(4):30-9 [Ukrainian].
- Babich LG, Shlykov SG, Naumova NV, Kosterin SO. Investigation of Ca²⁺-induced changes of membrane potential of smooth muscle mitochondria using flow cytometric analysis. *Ukr Biochem J.* 2007; 79(6):34-41 [Ukrainian].
- Babich LG, Shlykov SG, Naumova NV, Kosterin SO. Use of flow cytometry method to determine Ca²⁺ content in mitochondria and influence of calmodulin antagonists on it. *Ukr Biochem J.* 2008; 80(4):51-8 [Ukrainian].
- Zalesky VN. Molecular diagnostics: laser-scanning and flow cytometry in the analysis of apoptosis. *Ukr Med Chasopys.* 2010; 78(4):27-31 [Ukrainian].
- Sagach VF, Vavilova GL, Strutynska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh.* 2004; 50(2): 49-63 [Ukrainian].
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; (1):265-75.
- Brand MD, Brown GC, Cooper CE, Editors, Bioenergetics: a practical approach. Oxford.: IRL Press. 1995; 39-62.
- Borutaite V, Mildaziene V, Brown GC, Brand MD. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? *Biochim and Biophys Acta.* 1995; (1272):154-8.
- Jean-Quartier C, Bondarenko AI, Alam MR, Trenker M, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. Studying mitochondrial Ca²⁺ uptake – a revisit. *Mol and Cell Endocrinol.* 2012; 353:114-127.
- Szabadkai G, Duchon MR. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology.* 2008; 23:84-94.
- Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol and Cell Cardiol.* 2013; 58:125-33.

Матеріал надійшов до редакції 03.08.2015

Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини

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

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; e-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Оцінювали вплив Lys-плазміногену на секрецію α -гранул тромбоцитів. Як маркер екзоцитозу використовували Р-селектин, рівень експонування якого на плазматичній мембрані відмитих тромбоцитів людини визначали із застосуванням протокової цитофлуориметрії. Встановлено, що Lys-плазміноген викликає неповне вивільнення вмісту α -гранул, однак пригнічує тромбініндуковану секрецію тромбоцитів. Його ефекти на секреторні процеси у тромбоцитах не пов'язані з утворенням активної протеїнази плазміну, а, вірогідно, реалізуються завдяки взаємодіям некаталітичних (кринглових) доменів молекули з мембранними рецепторами. На відміну від Lys-форми, нативний проензим (Glu-плазміноген) не викликав змін секреторної активності тромбоцитів. Отже, вперше продемонстровано здатність Lys-плазміногену модулювати секрецію α -гранул тромбоцитів, що може розглядатися як один з можливих механізмів реалізації його антиагрегативної активності. Ключові слова: тромбоцити; секреція тромбоцитів; α -гранули; Р-селектин; плазміноген; протокова цитофлуориметрія.

ВСТУП

Плазміноген/плазмінова система відіграє ключову роль у руйнуванні фібринових згустків та підтриманні гемостатичного балансу крові. Припускається, що протеїни, які входять до складу цієї системи, також лімітують надмірне тромбоутворення, регулюючи клітинну ланку гемостазу [1, 2]. Нативна форма молекули (Glu-плазміноген) є неактивним попередником ключової протеїнази фібринолітичної системи плазміну (ЕС 3.4.21.7). Крім того, обмежений протеоліз Glu-плазміногену призводить до появи низки фрагментованих молекул, які здатні виконувати самостійні фізіологічні функції. Так, у результаті гідролізу плазміном пептидного зв'язку Lys77-Lys78 (рідше Lys78-Val79, Arg68-Met69) та відщеплення фінгер-домену Glu-плазміноген перетворюється на частково деградовану форму – Lys-плазміноген, що має більш відкриту конформацією. Він характеризується більш високою швидкістю активації та спорідненістю до фібрину і мем-

бранних рецепторів порівняно з нативним плазміногеном [3]. Наявність структурно-конформаційних особливостей Lys-плазміногену може зумовлювати унікальні функції цього протеїну, які не притаманні вихідній молекулі.

Питання щодо механізмів утворення Lys-плазміногену в організмі, а також його фізіологічної ролі, досліджені недостатньо. Доведено принципову можливість його утворення з нативного проензиму на поверхні деяких клітин крові, зокрема тромбоцитів [4, 5]. Як відомо, тромбоцитарна плазматична мембрана містить сайти зв'язування для плазміногену і протеїназ-активаторів. Кількість плазміногенових «рецепторів», які експонуються на поверхні тромбоцитів, значно зростає в результаті їх активації [6, 7]. Потенційна роль Lys-плазміногену у регуляції функціональної активності тромбоцитів досліджено недостатньо. Наші попередні експериментальні дані демонструють, що Lys-, на відміну від Glu-плазміногену, пригнічує агрегацію відмитих тромбоцитів лю-

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

дини, індуковану тромбіном або колагеном [8]. Крім того, Lys-плазміноген інгібував адекватну реконструкцію актинового цитоскелета тромбоцитів за умов дії активаторів [9]. Відомо, що цитоскелетні структури контролюють цілу низку процесів у тромбоцитах, зокрема секрецію їх α -гранул [10]. Під час секреції тромбоцити вивільняють компоненти α -гранул, а саме: фактор V, фібриноген, вітронектин, тромбоспондин тощо. Секреція є ключовим етапом, необхідним для подальшої активації тромбоцитів та індукції вторинної (незворотної) хвилі агрегації. Крім того, речовини, що містяться у складі цих гранул, зумовлюють участь тромбоцитів не лише у процесах згортання, але й у регуляції ними функціонування інших клітин крові та ендотеліоцитів [11]. Як відомо, у результаті агоністіндукованої активації тромбоцитів, що супроводжується екзоцитозом їх α -гранул, відбувається експонування глікопротеїну Р-селектину (CD62) на поверхні плазматичної мембрани. Тому цей протеїн використовується як чутливий і специфічний маркер активованого стану тромбоцитів, а його детекція методом протокової цитофлуориметрії застосовується для оцінки впливу різних речовин на їх функціональний стан *in vitro* та *in vivo* [12].

Метою нашого дослідження було оцінити вплив Lys-плазміногену на секрецію α -гранул тромбоцитів за змінами експонування Р-селектину на їх поверхні.

МЕТОДИКА

Для отримання тромбоцитів плазму відбирали з венозної крові восьми здорових донорів, які протягом двох тижнів не вживали жодних антитромботичних препаратів, використовуючи цитратний буфер як антикоагулянт. Відмивку тромбоцитів від протеїнів плазми проводили поетапним центрифугуванням крові за методикою, описаною раніше [9].

Агрегометричні показники визначали для перевірки життєздатності тромбоцитів

та адекватності клітинної відповіді на дію агоніста за допомогою оптичного агрегометра «SOLAR AT-02» (Республіка Білорусь) з використанням пакета програм «Агрегометр 2.01» не пізніше трьох годин з моменту забору крові. Для активації тромбоцитів використовували тромбін («Sigma Aldrich», США) у концентрації 1,0 од.НІН/мл. Glu- і Lys-форми плазміногену були отримані відповідно до описаних методик [13] та не проявляли спонтанної протеїназної активності. Досліджувані протеїни застосовували в усіх експериментах у концентрації 1,2 мкмоль/л, яка була обрана на основі отриманих раніше результатів [8, 9]. Інгібітор серинових протеїназ апротинін (Контривен[®], «Біофарма», Україна) додавали у концентраціях 5 IU/мл або 50 IU/мл [14].

Вплив різних форм плазміногену на секреторну активність тромбоцитів оцінювали методом протокової цитофлуориметрії, визначаючи рівень експонування Р-селектину на поверхні їх плазматичної мембрани. Для проведення дослідження відбирали відмиті клітини з їх концентрату у кількості 2,5 млн. та переносили до 100 мкл HEPES-буфера. Було сформовано експериментальну модель, що складалася з таких груп тромбоцитів: контроль (інтактні клітини); інкубація з Glu- або Lys-плазміногеном (час експозиції – 3 хв.); інкубація з тромбіном (5 хв.); обробка тромбіном (5 хв.) після попередньої інкубації з Glu- або Lys-плазміногеном (3 хв.). Окремо досліджували ефекти Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів за наявності інгібітора серинових протеїназ апротиніну. Для цього його додавали до інкубаційного середовища у зазначених вище концентраціях та витримували 1 хв перед внесенням протеїну до суспензії клітин.

Усі процедури, пов'язані з інкубацією тромбоцитів, виконували при 22-25 °С для уникнення їх гіперактивації. Відразу після завершення інкубації до тромбоцитів, оброблених досліджуваними молекулами, а також до проб інтактних клітин вносили 20

мкл антитіл до Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином (PE) («Acris Antibodies, Inc.», Сан-Дієго, США). Інкубацію з антитілами проводили протягом 30 хв. за кімнатної температури у темряві. Реакцію зупиняли розведенням суміші, додаючи 1,5 мл 0,05 моль/л натрій-фосфатного буфера (pH 7,4), що містив 0,13 моль/л хлориду натрію. Усі процедури з використанням антитіл виконувалися згідно з рекомендаціями виробника.

Експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів аналізували методом протокової цитофлуориметрії на приладі COULTER EPICS XL («Beckman Coulter», США), який оснащено аргонним лазером ($\lambda_{\text{збудж.}} = 488$ нм). Кількісну оцінку цього показника проводили з використанням двох показників: 1) відсоток Р-селектинпозитивних клітин від їх загальної кількості, 2) інтенсивність флуоресценції, детекцію котрої здійснювали за каналом FL3 (620-630 нм). Для сортигу тромбоцитів попередньо встановлювали відповідні гейти (гейт 1 – популяція Р-селектиннегативних клітин, гейт 2 – популяція Р-селектинпозитивних клітин). Зміни сигналу флуоресценції визначали за зсувом її кривих відносно маркера (M), який встановлено за цим показником для контрольної групи, та виражали в умовних одиницях, які являли собою десятковий логарифм величин за шкалою Log FL3. Було проаналізовано не менше 10 тис. подій у кожному зразку. Цитометричні показники у кожній групі клітин вимірювали у двох паралелях, розраховуючи потім середні для відповідних величин, отриманих від усіх донорів ($n = 8$). Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США), числові характеристики представлені як середні значення \pm стандартна похибка середньої. Статистичну обробку результатів проводили із використанням критерію t Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У представленій роботі вперше продемонстровано вплив Lys-форми плазміногену на секреторну активність тромбоцитів та можливість модуляції цим протеїном тромбініндукованого екзоцитозу. За результатами цитометричного аналізу, частка Р-селектинпозитивних клітин у препаратах інтактних тромбоцитів (контроль) становила $48 \pm 4,6$ % від їх загальної кількості (рис. 1). Кількість спонтанно активованих тромбоцитів залежить від способу їх отримання та варіює від 50 до 92 % [15], тому отримані за нашою методикою клітини були придатні для подальшої роботи з ними. При інкубації тромбоцитів з тромбіном активується переважна більшість клітин, на що вказує практично повний їх перерозподіл до популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів ($97 \pm 2,3$ %, $P < 0,05$ порівняно з контролем). Вплив Lys-плазміногену призводить до незначного, але статистично вірогідного, зростання пулу тромбоцитів, що презентують Р-селектин ($78 \pm 2,1$ %). Останнє спостереження свідчить про те, що порівняно з дією тромбіну, вплив Lys-плазміногену викликає лише часткове вивільнення α -гранул. Важливий результат отримано на клітинах, котрі активували тромбіном після преінкубації з Lys-плазміногеном. Виявлено меншу кількість тромбоцитів у популяції, яка обмежена гейтом 2 порівняно з клітинами, обробленими лише тромбіном ($85 \pm 1,6$ %, $P < 0,05$).

Зміни між значеннями інтенсивності сигналу флуоресценції інтактних та інкубованих з досліджуваними протеїнами тромбоцитів мали тенденцію, аналогічну тій, що продемонстровано відносно кількісного перерозподілу клітин (рис. 2). У разі з тромбоцитами, інкубованими з тромбіном, спостерігається істотний зсув піку кривої флуоресценції праворуч, що відповідає підсиленню сигналу флуоресценції у 13,8 разів порівняно з таким показником для інтактних клітин ($P < 0,05$). Інтенсивність флуоресценції популяції у

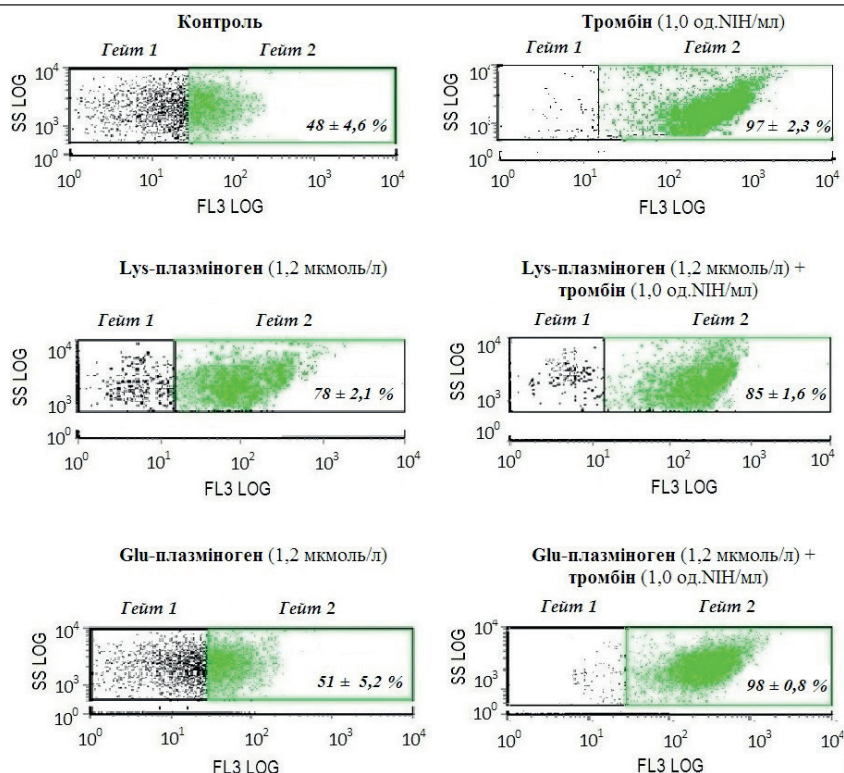


Рис. 1. Вплив Lys- (1,2 мкмоль/л) та Glu-форм плазміногену (1,2 мкмоль/л) на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини (популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів на гістограмах обмежені гейтом 2)

гейт 2 за умов впливу Lys-плазміногену перевищувала контрольні значення приблизно втричі ($P < 0,05$). Lys-плазміноген частково пригнічував тромбініндуковану секрецію α -гранул, про що свідчить дворазове зменшення флуоресцентного сигналу порівняно з цим показником у клітин за ізольованої дії агоністу ($P < 0,05$).

На відміну від Lys-форми, нативний проензим (Glu-плазміноген) не викликав статистично вірогідних змін секреторної активності тромбоцитів як у результаті його ізольованої дії, так і за умов тромбініндукованої активації (див. рис. 1 і 2). Отримані результати збігаються з попередніми, які свідчать, що нативна форма плазміногену не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів і не змінює їх агрегативну активність [9].

Відомо, що перетворення плазміногену на активну протеїназу на поверхні тромбоцитів, як це показано, зокрема, у пацієнтів зі штучним серцево-легеневим кровообігом, є фак-

тором ризику виникнення гіперагрегативного стану та тромбоемболії судин. Показано [16], що плазмін у кількості 0,8 CU/мл індукував секрецію та агрегацію відмитих тромбоцитів, які пригнічувалися за наявності 50 IU/мл аprotиніну, що вказує на провідну роль у цих процесах протеїнасної активності плазміну. Виявилося, що він здатний активувати тромбоцити через розщеплення рецептора PAR-4 [17]. Однак інкубація тромбоцитів за наявності плазміну, який було взято у меншій концентрації (0,2 CU/мл), призвела до практично повного пригнічення агрегації. При цьому плазмін інгібував внутрішньоклітинні процеси, індуковані тромбіном, а саме: рилізінг серотоніну та зростання вмісту цитозольного Ca^{2+} [14]. Результати дослідження Shigeta та співавт. [16] демонструють, що плазміноген здатний інгібувати плзмініндуковану активацію та секрецію тромбоцитів, однак повного їх інгібування не спостерігається навіть за наявності зимогену у кількості, що у чоти-

ри рази перевищує концентрацію ензиму. Протилежний характер ефектів плазміну на функціональний стан тромбоцитів указує на існування множинних шляхів проведення сигналу до середини клітини, на які можуть впливати плазміноген/плазмін. Очевидно, що різні структурно-функціональні частини цих протеїнів визначають специфіку відповіді

тромбоцитів. Отже, наступне питання, яке підлягало експериментальній перевірці у нашій роботі, стосувалося можливої участі активного центру плазміну, який міг утворитися з проензиму на поверхні тромбоцитів, до змін їх секреторної активності. Проведені цитометричні дослідження свідчать про те, що апротинін не впливає на зміни кількості

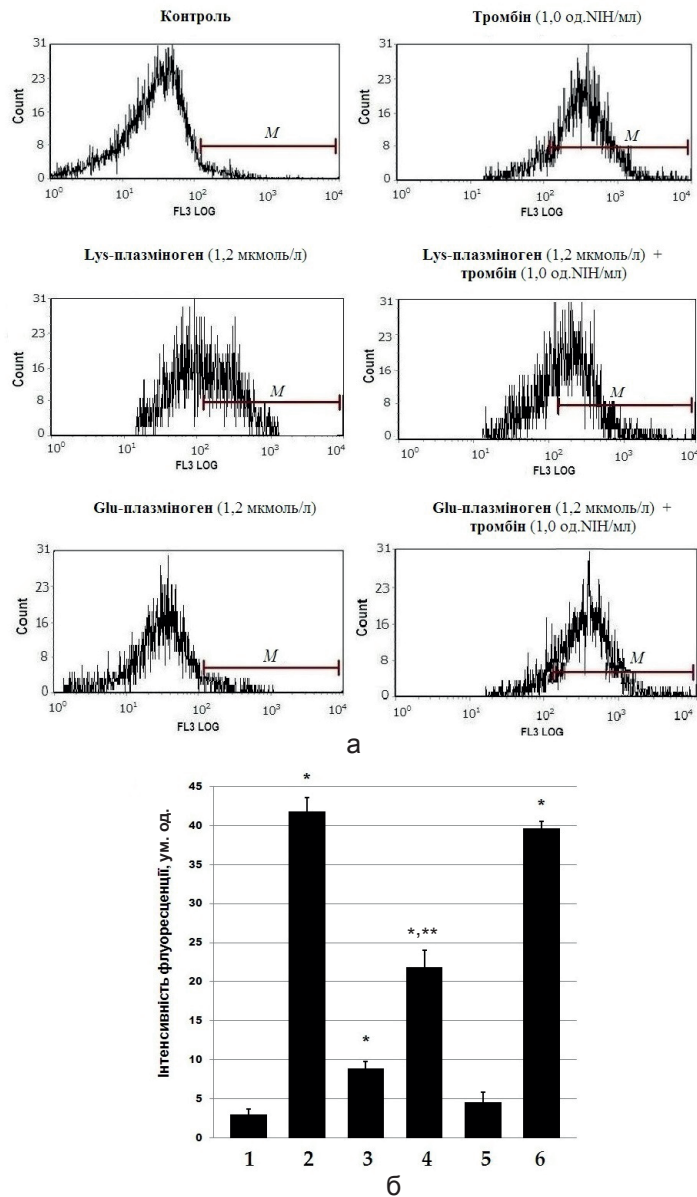


Рис. 2. Ефекти Lys- та Glu-форм плазміногену на інтенсивність флуоресценції за каналом FL3, яка характеризує зв'язування антитілу проти Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином, з відмитими тромбоцитами людини: а – репрезентативні гістограми піків флуоресценції; б – результати кількісного аналізу інтенсивності сигналу.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** порівняно з клітинами, обробленими тромбіном

Р-селектинпозитивних клітин та сигналу флуоресценції, індуковані Lys-плазміногеном (рис. 3). Отже, отримані результати дають змогу припустити, що за створених експериментальних умов вплив Lys-плазміногену на секреторні механізми тромбоцитів не пов'язаний з появою протеїназної активності, а, вірогідно, опосередковується його некаталітичними (крингловими) доменами.

Питання щодо механізмів утворення Lys-плазміногену клітинами та можливого фізіологічного значення цієї молекули залишаються дискусійними. За допомогою антитіл, специфічних до Lys-плазміногену, цю форму проензиму вперше виявили у плазмі крові пацієнтів під час тромболітичної терапії [18]. Пізніше було доведено, що генерація Lys-плазміногену відбувається локально, тому він не циркулює у системному кровотоці здорових донорів. Його було визначено імуногістохімічно на поверхні макрофагів в осередках запалення [19], а також на поверхні ендотеліоцитів судин різних органів як у нормі, так і під час хронічних запальних процесів [20]. Досліджено механізм перицелюлярної активації плазміногену на поверхні моноцитів [5] та ендотеліоцитів [4]. Автори

підкреслюють важливість того, що генерація Lys-плазміногену забезпечує високу ефективність примембранної активації зимогену з утворенням плазміну. Важливе припущення, яке було висунуто на підставі отриманих ними результатів, стосується можливості регуляції кількості Lys-плазміногену, що утворюється, залежно від функціонального стану клітин. Результати нашого дослідження розширюють уявлення про механізми дії та значення цього протеїну у функціонуванні тромбоцитів. Вірогідно, що Lys-плазміноген виступає не лише проміжною стадією на шляху до появи активної протеїнази, але й може виконувати альтернативні функції як сигнальна молекула, які не властиві ані Glu-формі плазміногену, ані плазміну. Існуючі численні експериментальні докази вказують на наявність функціонального зв'язку між цитоскелетом тромбоцитів та їх секреторною активністю. Саме актинові мікрофіламенти контролюють переміщення гранул усередині тромбоциту, їх централізацію, злиття з плазматичною мембраною та вивільнення [10, 21]. У нашій попередній роботі [9] встановлено, що Lys-плазміноген запобігає адекватній реконструкції актинового цитоскелета, індукованої тромбіном, перешкоджаючи

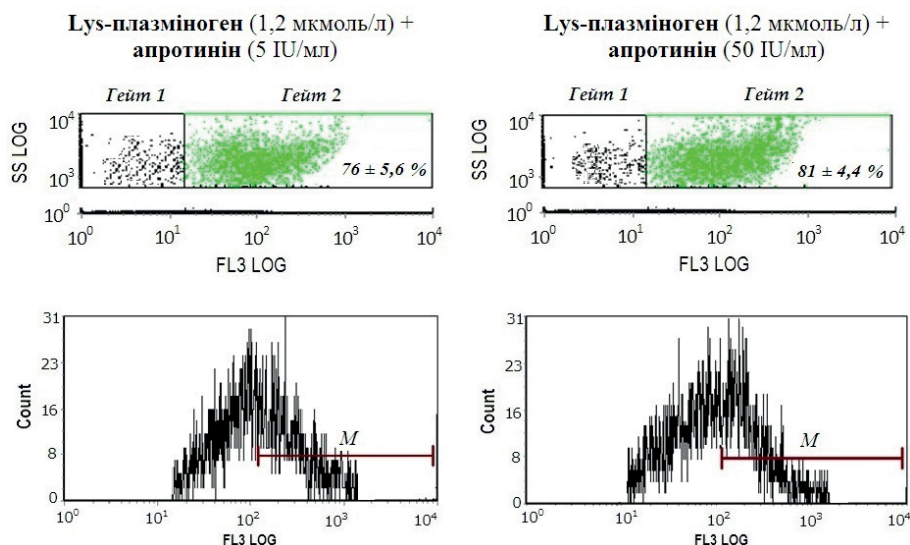


Рис. 3. Вплив Lys-плазміногену на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини за наявності аprotиніну

асоціації мембранного кортекса з філаментним апаратом цитозолу. Можна припустити, що зазначені ефекти Lys-плазміногену є наслідком аберантної збірки актинового цитоскелета, як це показано раніше у дослідках з використанням агентів-інгібіторів полімеризації актину, зокрема цитохалазину Н [22]. Можливо, що саме зрушення цитоскелетних структур, викликане Lys-плазміногеном, спричинює часткову секрецію α -гранул, але водночас унеможлиблює нормальну відповідь тромбоцитів на дію агоніста.

Слід зауважити, що порушення секреції α -гранул може призводити до розвитку різних тромбоцитопатій, у патогенезі яких провідну роль відіграє недостатність функції Р-селектину. Цей глікопротеїн, що експонується активованими тромбоцитами, є основним компонентом, який бере участь у взаємодії тромбоцитів з нейтрофілами та моноцитами і, таким чином, відповідає за утворення тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів. Крім того, як рецептор Р-селектин відіграє значну роль у стабілізації тромбоцитарних агрегатів, а також залучається до ролінгу тромбоцитів на поверхні активованих ендотеліальних клітин [23, 24]. Отримані результати свідчать про те, що один із шляхів регуляції функціональних взаємодій тромбоцитів може реалізовуватися через модуляцію експонування Р-селектину, опосередковану Lys-плазміногеном. Подальші дослідження можуть бути корисними для розкриття молекулярних механізмів регуляції протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонування тромбоцитарної ланки гемостазу. Вирішення цих питань необхідне для розробки принципово нових підходів для корекції численних патологій, асоційованих з підвищеною активністю тромбоцитів та надмірним тромбоутворенням.

ВИСНОВКИ

1. Lys-форма плазміногену сприяє неповному рилізінгу α -гранул відмитих тромбоцитів

людини та частково пригнічує їх тромбініндуковану секрецію.

2. Вплив Lys-плазміногену на екзоцитоз тромбоцитів не пов'язаний з утворенням активної протеїнази плазміну, а реалізується завдяки взаємодіям його некаталітичних (кринглових) доменів з рецепторними молекулами на поверхні тромбоцитів.

3. Нативна форма плазміногену (Glu-плазміноген) не впливає на секреторну активність тромбоцитів.

4. Отримані результати дають змогу розглядати порушення агоніст-індукованої секреції α -гранул тромбоцитів як один з механізмів антиагрегативної активності Lys-плазміногену.

Колектив авторів висловлює щире подяку молодшому науковому співробітнику Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України М.М. Гузику за технічну допомогу та обговорення результатів.

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

ВЛИЯНИЕ LYS-ПЛАЗМИНОГЕНА НА СЕКРЕЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Оценивали эффекты Lys-плазминогена на секрецию α -гранул тромбоцитов. Как маркер экзоцитоза использовали Р-селектин, уровень экспонирования которого на плазматической мембране отмытых тромбоцитов человека определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Установлено, что Lys-плазминоген вызывает неполное высвобождение содержимого α -гранул, но в то же время угнетает тромбининдуцированную секрецию тромбоцитов. Его эффекты на секреторные процессы в тромбоцитах не связаны с образованием активной протеиназы плазмина, а, вероятно, реализуются благодаря взаимодействиям некаталитических (крингловых) доменов молекулы с мембранными рецепторами. В отличие от Lys-формы, нативный профермент (Glu-плазминоген) не вызывал изменений секреторной активности тромбоцитов. Таким образом, в представленной работе впервые продемонстрирована способность Lys-плазминогена модулировать секрецию α -гранул тромбоцитов, что может рассматриваться как один из возможных механизмов реализации его антиагрегативной активности.

Ключевые слова: тромбоциты; секреция тромбоцитов; α -гранулы; Р-селектин; плазминоген; проточная цитофлуориметрия.

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

THE EFFECTS OF LYS-PLASMINOGEN ON HUMAN PLATELET SECRETION

The effects of Lys- plasminogen on platelet α -granule secretion were studied. The level of P-selectin exposed on the surface of plasma membranes of washed human platelets was measured by flow cytometry as a marker of α -granule secretion. It was shown that Lys- plasminogen facilitates partial release of α -granules, but impedes thrombin-induced platelet exocytosis. It is suggested that Lys- plasminogen may affect platelet secretion rather through interaction of its non-catalytic (kringle) domains with membrane receptors than due to contaminating plasmin activity. In contrast to Lys-form, native proenzyme (Glu-plasminogen) had no effects on α -granule releasing. Here, we provide the first experimental demonstration that Lys-form of plasminogen is able to modulate platelet α -granule secretion, and this effect can be considered as one of the plausible mechanisms of its anti-aggregating activity.

Key words: platelets; platelet secretion; α -granules; P-selectin; plasminogen; flow cytometry.

Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23(6): 836-41.
2. Zhernosekov DD, Iusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukr Biokhim Zh.* 2012; 84(4): 5-19. [Russian].
3. Miles LA, Castellino FJ, Gong Y. Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(1): 21-30.
4. Gong Y, Kim SO, Felez J, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 2001; 276(22): 19078-83.
5. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoic cell surface. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(6): 1264-70.
6. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem.* 1985; 260(7): 4303-11.
7. Baeten KM, Richard MC, Kanse SM, Mutch NJ, Degen JL, Booth NA. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by platelet-associated plasminogen: a mechanism for stimulation of fibrinolysis by platelets. *J Thromb Haemost.* 2010; 8(6): 1313-22.
8. Roka-Moya YM, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation.

- Biopolymers and Cell. 2012; 28(5): 352-356. [Ukrainian].
9. Tykhomyrov AO, Zhernosekov DD, Roka-Moya IM, Diordieva SI, Grinenko TV. Effects of Lys-form of plasminogen on platelet actin cytoskeleton. *Fiziol Zh.* 2014; 60(1): 25-33. (in Ukrainian)
10. Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood.* 2005; 105(10): 3879-87.
11. Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004; 126(3): 298-306.
12. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006; 35(1-2): 67-82.
13. Kim PY, Tieu LD, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2012; 287(7): 4652-61.
14. Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA. Pretreatment of human platelets with plasmin inhibits responses to thrombin, but potentiates responses to low concentrations of aggregating agents, including the thrombin receptor activating peptide, SFLRN. *Thromb Haemost.* 1997; 77(4): 741-7.
15. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273(2): 565-70.
16. Shigeta O, Kojima H, Jikuya T, Terada Y, Atsumi N, Sakakibara Y, Nagasawa T, Mitsui T. Aprotinin inhibits plasmin-induced platelet activation during cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1997; 96(2): 569-74.
17. Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem.* 2004; 279(18): 18434-9.
18. Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo. *J Biol Chem.* 1985; 260(22): 12106-11.
19. Silverstein RL, Friedlander RJ Jr, Nicholas RL, Nachman RL. Binding of Lys-plasminogen to monocytes/macrophages. *J Clin Invest.* 1988; 82(6): 1948-55.
20. Hajjar KA, Nachman RL. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *J Clin Invest.* 1988; 82(5): 1769-78.
21. Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, Dowal L, Blair PS, Peters CG, et al. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. *Biochemistry.* 2010; 49(21): 4533-42.
22. Natarajan P, May JA, Sanderson HM, Zabe M, Spangenberg P, Heptinstall S. Effects of cytochalasin H, a potent inhibitor of cytoskeletal reorganization, on platelet function. *Platelets.* 2000; 11(8): 467-76.
23. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets

determines size and stability of platelet aggregates.
Circulation. 2000; 102(16): 1931-6.
24. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets

roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction
mediated by endothelial P-selectin. Proc Natl Acad Sci U
S A. 1995; 92(16): 7450-4.

*Матеріал надійшов до
редакції 23.03.2015*

Енергетичний та антиоксидантний статус мітохондрій печінки щурів за умов гіпоксії-реоксигенації різної тривалості

О.О.Гончар¹, В.І.Носар¹, Л.В.Братусь¹, І.М.Тимченко², М.М.Стешенко¹, І.М.Маньковська¹

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, ²ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ»; e-mail: ogonchar@yandex.ru

Досліджували зміни функціональної активності та експресії білка антирадикальних Мп-супероксиддисмутази (Мп-СОД), глутатіонзалежних (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази) та НАДФН-генеруючих (НАДФ-ізоцитратдегідрогенази) ферментів, а також показників енергетичного метаболізму мітохондрій печінки щурів, яких піддавали впливу жорсткої (5% O₂) гіпоксії в сеансах гіпоксії – реоксигенації різної тривалості (1, 3, 7, 14 діб). Пролонгована гіпоксія – реоксигенація характеризувалася фазовими коливаннями концентрації кортикостерону в крові щурів, які відповідали змінам в енергетичному обміні, а також у про- та антиоксидантному балансі мітохондрій. Було показано, що короткотермінова гіпоксія – реоксигенація з використанням 5% O₂ у газовій суміші (1 доба) викликала зростання концентрації кортикостерону, а також значну активацію прооксидантних процесів та енергетичного обміну, інтенсивність яких знижувалася на 3-тю добу. Довготривала гіпоксія – реоксигенація (7–14-та доба) призводила до поступового виснаження адаптаційних можливостей організму, про що свідчить різке зниження концентрації кортикостерону в крові щурів, зростання вмісту вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів, дисбаланс у про- та антиоксидантних реакціях, зниження енергетичних можливостей мітохондрій клітин печінки. Динаміка активності та експресії білка глутатіонпероксидази позитивно корелювала зі вмістом H₂O₂ та негативно – з кількістю білка Мп-СОД впродовж 1–7-ї доби експерименту, і лише на 14-ту добу щоденних сеансів гіпоксії – реоксигенації функціональна активність та експресія білка Мп-СОД наближалися до контрольних значень. Зростання активності НАДФ-ізоцитратдегідрогенази, глутатіонпероксидази, та глутатіонредуктази за умов довготривалої дії гіпоксії – реоксигенації свідчить про активне включення глутатіонових, а також НАДФН-генеруючих ферментів у процеси антиоксидантного захисту.

Ключові слова: гіпоксія – реоксигенація; мітохондрії; антиоксидантні ферменти; експресія білка.

ВСТУП

У наш час збільшується розповсюдженість і вірогідність розвитку патологічних станів, пов'язаних з гіпоксією та реоксигенацією. Відомо, що реакція організму на такий екзогенний вплив, поряд з низкою різних регуляторних процесів, забезпечується також і стрес-реалізуючими симпатно-адреномедулярною та гіпоталамо-гіпофізо-кортикоадреналовою системами. Важливою пристосувальною реакцією за цих умов є фазова активація стрес-

гормонів: глюкокортикоїдів, катехоламінів, та кортикотропіну [1, 2]. Повідомляється, що глюкокортикоїди стабілізують клітинні мембрани, активують деякі ферменти дихального ланцюга, сприяють низці інших метаболічних ефектів пристосувального характеру, що впливають на стійкість клітин до нестачі кисню [3].

Мітохондріям належить центральне місце у клітинній адаптації до зміни вмісту кисню завдяки залученню їх у метаболічні,

© О.О.Гончар, В.І.Носар, Л.В.Братусь, І.М.Тимченко, М.М.Стешенко, І.М.Маньковська

енергетичні та вільнорадикальні процеси [4]. За умов окисного стресу, що супроводжує гіпоксію–реоксигенацію, дослідження функціонування мітохондрій набуває особливого значення, оскільки вони відіграють ключову роль в енергозабезпеченні організму, і є одним із джерел активних кисневих метаболітів, які з одного боку можуть виступати деструктивним фактором, а з іншого – центральним регуляторним та виконавчим ланцюгом сигнальних клітинних каскадів [1, 4]. У цьому аспекті важливим є дослідження стану антиоксидантної системи мітохондрій, від активності та експресії білка різних компонентів якої залежать не тільки ефективність захисних процесів, але й стан редоксчутливих регуляторних факторів, що ініціюють різноманітні сигнальні шляхи [5]. Ланка антиоксидантних реакцій у механізмах захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вона не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, накопиченню супероксид-аніонів, органічних і неорганічних перекисів, але й підтримує високу активність окисно–відновних процесів, забезпечує елімінацію кисневих метаболітів із залученням їх в енергетичний обмін, сприяє активності синтетичних процесів [6]. Відомо, що функціонування як неферментної, так і ферментної ланок антиоксидантного захисту залежить від фонду донорів водню [6, 7]. Внутрішньоклітинні запаси НАДФН забезпечують підтримку глутатіону у відновленому стані і тим самим впливають на стан глутатіонового редокс-циклу [8]. Припускають, що у мітохондріях з усіх ферментів – донорів НАДФН ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ) належить вагома роль. У працях останніх років показано значне зростання продукції активних форм кисню (АФК), фрагментація ДНК, інтенсифікація процесів ПОЛ, зменшення вмісту АТФ у мітохондріях при зниженні експресії ІЦДГ [9]. Однак функція мітохондріальної ІЦДГ, яка каталізує декарбоксилювання ізоцитрату в α -кетоглутарат із конкурентною продукцією НАДФН [7, 9],

за умов переривчастої гіпоксії залишається невизнаною.

Відомо, що помірна (10 – 12% O_2) гіпоксія може ефективно стимулювати різні метаболічні процеси і цей феномен широко застосовується в медичній і спортивній практиці [10 – 12]. У літературі дискутуються питання щодо інтенсивності та тривалості циклів гіпоксія–реоксигенація у процесі інтервальних гіпоксичних тренувань, однак однозначного погляду на цю проблему немає [5, 10]. Яким буде вплив жорсткої (5% O_2) гіпоксії в сеансах гіпоксії–реоксигенації різної тривалості на про- та антиоксидантний гомеостаз і енергозабезпечення мітохондрій, ще остаточно не з'ясовано.

Мета нашого дослідження – вивчення динаміки функціональної активності та експресії білка антирадикальних (Mn-SOD), глутатіонзалежних (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази), та НАДФН – генеруючих (НАДФ-ізоцитратдегідрогенази) ферментів, а також енергетичного метаболізму мітохондрій печінки щурів, яких піддавали впливу жорсткої гіпоксії–реоксигенації, за умов фазових змін у крові вмісту кортикостерону.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 230-250г, які знаходилися на стандартному раціоні. Тварин, яких розподілили на групи по 8 у кожній, піддавали щодня дії жорсткої гіпоксії (дихання гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 5% O_2 в N_2 протягом 30 хв) з наступною 24-годинною реоксигенацією (21% O_2). Контрольну групу складала тварини, яких утримували за нормоксичних умов – 1-ша група. Дослідження проводили після першої доби експерименту– 2-га група; після 3-ї доби– 3-тя група; після 7-ї доби– 4-та група; після 14-ї доби – 5-та група. Сеанси гіпоксії–реоксигенації відбувалися у герметичних нормобаричних камерах, де підтримувалася постійна кімнатна температура. Для погли-

нання виділеного вуглекислого газу і водяних парів у камерах використовували адсорбент. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відразу після експерименту. Тварин утримували та маніпуляції з ними здійснювали відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Печінку, видалену з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином NaCl. Усі маніпуляції проводили при 0-4°C. Мітохондрії з гомогенатів печінки отримували методом диференційного центрифугування. Середовище виділення мітохондрій містило (ммоль/л) сахарози—250, Тріс HCl—10, EGTA—1 та 0,5 % БСА (pH 7,6). Відмивали та ресуспендували мітохондрії у середовищі, яке не мало у своєму складі EGTA та БСА. Процеси АДФ-стимульованого дихання та окисного фосфорилування мітохондрій печінки вивчали полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка та оксиграфа (Oxygraph System «Hansatech», Англія). Функціональний стан мітохондрій досліджували методом Chance та Williams [13]. Середовище інкубації складалося з (ммоль/л): KCl—120, KH_2PO_4 —2, HEPES—10 (pH 7,2). Субстратами окиснення були (ммоль/л): сукцинат натрію—5; глутамат натрію—5; малат—2,5. У середовище додавали 200 мкмоль/л АДФ. Інгібітором мітохондріального ферментного комплексу I був ротенон (2 мкмоль/л). За отриманими полярограмами розраховували такі показники: швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (в метаболічному стані 4 за Чансом, V_4) дихання мітохондрій, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) [13], коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О [14]. Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі.

Для біохімічних досліджень мітохондріальні протеїни солюбілізували додаванням 0,1%-го розчину Тритон X-100. У суспензії мітохондрій вивчали вміст активних продук-

тів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [15] та H_2O_2 [16]. Активність Mn—супероксиддисмутази (Mn-SOD) визначали за методом [17], що ґрунтується на її здатності гальмувати аутоокиснення адреналіну. Активність мітохондріальної глутатіонредуктази оцінювали спектрофотометрично за зменшенням вмісту НАДФН за 1 хв на 1 мг протеїну за довжини хвилі 340 нм [18]. Активність селензалежної глутатіонпероксидази визначали реєстрацією швидкості окиснення НАДФН за наявності відновленого глутатіону, пероксиду водню та глутатіонредуктази (2,4 U/мл) [19]. Активність НАДФ-ізоцитратдегідрогенази (НАДФ-ІЦДГ) досліджували за швидкістю відновлення НАДФН у середовищі, що містило (ммоль/л): Тріс-HCl—50, ізоцитрату—1,5, НАДФН—0,25 (pH 7,8) [18].

Рівень експресії білка антиоксидантних ферментів у мітохондріальній фракції печінки визначали за допомогою імуноблотингу. Білки розділяли у 12%-му поліакриламідному гелі на обладнанні BioRad і переносили на PVDF- мембрану за допомогою електроелектролізу. Застосовували первинні моноклональні антитіла до Mn-SOD (1:1000, «Sigma» США), глутатіонпероксидази (1:500, «Santa Cruz Biotechnology» США), β -актину (1:1000, «Santa Cruz Biotechnology» США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрину (1:2000 «Sigma» США). Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили за допомогою їх сканування та обробки комп'ютерною програмою GelPro. Вміст білка визначали за методом Бредфорд. Концентрацію кортикостерону у крові щурів вимірювали за допомогою флуориметричного методу [20]. Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми «Origin 7.0». Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test). Для встановлення ступеня зв'язку між вивченими показниками був проведений кореляційний аналіз із визначенням коефіцієнта кореляції Спірмана (r).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з результатами досліджень, жорстка гіпоксія – реоксигенація викликала зміни концентрації кортикостерону в плазмі крові, вираженість та спрямованість яких залежала від тривалості впливу (рис.1). Так, за 1-шу добу значення цього показника збільшувалося на 24% порівняно з контрольною групою ($P<0,05$), за 3-тю добу воно продовжувало зростати та було на 36% вищим за контроль ($P<0,05$). Проте при збільшенні тривалості впливу гіпоксії-реоксигенації до 7 діб, концентрація кортикостерону мала тенденцію до зниження, а на 14-ту добу була на 26% нижчою за контроль ($P<0,05$), що може бути викликано виснаженням стрес-лімітуючих систем організму. Зростання концентрації кортикостерону протягом перших (1 – 3) діб корелює з даними інших дослідників, які показали підвищення вмісту кортикостероїдних гормонів та кортиколиберину у відповідь на дію пролонгованої інтервальної гіпоксії, а також гострої гіпоксії [21, 22]. Відомо, що остання активує секрецію адренокортикотропного гормону через цАМФ-залежні механізми, які регулюються кортиколиберином, вазопресинном та норепінефрином [23], і ступінь такої активації знижується при збільшенні тривалості гіпоксичного впливу [21, 23]. Отже, отримані нами результати

вказують на фазовий характер змін концентрації стрес-гормону в крові щурів за умов гіпоксії-реоксигенації.

Визначені нами показники окисного фосфорилування в мітохондріях печінки щурів за 1-шу добу після дії гіпоксії – реоксигенації свідчать, що в разі окиснення сукцинату вірогідних змін у роботі дихального ланцюга та синтезу АТФ не було зареєстровано (табл.1). За умов окиснення НАД-залежних субстратів відбувалася низка змін інтенсивності кисне-залежних процесів у мітохондріях печінки, а саме: підвищувалася швидкість субстратного дихання мітохондрій (V_4^s), знижувалися дихальний контроль та енергетична ефективність синтезу АТФ (АДФ/О) (табл.2). Отже за умов дії жорсткої гіпоксії-реоксигенації збільшується внесок сукцинатаоксидазного шляху порівняно з НАДН-оксидазним у потік електронів дихального ланцюга, оскільки він менш чутливий до дефіциту кисню. Крім того, за умов дії гострої гіпоксії, сукцинат накопичується у тканинах, що робить його доступнішим до окиснення [24].

Після 3-ї доби гіпоксії – реоксигенації за умов окиснення сукцинату зростала швидкість субстратного дихання відносно контролю, решта показників залишалася на рівні контрольних значень. Зміни в енергетичному метаболізмі мітохондрій за умов

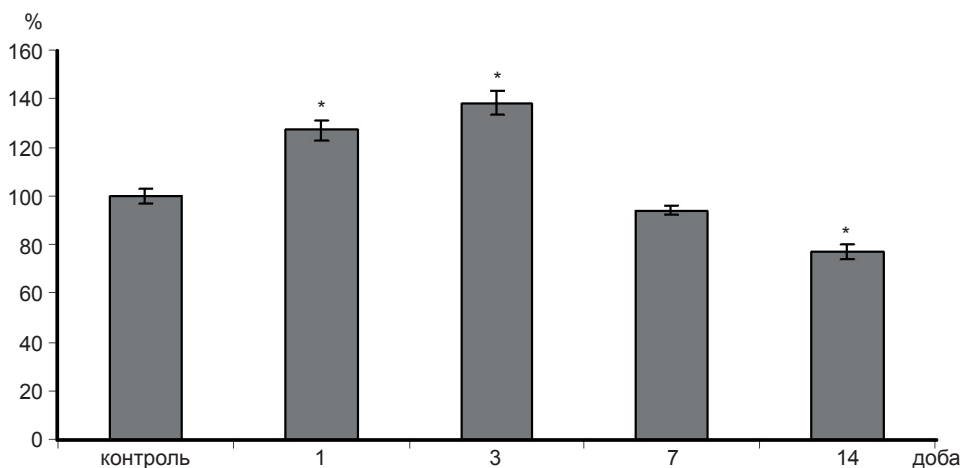


Рис. 1 Вплив жорсткої гіпоксії – реоксигенації на концентрацію кортикостерону у крові щурів. Показники у тварин контрольної групи прийняті за 100%. * $P<0,05$ відносно контролю

Таблиця 1. Вплив жорсткої гіпоксії – реоксигенації на показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при застосуванні 5 ммоль/л сукцинату як субстрату окиснення і 2 мкмоль/л ротенону (нг атом О· хв⁻¹·мг⁻¹білка; М±m; n=8)

Умови досліджу	V ₄ ^s	V ₃	V ₄ ^{АТФ}	V ₃ /V ₄ ^{АТФ}	АДФ/О
Контроль	25,00±1,25	56,71±5,89	24,4±2,0	2,32±0,08	1,60±0,08
Через					
1 добу	22,21±4,12	58,30±7,76	23,70±3,15	2,46±0,11	1,48±0,14
3 доби	37,70±4,16*	49,11±5,07	21,92±2,96	2,24±0,10	1,46±0,07
7 діб	24,82±1,60	64,73±4,61	26,53±1,21	2,44±0,09	1,49±0,05
14 діб	30,51±2,91*	67,60±4,24*	31,32±0,90*	2,16±0,08	1,44±0,08

Примітка. Тут і в табл.2 * P<0,05 відносно контролю

окиснення глутамату і малату виявлялися лише в зменшенні спряження дихання з фосфорилуванням.

На 7-му добу гіпоксії–реоксигенації істотні біоенергетичні зміни відбувалися, головним чином, при окисненні НАД-залежних субстратів: зростало субстратне дихання, зменшувалося дихання в активному стані органел, його спряження з фосфорилуванням та ефективність використання кисню (див. табл.1). Отже, наведені результати вказують на суттєве зниження енергетичного обміну мітохондрій печінки за умов окиснення НАД-залежних субстратів внаслідок впливу на щурів гіпоксії–реоксигенації протягом 7 сеансів.

Після 14-го сеансу гіпоксії–реоксигенації окиснення ФАД-залежних субстратів характеризується зростанням параметрів дихання в станах V₄^s, V₃, V₄^{АТФ} на тлі тенденції до зниження спряження дихання з фосфорилуванням та АДФ/О. За умов окиснення НАД-залежних субстратів зростала швидкість субстратного та контрольованого дихання

при зниженні дихального контролю та коефіцієнта АДФ/О. Отже, за умов окиснення сукцинату відбувалося м'яке роз'єднання дихального ланцюга мітохондрій печінки, яке супроводжувалося лише незначними змінами енергетичного обміну. Отримані нами результати узгоджуються з твердженням [24], що за умов стресу різного генезу (гіпоксії, гіпокінезії тощо) найбільших змін зазнає мітохондріальний ферментний дихальний комплекс I, оскільки саме при використанні НАД-залежних субстратів суттєво знижується енергозабезпечення організму при гіпоксії.

Вважається, що циклічні переходи гіпоксія – нормоксія реалізують свій вплив на енергетичний метаболізм, в основному, через активацію вільнорадикальних процесів, які ініціюються надлишком донорів електронів відновлених еквівалентів, що накопичуються при гіпоксії та, в результаті зростання O₂ як акцептора електронів, при реоксигенації [1]. Як показали наші дослідження, застосування прийнятої схеми гіпоксії–реоксигенації

Таблиця 2. Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації на показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при використуванні 5 ммоль/л глутамату і 2,5 ммоль/л малату як субстратів окиснення (нг атом О· хв⁻¹·мг⁻¹білка; М±m; n=8)

Умови досліджу	V ₄ ^s	V ₃	V ₄ ^{АТФ}	V ₃ /V ₄ ^{АТФ}	АДФ/О
Контроль	22,00±2,06	50,31±4,11	19,41±2,39	2,60±0,06	2,45±0,07
Через					
1 добу	31,91±2,87*	44,52±3,18	19,4±0,70	2,49±0,05 [#]	2,31±0,06*
3 доби	23,21±2,66	44,83±4,52	19,55±1,06	2,30±0,06*	2,37±0,05
7 діб	28,00±1,21*	43,00±2,74*	18,21±1,57	2,36±0,10*	2,29±0,06*
14 діб	36,50±5,82*	55,11±4,02	24,31±2,47*	2,27±0,07*	2,17±0,04*

призводило до значних змін у про – та антиоксидантній системі мітохондрій печінки щурів протягом усього періоду досліджень. Так, короткотривала гіпоксія-реоксигенація (1-ша доба) викликала зростання вмісту ТБК-АП на 41% ($P<0,05$) зі зниженням до контрольних значень на 3-тю добу. На 7-му та 14-ту добу експерименту вміст вторинних продуктів ПОЛ продовжував зростати на 43 і 58 % відповідно ($P<0,05$; рис. 2). Деякі автори відмічали, що підвищення ступеня гіпоксії та тривалості періоду реоксигенації призводить до збільшення продукції АФК та появи побічних негативних ефектів. Так, тренування в умовах гіпобаричної гіпоксії (підвищення „висоти” з 5 000 до 6 500м, а також збільшення тривалості кожного циклу в умовах барокамери) викликало порушення мембранних структур серця і, особливо, печінки [5, 12], зниження вмісту глутатіону та активності СОД у мозку щурів [25], що спричинювало зрив адаптації.

Короткотривала гіпоксія-реоксигенація викликала зростання активності Мп-СОД відносно контролю на 56% ($P<0,05$; рис. 3, а), що можна пояснити компенсаторним

підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції супероксид-радикала, який, як відомо, виступає субстратом для Мп-СОД [6]. Інші дослідники також відзначають підвищення активності Мп-СОД за умов гострої гіпоксії, що корелює із зростанням рівня ПОЛ [7, 25, 26]. Відомо, що більша частка супероксидного радикала, який генерується мітохондріями за умов гіпоксії-реоксигенації, вивільняється в мітохондріальний матрикс, де перетворюється на пероксид водню за участю міжмембранної Мп-СОД [1, 4]. Висока активність Мп-СОД, що рееструвалася в мітохондріях за 1-шу добу експерименту, свідчить про швидкий рівень дисмутації O_2^- і відповідає зростанню кількості H_2O_2 (на 48%) порівняно з контролем ($P<0,05$; див. рис. 2). При цьому кількість білка Мп-СОД була нижчою від контрольних значень, що можна пояснити, на нашу думку, напевне зниженням експресії мРНК цього ферменту (див. рис. 3а). У нормі клітини запобігають токсичних ефектів переокисних сполук завдяки антиоксидантним системам, які відповідальні за розпад H_2O_2 . До цих систем відносяться ферменти

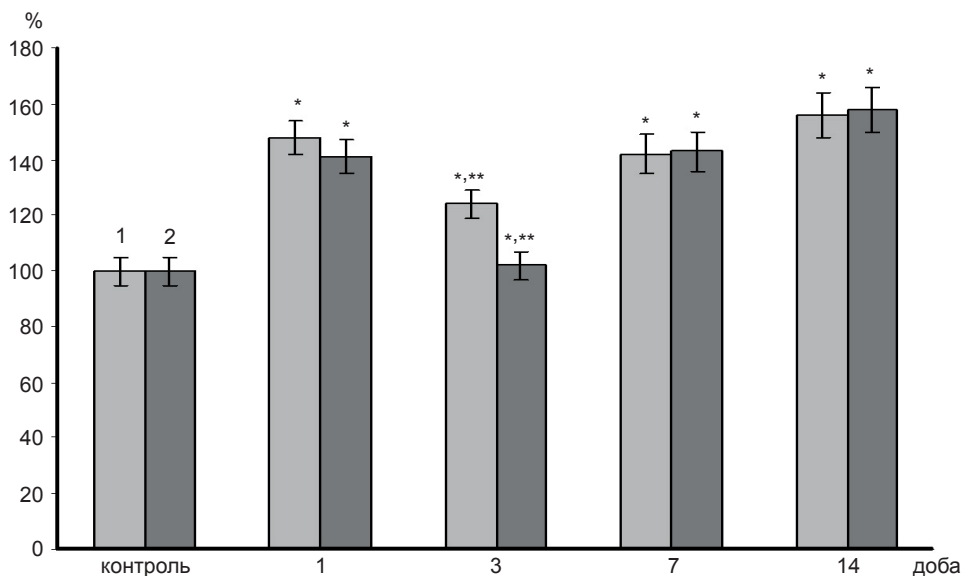


Рис. 2 Вплив жорсткої гіпоксії-реоксигенації на вміст активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (1) та H_2O_2 (2). Показники у тварин контрольної групи прийняті за 100%.

* $P<0,05$ відносно контролю; ** $P<0,05$ відносно показників 1-ї доби

окисно – відновних циклів глутатіону, а саме глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази [6, 8], активність яких у нашому дослідженні за 1-шу добу після впливу гіпоксії–реоксигенації збільшувалася на 41 та 54 % відповідно на відміну від контрольних значень ($P<0,05$). Ріст активності цих ферментів, можливо, був зумовлений достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів НАДФН, про що свідчить різке зростання активності НАДФН-генеруючого ферменту ІЦДГ на 43% ($P<0,05$; див. рис. 3, б). За 3-тю добу щоденних сеансів гіпоксії–реоксигенації в мітохондріях печінки щурів концентрація ТБК-АП, H_2O_2 , так само, як і активність Мп-СОД і глутатіон-залежних ензимів знижувалися відносно значень цих показників на 1-шу добу гіпоксії–реоксигенації ($P<0,05$; див. рис. 2, 3).

Довготривала гіпоксія–реоксигенація призводила до зростання вмісту H_2O_2 (на 42

та 57%), а також активності глутатіонпероксидази (на 17 та 43%) відповідно порівняно з контролем ($P<0,05$). В останні роки з'явилися переконливі свідчення на користь участі H_2O_2 в регуляції різних клітинних процесів, модуляції активності сигнальних молекул, у тому числі фосфатаз, кіназ, факторів транскрипції та ін. [27]. Однак на відміну від деяких інших внутрішньоклітинних медіаторів, наприклад кальцію, H_2O_2 легко проникає крізь мембранні структури і тому не може накопичуватися. Отже сигнали, які H_2O_2 здатний переносити, можуть контролюватися на рівні синтезу – розпаду останнього, що говорить про вагому роль у цих процесах ферментів окисно–відновного циклу глутатіону [8, 28]. Динаміка вмісту H_2O_2 в мітохондріях печінки щурів корелювала з активністю глутатіонпероксидази ($r=0,85$) впродовж усього терміну експерименту. Ці результати узгоджуються зі

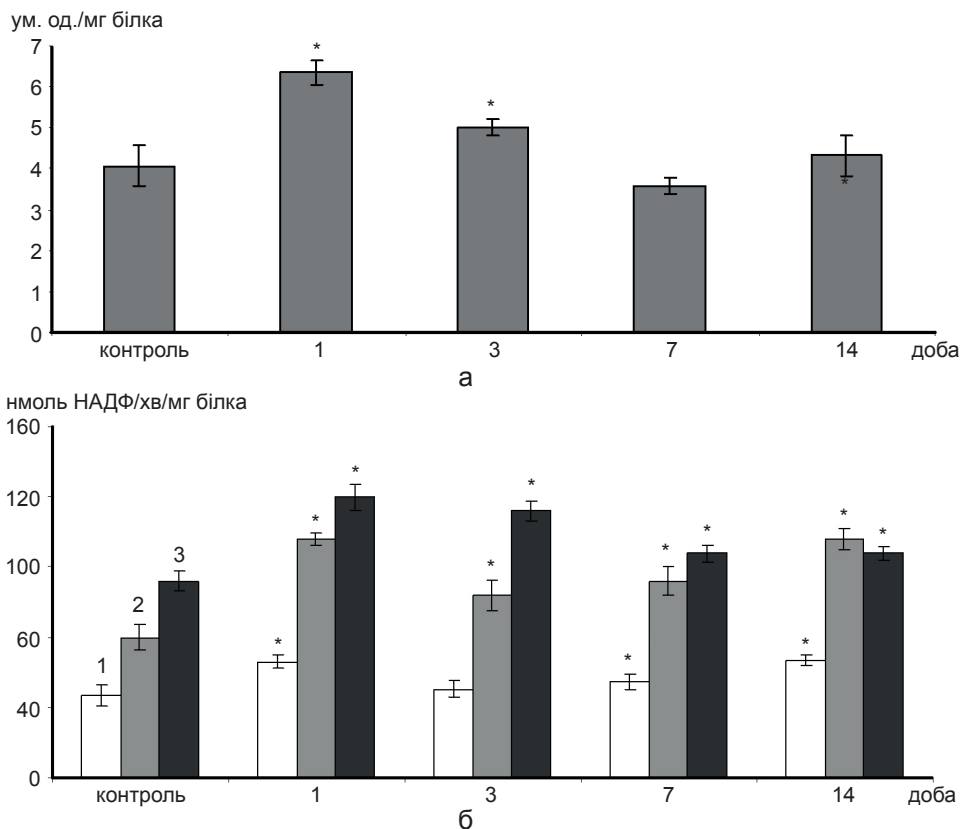


Рис. 3 Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації на активність ферментів: а- Мп- супероксиддисмутази; б- глутатіонпероксидази (1), глутатіонредуктази (2), та НАДФ-ізоцитратдегідрогенази (3) в мітохондріях печінки щурів. * $P<0,05$ відносно контролю

значеннями експресії білка глутатіонпероксидази (рис. 4). Так, рівень експресії білка глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки щурів з 1-ї по 14-ту добу експерименту був вище від контрольних значень (на 14-ту добу до 70%, $P<0,05$), що свідчить про активізацію синтезу цього ферменту. Можна вважати, що індукція глутатіонпероксидази за таких умов є захисною реакцією на надмірне утворення кисневих метаболітів, які можуть активувати через різні сигнальні шляхи (Nrf2, NF- κ B, AP-1 тощо) експресію антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіонпероксидазу [29]. Позитивна кореляція між рівнем експресії білка та активністю глутатіонпероксидази ($r=0,78$), активністю глутатіонпероксидази та вмістом H_2O_2 ($r=0,86$) за умов довготривалої дії гіпоксії-реоксигенації засвідчує активне включення антиперекисних ферментів у процеси захисту клітин від окисного стресу. Збереження активності глутатіонредуктази за 14-ту добу гіпоксії-реоксигенації, зумовлено, ймовірно, підвищенням активності ІЦДГ на 14% ($P<0,05$), а таким чином, і достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів

НАДФН. Ці результати, а також позитивна кореляція активності глутатіонредуктази та НАДФ-ІЦДГ ($r=0,76$) дають змогу стверджувати, що синтез НАДФН у НАДФ-ІЦДГ реакціях під час дії екстремальних факторів може бути одним із істотних джерел відновлених еквівалентів у мітохондріях печінки щурів.

За тривалої гіпоксії-реоксигенації активність Mn-COD була у межах контролю (див. рис. 3 а). Дослідження кількості білка Mn-COD у мітохондріях печінки щурів імуноблотингом показало, що на 1, 3 та 7-му добу експерименту вона була нижче від контрольних значень і лише через 14 діб гіпоксії-реоксигенації наближалася до контролю (див. рис. 4). Відомо, що додатковим важливим фактором, який впливає на редокс-середовище матриксу мітохондрій, є баланс між активністю пероксидаз і Mn-COD [26, 28, 30]. У цьому дослідженні жорстка гіпоксія за різної тривалості в сеансах гіпоксії-реоксигенації призводила до зростання активності та кількості білка глутатіонпероксидази та, навпаки, до зниження синтезу протеїну Mn-COD. Така

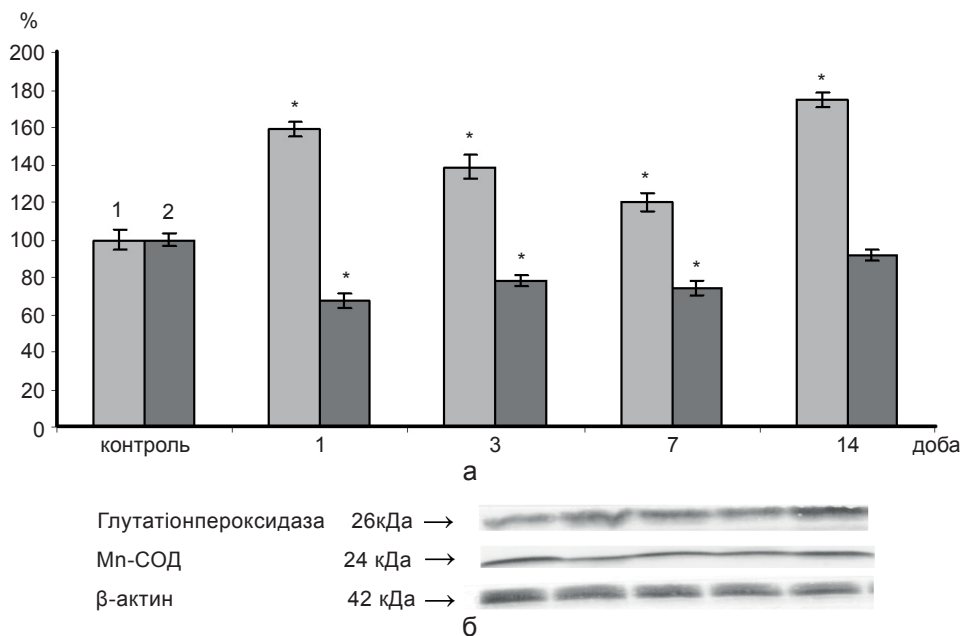


Рис.4. Відносні показники експресії протеїну глутатіонпероксидази (1) та Mn-супероксиддисмути (2 – MnCOD) у мітохондріях печінки тварин, що піддавалися впливу жорсткої гіпоксії-реоксигенації (рівень експресії протеїну у тварин контрольної групи прийнятий за 100%; $n=8$). * $P<0,05$ відносно контролю

динаміка антиоксидантних реакцій на фоні збереження підвищеного вмісту ТБК-АП та H_2O_2 впродовж 1 та 7 – 14-ї доби щоденних сеансів жорсткої гіпоксії – реоксигенації свідчить про неповну збалансованість про- та антиоксидантних процесів у мітохондріях печінки щурів.

Отже, наші дослідження показали, що в процесі жорсткої гіпоксії–реоксигенації можна виділити декілька фаз зміни концентрації кортикостерону в крові щурів. Перша фаза відповідає періоду термінової адаптації, яка характеризується підвищенням вмісту в крові стрес-гормону. Відомо, що у цей період мобілізуються киснетранспортні системи (гіпервентиляція легень, зростання хвилинного об'єму серця, підвищення артеріального тиску), котрі направлені на збереження достатньої ефективності біологічного окиснення у тканинах. Розвивається стресорна реакція з активацією симпатико – адреналової системи і системи АКТГ, мобілізацією енергетичних і пластичних ресурсів на межі фізіологічних можливостей, що не повною мірою забезпечує адаптаційний ефект [2, 3]. Друга фаза відповідає перехідній стадії. В мітохондріях печінки нормалізується про- – антиоксидантний баланс: вміст вторинних продуктів ПОЛ і перекису водню, активність глутатіонпероксидази знижуються до контрольних значень, відновлюється енергозабезпечення клітин печінки. Всі ці процеси відбуваються на тлі підвищеного вмісту кортикостерону в крові щурів. Якщо дія агента, котрий викликав реакції адаптації до гіпоксії, продовжується тривалий час, відбувається поступовий перехід від строквої до довготривалої адаптації, протягом якого організм починає набувати підвищену стійкість до гіпоксії. Однак це відбувається за умов дії подразнюючого фактора помірної сили [2, 3]. У нашому випадку тривала жорстка гіпоксії–реоксигенації призводила до поступового виснаження адаптаційних можливостей організму, про що свідчить різке зниження концентрації кортикосте-

рону в крові щурів, зростання перекисних та окисних процесів, дисбаланс у про- та антиоксидантних реакціях, зниження енергетичних можливостей клітин печінки.

ВИСНОВКИ

1. Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації характеризується фазовими змінами концентрації кортикостерону у крові щурів, що відповідає змінам у енергетичному обміні, а також у про- та антиоксидантному балансі у мітохондріях печінки щурів.

2. Короткотермінова гіпоксія–реоксигенація з використанням 5% O_2 у газовій суміші (1 доба) призводила до значної активації прооксидантних процесів та енергетичного обміну за рахунок сукцинатоксидазного шляху у мітохондріях печінки щурів, інтенсивність яких знижувалася на 3-тю добу. Довготривала гіпоксія–реоксигенація (7 – 14-та доба) викликала подальше зростання вмісту вторинних продуктів ПОЛ і зниження енергозабезпечення, що свідчить про підвищення в мітохондріях печінки щурів рівня окисативних процесів.

3. Зростання активності НАДФ–ІЦДГ, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, а також експресії білка глутатіонпероксидази за умов довготривалої дії гіпоксії–реоксигенації зумовлює активне залучення глутатіонових, а також НАДФН-генеруючих ферментів у процеси захисту від окисного стресу.

4. Зниження експресії білка Mn-SOD на фоні підвищеного вмісту ТБК-АП та H_2O_2 підтверджує наявність неповної збалансованості про- та антиоксидантних процесів у мітохондріях печінки щурів впродовж короткочасних і тривалих сеансів гіпоксії–реоксигенації.

**О.А.Гончар, В.И.Носар, Л.В.Братусь,
И.Н. Тимченко, Н.Н. Стешенко, И.Н.Маньковская**
**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ И АНТИОКСИДАНТ-
НЫЙ СТАТУС МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ
КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ
РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ**

Исследовали динамику функциональной активности и экс-

прессии белка антирадикальных Мп-супероксиддисмутаза (Мп-СОД), глутатион-зависимых (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза), НАДФН-генерирующих (НАДФ-изоцитратдегидрогеназа) ферментов, а также энергетического метаболизма (митохондриальное дыхание по Чансу) митохондрий печени крыс, которых подвергали жесткой гипоксии (5% O₂) в сеансах гипоксии-реоксигенации различной продолжительности (1, 3, 7, 14 сут). Пролонгированная гипоксия-реоксигенация характеризовалась фазовыми изменениями концентрации кортикостерона в крови крыс, что соответствовало изменениям в энергетическом обмене, а также в про-и антиоксидантном балансе в митохондриях печени крыс. Было показано, что кратковременная гипоксия-реоксигенация (1-е сутки) приводила к росту концентрации кортикостерона, а также к значительной активации прооксидантных процессов и энергетического обмена за счет сукцинатоксидазного пути окисления в митохондриях печени крыс, интенсивность которых снижалась на 3-и сутки. Продолжительная гипоксия-реоксигенация (7-14-е сутки) приводила к постепенному истощению адаптационных возможностей организма, о чем свидетельствует резкое снижение концентрации кортикостерона в крови крыс, увеличение содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов, дисбаланс в про-и антиоксидантных реакциях, снижение энергетических возможностей клеток печени. В течение 1-7-х суток эксперимента экспрессия белка глутатионпероксидазы положительно коррелировала с содержанием H₂O₂ и негативно с количеством белка Мп-СОД, и только на 14-е сутки ежедневных сеансов гипоксии-реоксигенации функциональная активность и экспрессия белка Мп-СОД приближались к контрольным значениям. Рост активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и НАДФН-изоцитратдегидрогеназы при продолжительной гипоксии-реоксигенации свидетельствует об активном включении глутатионовых, а также НАДФ-генерирующих ферментов в процессы антиоксидантной защиты. Ключевые слова: гипоксия-реоксигенация; митохондрии; антиоксидантные ферменты; экспрессия белка.

**O.A.Gonchar¹, V.I.Nosar¹, L.V.Bratus¹,
I.N.Tymchenko², N.N.Steshenko¹, I.N.Mankovska¹**

ENERGETIC AND ANTIOXIDANT STATUS OF RAT LIVER MITOCHONDRIA DURING HYPOXIA-REOXYGENATION OF DIFFERENT DURATION

Dynamics of changes in activity and protein expression of antiradical (MnSOD), glutathione-dependent (glutathione peroxidase, glutathione reductase) and NADP+-generated (isocitrate dehydrogenase) enzymes as well as in the energy metabolism indices in rat liver mitochondria under hypoxia-reoxygenation of different duration (1, 3, 7 14 days) were studied. Prolonged hypoxia-reoxygenation was characterized by phase changes of the corticosterone concentration in

rat blood, which corresponded to the changes in energy metabolism as well as in pro- and antioxidant balance in rat liver mitochondria. It has been shown that short-term (1 day) hypoxia-reoxygenation (5% O₂ in the gas mixture) led to an increase in the blood corticosterone concentration and a significant activation of oxidative processes and energy metabolism in rat liver mitochondria, the intensity of which was reduced to 3rd day. Long-term hypoxia-reoxygenation (7-14 th days) led to the gradual depletion of the organism adaptive capabilities, as evidenced by a significant decline in the blood corticosterone concentration, an increase in the content of secondary products of lipid peroxidation, an imbalance in pro- and antioxidant reactions and reduction of energy capacity in liver cells mitochondria. It has been shown that the glutathione peroxidase protein expression and enzymatic activity increased constantly during the whole experimental period and correlated positively with the level of H₂O₂. The amount of Mn-SOD protein as well as it's enzymatic activity was lower in the first seven days of experiment, and it was increased in consequent days up to the control level on 14th day. Increased activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase during prolonged hypoxia-reoxygenation indicates that glutathione- and NADPH-generating enzymes, were actively involved in the antioxidant protect.

Key words: hypoxia-reoxygenation; mitochondria; antioxidative enzymes; protein expression.

¹*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;*

²*Kyiv Medical University of UAFM.*

REFERENCES

1. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol.* 2002 ;282 (Cell Physiol.): C227-C241.
2. Baraboy VA., Reznikov OG. Physiology, biochemistry and psychology of stress. Kyiv: Interservis; 2013. [Ukrainian].
3. Meerson FZ, Pshennikova MG. Adaptation to the stress situations and to physical loads. Moscow: Medicina; 1988. [Russian].
4. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem & Cell Biol.* 2005; 37: 2478-2503.
5. Sazontova TG, Anchidhkina NA, Zhukova AG, Bedareva IV, Pylaeva EA, et al. Active oxygen forms and their redox-signaling role in adaptation to oxygen contents changing. *Fisiol J.* 2008; 2: 18-32. [Russian].
6. Menshikova EV, Zenkov NK. Antioxidants and Inhibitors of radical oxidative processes. *Usp Sovr Biol.* 1993;113(4): 442-53. [Russian].
7. Limon-Pacheco J, Gonssebatt M. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 674:137-47.

8. Hayes J, McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Res.* 1999; 31: 273-300.
9. Jo S, Son M, Koh H, Lee S, Song I, et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2001;276: 16168-176.
10. Clanton TL, Klawitter PF. Adaptive responses of skeletal muscle to intermittent hypoxia: the known and the unknown. *J Appl Physiol.* 2007; 90: 2476-87.
11. Gonchar O, Mankovskaya I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. *Acta Biol Hung.* 2009; 60: 185-94.
12. Lukyanova LD. Novel approach to the understanding of molecular mechanisms of adaptation to hypoxia. In: *Adaptation Biology and Medicine*, eds Hargens A, Takeda N, Singal PCurrent Concepts, New Delhi: Narosa 2005; 4:1-19.
13. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem.* 1955;217(1):383-93.
14. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP:O ration. *Methods Enzymol.* 1967;10:41-7.
15. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; LII :302-308.
16. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem* 1984; 141: 69-74.
17. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170-75.
18. *Methods of Biochemical investigations.* (Eds MI Prochorova). L: Izdatelstvo Leningrad universitet; 1982. [Russian].
19. Rotruck J, Pope A, Ganther H, Swanson A. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179: 588-90.
20. Balashov Iu G. A fluorimetric micromethod for determining corticosteroids: a comparison with other methods. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova.* 1990;76(2):280-83. [Russian].
21. Zoccal DB, Bonagamba L, Antunes-Rodrigues J, Machado B H. Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Autonomic Neurosci: Basic and Clin.* 2007;134(1-2): 115-17.
22. Wu Y, Du JZ. Effect of hypoxia on activity of hypothalamo-pituitary-adrenal-cortex axis in rat. *Zhongguo Ying Yong Sheng Xue Za Zhi.* 2001;17(4): 317-9.
23. Zhi C, Ji-Zen D. Hypoxia effects on hypothalamic corticotropin-releasing hormone and anterior pituitary cAMP. *Acta Pharm Sin.* 1996;17(6): 489-92.
24. Lukyanova LD. The modern problems of hypoxia. *Vestnik RAMN* 2000;9:3-12. [Russian].
25. Maiti P, Shashi B S, Alpesh K S, Muthuraju S, Pratul K B, et al. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.* 2006; 49: 709-16.
26. Pardo M, Tirosh O. Protective signaling effect of manganese superoxide dismutase in hypoxia-reoxygenation of hepatocytes. *Free Rad Res.* 2009; 43: 1225-39.
27. Haddad J. Oxygen sensing mechanism and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res.* 2002; 3: 1-27.
28. Kinnula V, Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulation thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Let.* 2004; 569: 1-6.
29. Sen C, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996; 10: 709-20.
30. Gonchar O, Mankovska I. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. *J Biol Sci.* 2010; 10(6): 545-54.

*Матеріал надійшов до
редакції 23.03.2015*

НАДФН-діафоразна активність у вентральному розі спинного мозку котів при гострому м'язовому запаленні

¹О.П. Маньківська, ¹А.В. Мазниченко, ¹Н.О. Пількевич, ¹В.О. Майський,
²О.В. Власенко, ²О.В. Довгань

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; ²Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; e-mail: elma4@ukr.net

Метою нашого дослідження було виявлення змін НАДФН-діафоразної (НАДФН-д) активності в поперековому відділі (L6/L7) спинного мозку у котів з унілатеральним гострим запаленням тт. gastrocnemius-soleus, викликаним внутрішньом'язовими ін'єкціями карагінану. Ефект однобічного запалення цього м'яза проявлявся в зростанні кількості НАДФН-д-реактивних нейронів як з іпси-, так і з контралатерального боків спинного мозку у проміжній (VII шар; $17,62 \pm 2,7$ та $20,67 \pm 3,3$) та медіальній (VIII шар; $7,3 \pm 1,9$ та $6,0 \pm 2,1$ відповідно) зонах вентральних рогів. Реєстрували також зниження кількості активованих клітин на іпсилатеральному боці в межах «ділянки навколо центрального каналу» (X шар). Виявлено посилення НАДФН-д реактивності в вентральних рогах з обох боків спинного мозку котів при унілатеральному м'язовому запаленні, а також наведення такої реактивності (контралатерально) в великих мультиполярних нейронах, локалізованих у дорсальній частині проміжної сірої речовини. Передбачається, що при гострому м'язовому запаленні пластичні зміни в різних пластинах дорсальних і вентральних рогів активують процеси розгальмування внаслідок збільшення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у глибоких шарах сірої речовини вентральних рогів спинного мозку.

Ключові слова: спинний мозок; НАДФН-д-реактивні нейрони; м'язове запалення; карагінан; коти.

ВСТУП

Запалення м'язів – міозит, часто виникає при їх травматичному пошкодженні і завжди супроводжується болем. Водночас м'язовий біль призводить до значної модуляції моторних реакцій [1-3]. У наших попередніх працях було показано, що при унілатеральному запаленні триголового м'яза литки у котів, викликаного внутрішньом'язовою інфільтрацією запального агента карагінану, виникають помітні зміни рівнів Fos-імунореактивності у поперекових сегментах спинного мозку, а електрична стимуляція нервів м'язів литки призводить до зростання амплітуди моносинаптичних рефлекторних розрядів і збудження флексорів та екстензорів [2].

© О.П. Маньківська, А.В. Мазниченко, Н.О. Пількевич, В.О. Майський, О.В. Власенко, О.В. Довгань

НАДФН-діафоразна активність у спинному мозку щурів і котів певною мірою відображає активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) [4, 5]. При гострому м'язовому запаленні у котів нами зареєстровано помітне зниження такої реактивності у поверхневих шарах дорсального рогу на іпсилатеральному боці сегментів L6/L7 спинного мозку [3]. Великий інтерес представляє той факт, що популяція спінальних НАДФН-д-реактивних нейронів у щурів здатна забезпечувати подвійну реакцію – збільшення або зменшення їх числа у сірій речовині спинного мозку за таких умов [2, 3, 6–9]. Проте даних щодо впливу гострого унілатерального запалення м'язів на рівень НАДФН-діафоразної активності у

зонах типової локалізації клітин Реншоу (VII та VIII шари вентрального рогу) у спинному мозку котів [11, 12] недостатньо.

Мета нашої роботи – оцінити рівень НАДФН-діафоразної активності інтернейронів у зонах типової локалізації клітин Реншоу у різних шарах вентрального рогу поперекових сегментів L6/L7 спинного мозку котів за умови розвитку унілатерального гострого міозиту *mm. gastrocnemius-soleus*.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 7 дорослих котах масою 2,5–4,5 кг, які були поділені на 2 групи: до I контрольної групи ввійшли інтактні тварини (n=3); до II дослідної групи – тварини, яким внутрішньом'язово вводили карагінан у *mm. gastrocnemius-soleus* (n=4). Тварин дослідної групи легко наркотизували ефірно-галотановою газовою сумішшю. Гостре м'язове запалення у них викликали інфільтрацією у *mm. gastrocnemius-soleus* 2 %-го розчину карагінану («Sigma», США). Запальний/больовий подразник вводили через тонку металеву голку у три головки цього м'яза лівої задньої кінцівки (три ін'єкції по 0,5 мл). Всі експериментальні процедури проводилися згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС), а також у повній відповідності до Закону України від 21.02.2006, № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Котів обох груп під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, «Sigma», США, внутрішньоочеревинно) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером, який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину; потім продовжували перфузію 4 %-им параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л фосфатного буферу (ФБ; рН 7,4). Поперекове потовщення спинного мозку (сегменти L6 і L7) кожної тварини швидко виділяли та додатково фіксували протягом

12 год, надалі для кріопротекції витримували 48 год при 4 °С в 30 %-му розчині сахарози у ФБ. На заморожуючому мікротомі були зроблені зрізи вказаних сегментів спинного мозку товщиною 40 мкм. Для гістохімічного забарвлення НАДФН-д-реактивних нейронів зрізи витримували 3 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4), який містив 0,3 % детергенту (Triton X-100, «Sigma», США), 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію («Sigma», США) та 0,5 мг/мл редукованого β-НАДФН («Sigma», США) [5]. Для інтенсифікації гістохімічного забарвлення NO-генеруючих нейронів, відростків і аксонних терміналей, у барвний розчин було додано динатрієву сіль яблучної кислоти (1,2 мг/мл, «Sigma», США) [13]. Підрахунок мічених нейронів у вентральному розі в окремих фронтальних зрізах поперекового потовщення спинного мозку проводили під світловим мікроскопом при збільшеннях у 100 та 250 разів, а їх локалізацію визначали за атласом спинного мозку кота [14]. НАДФН-д-реактивні нейрони ідентифікували у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми.

Середню кількість НАДФН-д-реактивних інтернейронів ± стандартна похибка середнього (на зріз) в окремих шарах сірої речовини спинного мозку (VII, VIII та X) підраховували у 10–15 зрізах сегментів L6/L7 кожної тварини обох груп як з іпси-, так і з контралатерального боків спинного мозку. Порівнювали середні кількості забарвлених клітин у різних шарах вентрального рогу тварин за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA). Якщо міжгрупові відмінності були знайдені (P<0,05), застосовували апостеріорний критерій Ньюмена-Кейлса.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи у шарах VII та VIII сірої речовини вентрального рогу реєстрували тільки невелику кількість НАДФН-д-реактивних нейронів (2–7 акти-

вованих нейронів на зріз), а у шарі X близько 10 таких клітин. У котів дослідної групи через 4 год після внутрішньом'язових ін'єкцій карагінану і розвитку гострого унілатерального м'язового запалення було зареєстровано вірогідне збільшення (відносно контролю) кількості активованих нейронів у VII та VIII шарах вентрального рогу з обох боків мозку. Максимальне значення цього показника було у проміжній сірій речовині (VII шарі) як на іпси-, так і на контралатеральному боках спинного мозку ($17,62 \pm 2,7$ та $20,67 \pm 3,3$ відповідно). У меншій кількості НАДФН-др-нейрони були виявлені з обох боків мозку у шарі VIII ($7,3 \pm 1,9$ та $6,0 \pm 2,1$) та «ділянці навколо центрального каналу» (шар X; $5,3 \pm 2,1$ та $12,6 \pm 4,1$ відповідно). М'язове запалення також призводило до незначного іпсилатерального (відносно боку запалення м'яза) зниження рівня НАДФН-д-реактивності нейронів, локалізованих у сірій речовині вентрального рогу сегментів L6/L7 (рис. 1). Відмітимо збільшення частки інтенсивно забарвлених (з високим рівнем

НАДФН-д реактивності) нейронів (більше ніж 70 %) на контралатеральному боці мозку відносно частки слабо забарвлених нейронів (менше ніж 30 %) в усіх досліджуваних шарах спинного мозку тварин з внутрішньом'язовими ін'єкціями карагінану (див. рис. 1). У тварин контрольної групи медіальні та латеральні моторні ядра (шар IX) не містили в собі НАДФН-д-реактивних нейронів (інтернейронів або мотонейронів). Однак у котів дослідної групи на контралатеральному боці спинного мозку реєструвалися поодинокі мічені фузіформні і мультиполярні інтернейрони малих розмірів (діаметром менше 15 мкм), які розташовувалися у нижній частині медіальних моторних ядер.

Просторовий розподіл мічених нейронів є дуже нерівномірним як у дорсовентральному, так і медіолатеральному напрямках (рис. 2). Максимальне їх скупчення спостерігалось у дорсальній частині шару X на контралатеральному боці спинного мозку. Відмітимо, що не всі виявлені нейрони мали однаковий ступінь забарвлення. У вентральній ділянці

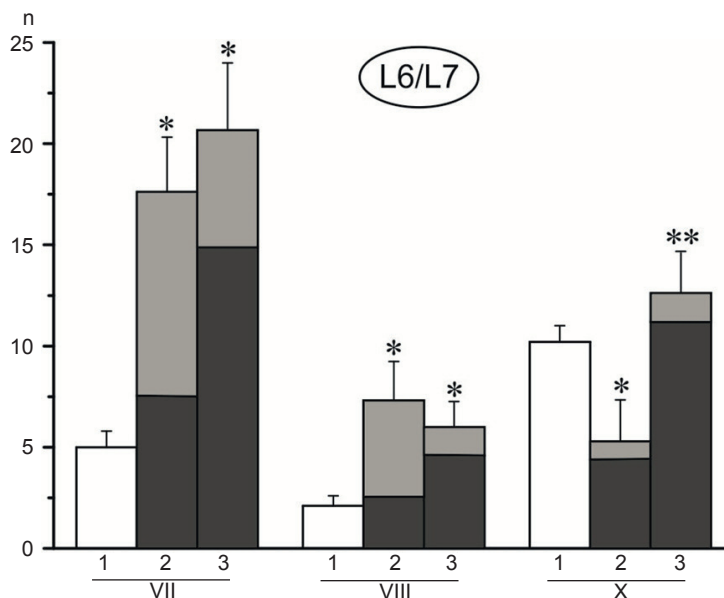


Рис. 1. Середня кількість НАДФН-д-реактивних нейронів у VII, VIII та X шарах вентрального рогу сегментів L6/L7 контрольних тварин (1) та котів з м'язовими ін'єкціями карагінану з іпси- (2) та контралатерального (3) боків спинного мозку. * $P \leq 0,05$ – вірогідність кількості мічених нейронів у котів дослідної групи відносно контролю; ** $P \leq 0,05$ – вірогідність у котів дослідної групи між іпси- та контралатеральними боками спинного мозку. Темно-сірі і світло-сірі частки стовпчиків – нейрони з високим і низьким рівнем НАДФН-д реактивності, відповідно

шару VII на контралатеральному боці мозку реєструвалося велике скупчення слабо-зabarвлених мультиполярних і фузіформних клітин малих розмірів. За морфологічними

ознаками (форма та розмір) і за місцем розташування можна припустити, що такі нейрони є гальмівними клітинами Реншоу (див. рис. 2, г). Цікавою знахідкою було ви-

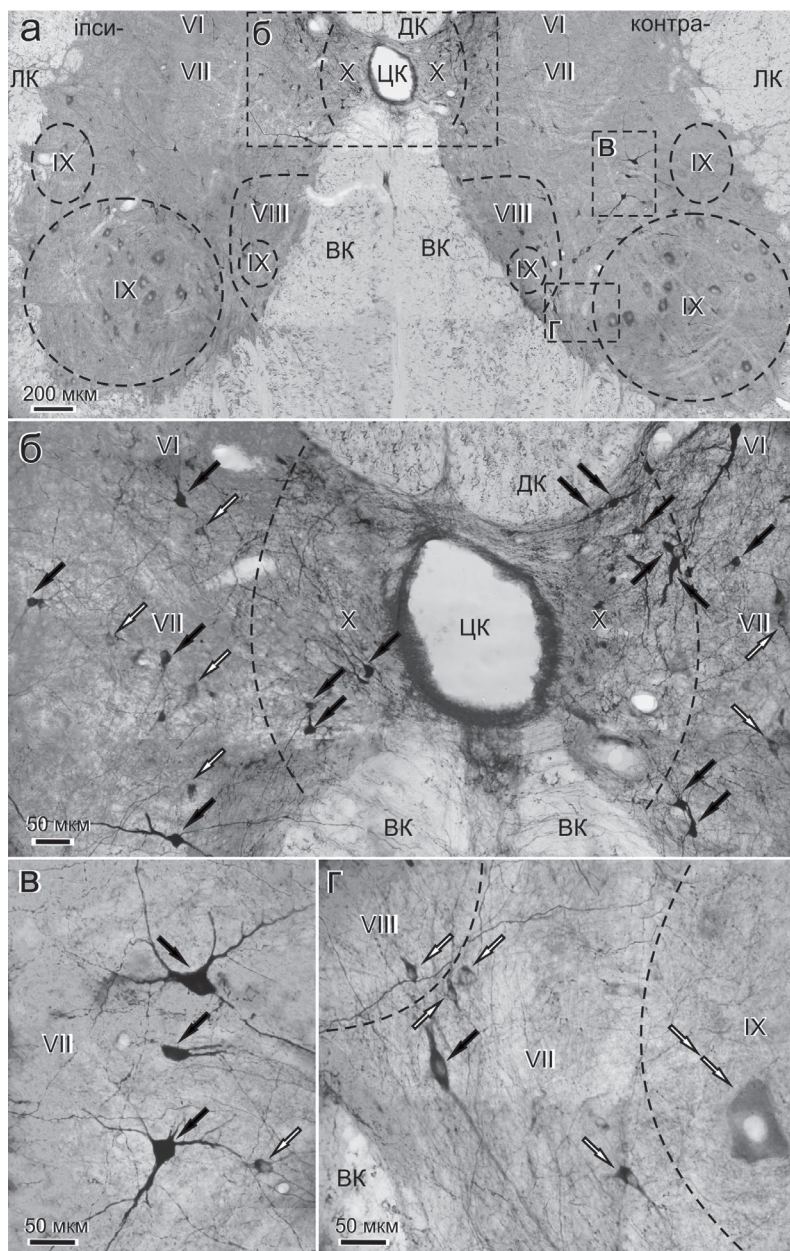


Рис. 2. Мікрофотографії НАДФН-д-реактивних нейронів у фронтальному зрізі вентральних рогів поперекового сегменту L7 спинного мозку кота з м'язовою ін'єкцією карагінану. Зони локалізації позитивних нейронів зі слабкою діафоразною реактивністю (білі стрілки) та високою діафоразною реактивністю (чорні стрілки) у шарах VII – X вентрального рогу позначені на (а) пунктирними лініями і представлені при великому збільшенні. На (б) – позитивні нейрони в дорсальній частині X шару; на (в) – позитивні нейрони в VII шарі; на (г) – типові фузіформні «Реншоу-подібні» клітини (білі стрілки) зі слабкою діафоразною активністю та мотонейрон великого розміру (подвійна біла стрілка). VI – X – шари сірої речовини спинного мозку; ВК, ДК, ЛК – вентральний, дорсальний та латеральний канатики спинного мозку; ЦК – центральний канал

явлення мультиполярних нейронів великих розмірів (25–50 мкм у діаметрі) у дорсальній частині шару VII з обох боків спинного мозку досліджуваних сегментів (див. рис. 2, а, в). Була знайдена різниця в білатеральному розподілі таких великих мультиполярних нейронів з вірогідним перевищенням їх кількості на контралатеральному боці мозку (рис. 3, а, б). У цих клітин вторинні розгалуження дендритів по всьому їх подовженні мали намистоподібні потовщення, що може бути структурною основою для передачі сигналу NO на інші інтернейрони дорсальної частини сірої речовини, які локалізовані у зоні розгалуження дендритів таких клітин. Слід зазначити і контралатеральне домінування в локалізації інтенсивно забарвлених «Реншоуподібних» клітин та інших інтернейронів у проміжній сірій речовині та медіальній

зоні шару VIII спинного мозку тварин з унілатеральним м'язовим запаленням (див. рис. 3, в).

У попередніх дослідженнях [2, 3] із виявлення у спинному мозку котів нейронів із Fos-імунореактивністю було знайдено, що за умов розвитку міозиту у центральній зоні сірої речовини вентрального рогу сегментів L6/L7 забарвлені на Fos ядра великих нейронів були перемішані із веретено- та паличкоподібними ядрами клітин малого розміру (понад 5 мкм). Такі клітини є глієподібними, очевидно, мікроглія та астроцити. Розповсюдження активності цих клітин у шарах вентрального рогу (VII, VIII та X), а також, частково, і в моторні ядра (шар IX) при розвитку болю та різкої активації нейронів у верхніх шарах дорсального рогу, може розглядатися як один з елементів повторної нейронної

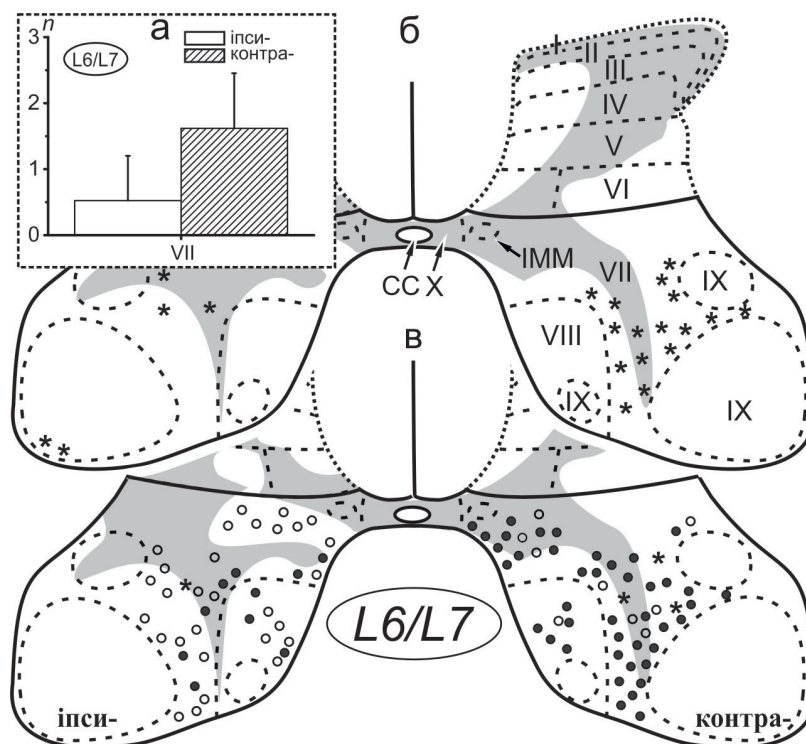


Рис. 3. Середня кількість великих мультиполярних НАДФН-д-реактивних нейронів у спинному мозку котів під час розвитку гострого м'язового запалення в одиночному зрізі (а) та схема ламінарного розподілу таких нейронів (б; зірочки; загальна кількість клітин у 10 зрізах мозку); схема поширового розподілу інтенсивно забарвлених (чорні кружечки), слабо забарвлених (білі кружечки) інтернейронів і великих мультиполярних нейронів (зірочки) у VII та VIII шарах вентрального рогу (в; загальна кількість клітин у 2 зрізах мозку)

активації у спинному мозку під час розвитку гострого або хронічного міозиту [3, 15 – 17]. Треба також зазначити, що глія *per se* і глія – нейронна сигналізація беруть участь у підвищенні ноцицептивної передачі у спинному мозку [18]. У нашому дослідженні виявлено контралатеральне збільшення НАДФН-д реактивності у проміжній сірі речовині вентрального рогу сегментів L6/L7. У цій зоні зареєстровані інтернейрони та великі мультиполярні нейрони, що свідчить про пластичні зміни у сірій речовині вентрального рогу котів при розвитку гострого м'язового запалення [9].

Таким чином, отримані нами результати гістохімічних досліджень прямо свідчать про те, що гостре запалення *mm. gastrocnemius-soleus* у котів призводить до значного підвищення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у шарах VII і VIII вентрального рогу L6/L7-сегментів спинного мозку. Раніше було встановлено, що НАДФН-д-реактивні нейрони в усіх шарах вентрального рогу і зоні навколо центрального каналу є або ГАМК-, або гліцинергічними – тобто гальмівними [19]. Отже, виявлене нами збільшення кількості таких гальмівних нейронів у шарах вентрального рогу може відображати пластичні зміни у спинному мозку при гострому м'язовому запаленні. Представлені результати показують вірогідне збільшення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у VII і VIII шарах вентрального рогу та індукцію такої реактивності на контралатеральні великі (більше ніж 25 мкм у діаметрі) мультиполярні нейрони дорсальної частини проміжної зони сірої речовини за умов запалення м'язу кінцівки у котів. Можна припустити, що при гострому міозиті пластичні зміни у різних шарах дорсального і вентрального рогів активують процеси розгальмування внаслідок збільшення кількості гальмівних NO-генеруючих (НАДФН-д-реактивних) нейронів у глибоких шарах сірої речовини вентральних рогів спинного мозку котів.

Автори роботи висловлюють щире подяку ст. наук. співр. Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України Пілявському О.І. за допомогу у проведенні експериментальної частини дослідження.

**Е.П. Маньковская, А.В. Мазниченко,
Н.А. Пилькевич, В.А. Майский, О.В. Власенко,
А.В. Довгань**

НАДФН-ДИАФОРАЗНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ В ВЕНТРАЛЬНОМ РОГЕ СПИННОГО МОЗГА КОТОВ ПРИ ОСТРОМ МЫШЕЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ

Целью нашего исследования было изучение изменений НАДФН-диафоразной реактивности в поясничном отделе (L6/L7) спинного мозга у котов с односторонним острым воспалением *mm. gastrocnemius-soleus*, вызванного внутримышечным введением каррагинана. Эффект одностороннего мышечного воспаления выражался в достоверном росте количества НАДФН-д-реактивных нейронов как на ипси-, так и на контралатеральной сторонах спинного мозга кошек в промежуточной (VII слой; $17,62 \pm 2,7$ и $20,67 \pm 3,3$) и медиальной (VIII слой; $7,3 \pm 1,9$ и $6,0 \pm 2,1$ соответственно) зонах вентральных рогов. Регистрировали также заметное снижение количества реактивных клеток на ипсилатеральной стороне в пределах “области вокруг центрального канала” (X пластина). Выявлено повышение НАДФН-д-реактивности в вентральных рогах с обеих сторон спинного мозга кошек при одностороннем остром мышечном воспалении и также индукция такой реактивности (контралатерально) на крупные мультиполярные нейроны, локализованные в дорсальной части промежуточного серого вещества. Предполагается, что при остром миозите пластические изменения в различных пластинах дорсальных и вентральных рогов активируют процессы растормаживания за счет увеличения количества NOS-содержащих/НАДФН-д-реактивных нейронов в глубоких слоях серого вещества вентральных рогов спинного мозга.

Ключевые слова: спинной мозг; НАДФН-д-реактивные нейроны; мышечное воспаление; каррагинан; коты.

**Ye.P. Man'kovskaya¹, A.V. Maznychenko¹,
N.O. Pil'kevych¹, V.O. Maisky¹, O.V. Vlasenko²,
O.V. Dovgan²**

NADPH-DIAPHORASE REACTIVITY IN THE VENTRAL HORN OF THE FELINE SPINAL CORD DURING ACUTE MUSCLE INFLAMMATION

The aim of this research was to reveal the changes in the NADPH-d reactivity in the lumbar spinal cord (L6/L7) of

cats with unilateral acute myositis of the *mm. gastrocnemius-soleus* after intramuscular injections of carrageenan. The effect of unilateral muscle inflammation was expressed in a significant increase in the number of NADPH-d-reactive neurons in ipsilateral and contralateral intermediate (lamina VII; $17,62 \pm 2,7$ and $20,67 \pm 3,3$) and medial (lamina VIII; $7,3 \pm 1,9$ and $6,0 \pm 2,1$ respectively) zones of the ventral horns. However, a clear decline of the reactive cells was recorded on the ipsilateral side within the area around the central canal (lamina X). An increase in the NADPH-d reactivity within the ventral horns on both sides on the spinal cord and the induction of such reactivity (contralaterally) in large multipolar neurons localized in the dorsal part of the intermediate zone were revealed in cats with unilateral acute muscle inflammation. It is hypothesized, that during acute myositis, plastic changes in different layers of the dorsaland ventral horns activate the processes of disinhibition due to an increase in the number of NOS-containing/NADPH-d-reactive neurons in the spinal gray matter.

Key words: spinal cord; NADPH-d-reactive neurons; muscle inflammation; carrageenan; cats.

¹O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; ²Pirogov National Medical University, MPH of Ukraine, Vinnitsa

REFERENCES

1. Khalsa PS. Biomechanics of musculoskeletal pain: dynamics of the neuromatrix. *J Electromyogr Kinesiol.* 2004;14(1):109-20.
2. Schomburg ED, Steffens H, Maznychenko AV, Pilyavskii AI, Hellstrom F, Kostyukov AI, Maisky VA. Acute muscle inflammation enhances the monosynaptic reflex and *c-fos* expression in the feline spinal cord. *Eur J Pain.* 2007;11:579-86.
3. Steffens H, Schomburg ED, Maznychenko AV, Maisky VA, Kostyukov AI, Pilyavskii AI. Monosynaptic reflexes, *c-fos* expression, and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord: changes induced by chronic muscle inflammation. *Нейрофізіологія/Neurophysiology.* 2007;39 (3):222-31.
4. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 1992;46(4):755-84.
5. Pun NJ, Pun SL, Wu SY, Forstermann U, Schmidt HW, Tsend LF. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat, and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience.* 1993;54:845-57.
6. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *TRENDS in Pharmacol Sci.* 2003;24(2):91-5.
7. Callsen-Cencic P, Hoheisel U, Kaske A, Mense S, Tenschert S. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or down regulated? *Cell Tissue Res.* 1999;295(2):183-94.
8. Pilyavskii AI, Maznychenko AV, Maisky VA, Kostyukov AI, Windhorst U. Capsaicin-induced effects on *c-fos* expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 2005;521:70-8.
9. Hoheisel U, Kaske A, Reinert A, Mense S. Frequency-dependent expression of diaphorase staining and nNOS-immunoreactivity in rat dorsal horn neurons following C-fiber stimulation. *Neurosci Lett.* 1997;227(3):181-4.
10. Radhacrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104:567-77.
11. Carr PA, Alvarez FJ, Leman EA, Fyffe REW. Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *Neuroreport.* 1998;9:2657-61.
12. Jankowska E, Lindström S. Morphological identification of Renshaw cells. *Acta Physiol Scand.* 1971;81:428-30.
13. Maisky VA, Oleshko NN, Bazilyuk OV, Talanov SA, Sagach VF, Appenzeller O. Fos and nitric oxide synthase in rat brain with chronic mesostriatal dopamine deficiency: effects of nitroglycerin and hypoxia. *Parkinson Relat Dis.* 2002;8:261-70.
14. Brown AG. Organization of spinal cord. The anatomy and physiology of identified neurons. New York: Springer. 1981.
15. Harris JA. Using *c-fos* as a neural marker of pain. *Brain Res Bull.* 1998;45(1):1-8.
16. Wu J, Lin Q, McAdoo DJ, Willis WD. Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Neuroreport.* 1998;9:589-92.
17. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain.* 2001;93:201-5.
18. Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain.* 2007;11:223-30.
19. Spike RC, Todd AJ, Johnston HM. Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1993;335:320-3.

Матеріал надійшов
до редакції 14.05.2015

Кровотік в органах травлення щурів з гострим панкреатитом за умов застосування корвітину

Т.В. Вовкун¹, П.І. Янчук¹, Л.Я. Штанова¹, А.С. Шаламай²

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; ² ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Київ; e-mail: shtanova@ukr.net

Досліджено дію кверцетину (у вигляді модифікованої форми – корвітину) на об'ємну швидкість кровотоку (ОШК) у тканині підшлункової залози, печінки та слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів з гострим панкреатитом (ГП), викликаним введенням L-аргініну. ОШК визначали методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією за допомогою полярографа LP-9 (Чехія). Впродовж перших 10 діб з моменту моделювання ГП у зазначених органах спостерігалось поступове зменшення порівняно з інтактними тваринами ОШК на 42% ($P < 0,01$) в підшлунковій залозі, на 61% ($P < 0,001$) у печінці, на 64% ($P < 0,001$) у СОШ, тобто, найбільш істотні зміни відбувалися в слизовій шлунка, найменші – в тканині підшлункової залози. На відміну від контрольної групи тварин, у яких моделювали ГП і протягом 20 діб вводили лише фізіологічний розчин, застосування корвітину (5 мг/кг, раз на добу, з 11-ї до 20-ї доби експерименту) у тварин з ГП тією чи іншою мірою сприяло відновленню ОШК в усіх досліджуваних органах: в підшлунковій залозі – повною мірою, в печінці та в шлунку – частково. Виходячи з одержаних результатів, корвітин можна рекомендувати як засіб часткової чи цілковитої корекції порушень кровотоку, які виникають в підшлунковій залозі та інших органах травної системи при ГП, що може покращувати функціональний стан цих органів на ранніх стадіях хвороби та прискорювати повне відновлення їх функцій.

Ключові слова: L-аргінін; гострий панкреатит; підшлункова залоза; печінка; слизова оболонка шлунка; корвітин; об'ємна швидкість кровотоку.

ВСТУП

Гострий панкреатит (ГП) або запалення підшлункової залози – важке захворювання з високим рівнем летальності, патогенез якого й досі досконало не вивчений, тому методів і засобів лікування наразі бракує. Однією з причин, яка не дає змоги більш повно дослідити патофізіологічний механізм ГП, є складність одержання клінічних даних від пацієнтів на найбільш небезпечних ранніх стадіях хвороби – у перші години чи дні. ГП лишається серйозним захворюванням ще й через ускладнення, які його супроводжують, у першу чергу – це мультиорганні та мультисистемні порушення функцій [1]. Патологічні процеси в підшлунковій залозі викликані не лише активованими панкреатичними ферментами та посиленою продукцією медіаторів © Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, А.С. Шаламай

запалення [2], а й ішемією підшлункової залози. Оскільки тканина підшлункової залози не має компенсаторного резерву, вона є дуже чутливою до ішемічного стресу. Порушення кровотоку в залозі провокує інтерстиційні крововиливи, вазоконстрикцію, збільшення проникності судинної стінки і в'язкості крові, зростання взаємодії лейкоцитів із клітинами ендотелію, формування внутрішньосудинних тромбів, і, як результат, набряк тканини, деструкцію панкреатичної паренхіми і дрібних судин [3, 4]. L-аргінінову модель ГП вважають найбільш придатною для дослідження екстрапанкреатичних ушкоджень органів та їх патомеханізмів. При ураженні підшлункової залози патологічним процесом одночасно зі зміною в ній об'ємної швидкості кровотоку (ОШК) вже на ранніх стадіях хвороби зменшується циркуляція крові в

капілярній системі інших органів, зокрема в серці, головному мозку, м'язах, легенях, нирках, шлунку, печінці та кишечнику, що призводить до порушення їх функцій. Якщо такі макродинамічні показники, як серцевий викид чи рівень артеріального тиску відносно легко нормалізуються, то зміни органної мікроциркуляції є більш стійкими, і в розвитку синдрому мультиорганної дисфункції вони стають небезпечним фактором [5–7]. Експериментальні дані свідчать, що застосування кверцетину полегшує перебіг ГП і запобігає виникненню ускладнень цієї небезпечної хвороби [8]. Перш ніж залучити розчинний аналог кверцетину до наших досліджень, ми ознайомилися з його терапевтичними та біохімічними ефектами, що дало змогу спрогнозувати перспективність застосування цього засобу у вирішенні проблеми лікування ГП. Корвітин – сполука нетоксична, без шкідливих побічних ефектів, отже його використання безпечно для хворих. Корвітин зберігає всі властивості кверцетину, тому він має потужні антиоксидантні властивості, які сприяють нормалізації функцій ендотелію судин і відновленню кровотоку в органах [9]. Сам кверцетин регулює в'язкість крові й плазми, вміст фібриногену й агрегації еритроцитів [10], проявляє антикоагуляційні й антизапальні властивості [11], є сильним антиапоптотичним засобом [12]. Він також викликає розширення кровоносних судин із залученням NO, водночас пригнічуючи синтез і вивільнення ендотеліну-1 з ендотеліоцитів [13]. Раніше ми показали, що корвітин суттєво збільшує кровотік у слизовій оболонці шлунка (СОШ) та в печінці інтактних щурів [14, 15]. Вплив цієї сполуки на стан кровотоку в підшлунковій залозі та інших органах системи травлення при ГП раніше ніхто не вивчав. Все викладене вище стало підґрунтям для обрання нами створеного на основі кверцетину препарату корвітин для корекції патологічних змін, що відбуваються при ГП як в підшлунковій залозі, так і в прилеглих органах.

Метою нашої роботи було з'ясувати зміни ОШК у підшлунковій залозі, печінці та шлунку щурів на ранніх стадіях ГП, викликаного дією L-аргініну, та можливість корекції їх корвітином.

МЕТОДИКА

Всі експерименти проводили з дотриманням існуючих Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментах (Страсбург, 1986). Робота виконана в гострих досліджах на щурах-самцях масою 230-280 г, які знаходилися в стандартних умовах віварію і яких напередодні експерименту витримували протягом ночі на голоді, але з вільним доступом до водопровідної води. ГП викликали внутрішньоочеревинною ін'єкцією L-аргініну виробництва “Sigma-Aldrich” (США) [16]. При застосуванні L-аргініну в кількості 500 мг/100 г ми спостерігали загибель 90% тварин, а при дозі 200 мг/100 г, яку ми використали в нашому експерименті, смертність тварин становила 20%, причому гинули вони протягом першої доби після ін'єкції. При дослідженні кожного органа щурів довільно розподіляли на 5 груп, по 7 тварин у кожній: I група – інтактні тварини (ін'єкція фізіологічного розчину); II група – контрольні (L-аргінін, ГП, ін'єкція фізіологічного розчину впродовж 20 діб); III група – L-аргінін, ГП, 1 доба; IV група – L-аргінін, ГП, третя доба; V група – L-аргінін, ГП, десята доба; VI група – L-аргінін, ГП і корвітин, з 10-ї по 20-ту добу. Зареєструвати ОШК у СОШ щурів через добу після моделювання ГП не вдалося через значні крововиливи, тому в шлунку дослідження проводили лише через 3 і 10 діб. Щурів наркотизували уретаном (1 г/кг, внутрішньоочеревинно). Після анестезії проводили лапаротомію для того, щоб одержати доступ до підшлункової залози, печінки чи шлунка. ОШК визначали методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією за допомогою полярографа LP-9 (Чехія),

електричний сигнал від якого подавали на реєстратор Н.071.6М [17]. У світовій науковій практиці стан кровообігу в органах часто вимірюють такими методами, як прижиттєва флуоресцентна мікроскопія та доплерометрія. За допомогою останнього методу вдається реєструвати швидкість кровотоку лише в поверхневому шарі органів (глибиною до 1 мм), де він, як правило, значно менший, ніж у товщі органної тканини, а тому, на нашу думку, результати отримані цим методом неадекватно відображають значення швидкості тканинного кровотоку як в підшлунковій залозі, так і в інших органах. З іншого боку, метод водневого кліренсу з електрохімічною генерацією водню, який застосовуємо ми, дає змогу за допомогою платинових голкових електродів реєструвати ОШК у будь-яких ділянках товщі різних органів і тканин, а не лише в їх поверхневому шарі, і тому є більш об'єктивним. Ми вимірювали зміни ОШК у підшлунковій залозі, печінці й шлунку. Було використано корвітин виробництва Борщівського хіміко-фармацевтичного заводу (м. Київ). Щурам відповідних груп (див. вище) препарат вводили внутрішньоочеревинно у вигляді ін'єкцій в дозі 5 мг/кг, раз на добу. Починали введення через 10 діб з моменту застосування L-аргініну. Всього було зроблено 10 таких ін'єкцій. Після закінчення дослідів евтаназію щурів здійснювали введенням підвищеної дози наркотику.

Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням методів варіаційної статистики, вірогідність відмінностей показників оцінювали за критеріями t Стюдента і Манна-Уїтні. Вірогідними вважали зміни при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержані результати свідчать, що у щурів з панкреатитом ОШК зменшувалася в усіх досліджуваних органах, причому зміни ці впродовж 10 діб спостережень з моменту введення тваринам L-аргініну поступово

посилювалися. Так, якщо у щурів інтактної групи ОШК у підшлунковій залозі становив $37,0 \pm 3,6$ мл/100г•хв, то у щурів з ГП через добу з моменту моделювання патології цей показник зменшувався на 12% (до $32,8 \pm 5,2$ мл/хв•100г), через 3 доби – на 29% (до $26,2 \pm 2,8$ мл/хв•100г; $P < 0,05$), через 10 діб – на 42% (до $21,5 \pm 2,3$ мл/хв•100г; $P < 0,01$). Після 20-ї доби патології ОШК була меншою від такої у інтактних тварин на 32,7% ($24,9 \pm 1,4$ мл/хв•100г; $P < 0,05$; рис. 1). Одночасно зі зниженням ОШК в підшлунковій залозі експериментальних тварин спостерігали виражені ознаки інтерстиційного набряку та масивні крововиливи. На 3 окремих групах тварин з ГП у підшлунковій залозі, печінці та шлунку досліджували дію корвітину на ОШК. Остання в підшлунковій залозі порівняно з інтактною групою повністю відновилася, тоді як спонтанного повернення до норми не відбулося.

З'ясувалося, що ОШК в печінці щурів з L-аргініновою моделлю ГП у динаміці впродовж 10 діб спостережень порівняно з інтактними щурами суттєво зменшувалася, зокрема, через добу з моменту розвитку патології – на 53,3 % (зі $105,1 \pm 6,9$ у нормі до $49,1 \pm 7,6$ мл/хв•100г; $P < 0,001$), через 3 доби – на 53,0 % (до $49,5 \pm 9,5$ мл/хв•100г; $P < 0,001$), а через 10 діб – на 61% (до $41,0 \pm 6,8$ мл/хв•100г; $P < 0,001$). Після 10-добового застосування корвітину ОШК у печінці значно збільшилася і була меншою від такої у щурів інтактної групи на 23,1% ($80,8 \pm 1,6$ мл/хв•100г; $P < 0,001$), тоді як у контрольній групі – на 44,7% ($58,1 \pm 6,4$ мл/хв•100г; $P < 0,001$; рис. 2).

ОШК у СОШ тварин з ГП, як і в інших досліджуваних нами органах, зменшувалася впродовж усього періоду спостереження (10 діб). Так, через 3 доби з моменту моделювання патології вона зменшилася порівняно з інтактними тваринами на 57% (з $61,8 \pm 9,0$ до $26,6 \pm 5,6$ мл/хв•100г; $P < 0,001$), а через 10 діб – на 64% (до $22,3 \pm 1,2$ мл/хв•100г; $P < 0,001$). Слід зазначити, що у тварин з ГП ефект корвітину на ОШК у СОШ був значно меншим, ніж у підшлунковій залозі чи печінці, і після

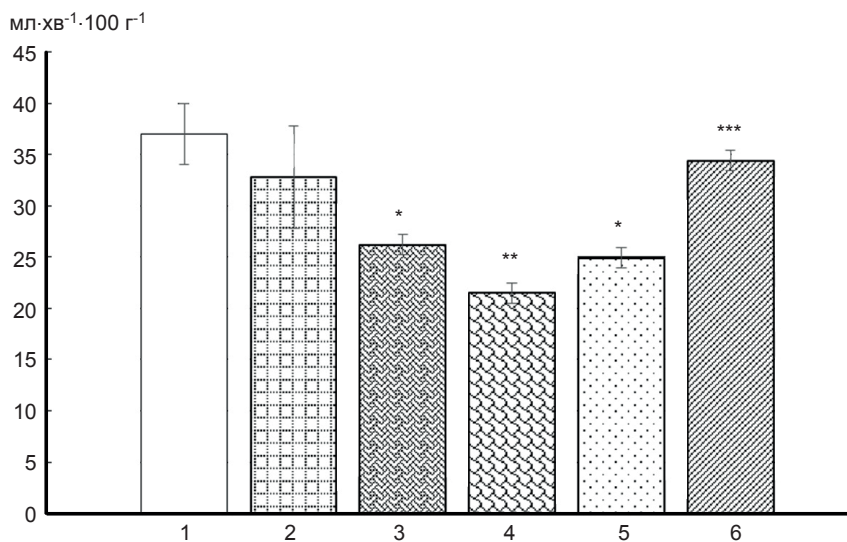


Рис. 1. Значення об'ємної швидкості кровотоку в підшлунковій залозі щурів залежно від часу, що пройшов з моменту першої ін'єкції L-аргініну та внаслідок корекції корвітином: 1 – інтактна група; 2 – через 1 добу; 3 – через 3 доби; 4 – через 10 діб; 5 – через 20 діб, контроль (L-аргінін і фізіологічний розчин); 6 – через 20 діб (L-аргінін і корвітин). * $P<0,05$, ** $P<0,01$ порівняно з інтактними тваринами; ** $P<0,01$ порівняно з групою 1; *** $P<0,001$ порівняно з групою 5

завершення курсу ін'єкцій препарату ОШК відновилася до 59,2% від такої у інтактних щурів ($36,3 \pm 2,6$ мл/хв·100г; $P<0,001$). Проте без корвітину ОШК у СОШ за 20 діб не відновилася і сягала лише 39,8% щодо значень у інтактних тварин ($24,6 \pm 1,9$ мл/хв·100г; $P<0,001$) (рис. 3).

Ми фактично дослідили вплив L-аргініну в дозі 200 мг/100 г на стан тканинного кровотоку в підшлунковій залозі, печінці та шлунку щурів, а також захисний ефект корвітину. Автори, які використовували подібну модель у своїх дослідженнях, зазвичай модифікували цей метод індукції ГП залежно від того,

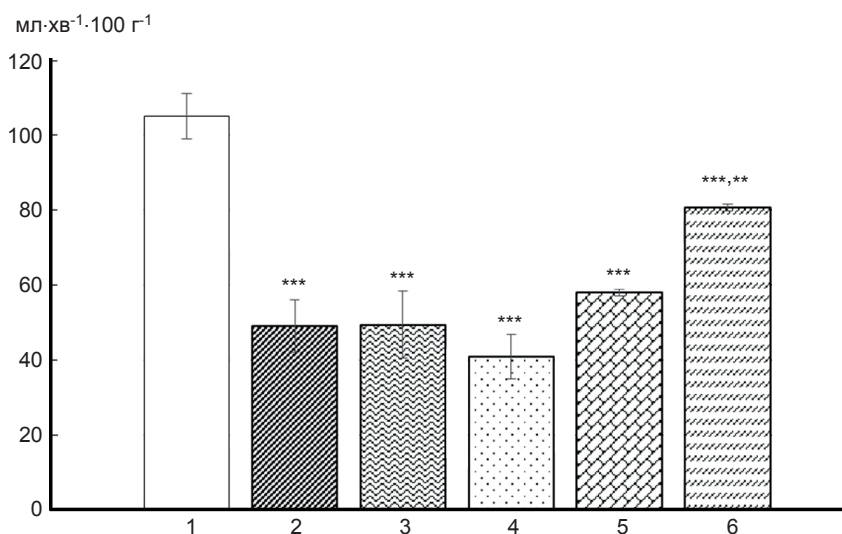


Рис. 2. Зміни об'ємної швидкості кровотоку в печінці щурів залежно від терміну, що пройшов з моменту введення L-аргініну з метою моделювання гострого панкреатиту та внаслідок застосування корвітину: 1 – інтактна група; 2 – через 1 добу; 3 – через 3 доби; 4 – через 10 діб; 5 – через 20 діб, контроль, L-аргінін і фізіологічний розчин; 6 – через 20 діб, L-аргінін і корвітин. *** $P<0,001$ порівняно з інтактними тваринами; ** $P<0,01$ порівняно з групою 5

яку задачу вони перед собою ставили. Тих, хто намагався використати дозу L-аргініну більшу ніж 500 мг/100 г, спіткала невдача, оскільки майже всі тварини гинули протягом перших годин з моменту ін'єкції. Більшість дослідників, які вивчали патофізіологічні механізми панкреатиту, використовували дозу L-аргініну 2•250 мг/100 г з інтервалом в 1 год [4]. З іншого боку, якщо потрібно вивчити швидкість відновлення функцій ПЗ після виникнення ГП, залучають менші дози L-аргініну, зокрема 200 мг/100 г [18, 19]. Вивчення ефектів L-аргініну залежно від часу дає можливість дослідити різні фази розвитку цієї хвороби. Раніше було встановлено, що спонтанне відновлення функцій підшлункової залози після ГП, індукованого ін'єкцією L-аргініну 200 мг/100 г, відбувається впродовж 6 міс [20]. Проте мова тут іде про такі маркери панкреатиту, як амілаза, ліпаза, глюкоза в крові, гістологічні дослідження, тоді як ОШК не вивчалася. Наші результати частково узгоджуються з даними інших авторів, які також спостерігали порушення кровотоку в органах системи травлення як при легкій, так і при некротичній формі панкреатиту [4]. У представленій роботі найбільш істотні зміни

ОШК ми спостерігали в шлунку і найменші – в підшлунковій залозі. Hotz [21] взагалі не виявив змін капілярного кровообігу в залозі при ГП, хоча в інших відділах гастроінтестинального тракту вони були добре виражені. З іншого боку, Dobosz [6] найнижчі значення швидкості кровотоку при панкреатиті спостерігав саме в підшлунковій залозі, а не в печінці чи шлунку. Deng показав [23], що ГП супроводжується рівнозначним зниженням мікроциркуляції як в підшлунковій залозі, так і в шлунку. Загалом печінка виявляється першим органом-мішенню, на який припадає головний удар панкреатогенної токсемії у вигляді активованих панкреатичних і лізосомальних ферментів, біологічно активних речовин, токсичних продуктів розпаду паренхіми підшлункової залози при некробіозі і активації калікреїнкінінової системи [24]. Печінкова недостатність зустрічається у кожного четвертого хворого на панкреонекроз, стаючи причиною смерті в 40% випадків [25]. Агресія ендотоксинів викликає зміни гістоструктури гепатоцитів, інтенсивності синтезу ДНК у гепатоцитах і їх проліферації, вмісту в них глікогену, а також блокаду метаболізму гепатоцитів вже на ранніх стадіях

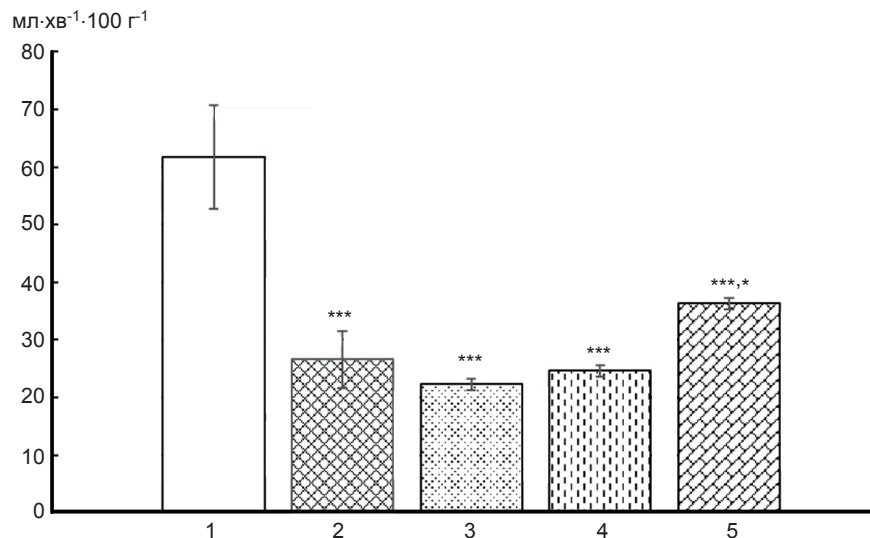


Рис. 3. Об'ємна швидкість кровотоку в слизовій оболонці шлунка щурів залежно від часу, що пройшов з початку розвитку гострого панкреатиту та застосування корвітину: 1 – інтактна група; 2 – через 3 доби; 3 – через 10 діб; 4 – через 20 діб, контроль (L-аргінін і фізіологічний розчин); 5 – через 20 діб, L-аргінін і корвітин. *** $P < 0,001$ порівняно з інтактними тваринами; * $P < 0,05$ порівняно з групою 4

розвитку ГП [26]. Помічено, що такі зміни відбуваються одночасно з порушенням при ГП печінкового кровотоку [27]. Наша робота демонструє, що корвітин впродовж 10 діб повністю нормалізує ОШК у підшлунковій залозі, порушену в процесі розвитку ГП, і значно покращує таку в печінці, менше – в шлунку, проте без корвітину відновлення кровотоку в досліджуваних нами органах відбувалося набагато повільніше. Механізми, за допомогою яких L-аргінін викликає панкреатит, повністю не розкриті. Раніше нами було встановлено, що у відповідь на введення 5 мг/кг корвітину ОШК у печінці та шлунку інтактних щурів збільшувалася на 100 і 89% відповідно [14, 15]. Підсумовуючи існуючі дані літератури, можна зробити висновок про те, що важливу роль у розвитку патології при цій моделі ГП відіграють вільнорадикальні процеси, надмірне утворення NO та медіаторів запалення [19]. До цього ми можемо додати ще й суттєве зменшення ОШК у підшлунковій залозі, печінці та шлунку, яке ми виявили під час наших досліджень.

Отже, гострий панкреатит, викликаний дією L-аргініну, протягом перших з моменту моделювання хвороби 10 діб спостереження супроводжується поступовим зменшенням ОШК у підшлунковій залозі, печінці та СОЖ. Корвітин цілковито відновлює порушений в результаті хвороби місцевий кровотік в підшлунковій залозі та майже повністю в печінці, а в шлунку – лише частково.

**Т.В. Вовкун, П.И. Янчук, Л.Я. Штанова,
А.С. Шаламай**

ТКАНЕВОЙ КРОВОТОК В ОРГАНАХ ПИЩЕВАРЕНИЯ КРЫС С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КОРВИТИНА

Исследовано действие кверцетина (в виде модифицированной формы – корвитина), на объемную скорость кровотока (ОСК) в поджелудочной железе, печени и слизистой оболочке желудка (СОЖ) крыс с острым панкреатитом (ОП), вызванным введением L-аргинина. ОСК определяли методом клиренса водорода с электрохимической

его генерацией с помощью полярографа LP-9 (Чехия). На протяжении первых 10 сут с момента моделирования ОП в указанных органах по сравнению с интактными животными наблюдалось постепенное уменьшение ОСК: на 42% ($P<0,01$) в поджелудочной железе, на 61% ($P<0,001$) в печени, на 64% ($P<0,001$) в СОЖ, то есть наиболее существенные изменения выявлены в желудочной слизистой, наименее существенные – в ткани поджелудочной железы. В отличие от контрольной группы животных, которым моделировали ОП и на протяжении 20 сут вводили лишь физиологический раствор, использование корвитина (5 мг/кг, раз в сутки, с 11-х по 20-е сутки эксперимента) в той или иной степени способствовало восстановлению ОСК во всех исследуемых органах: в поджелудочной железе – в полной мере, в печени и в желудке – частично. Исходя из полученных результатов, корвитин можно рекомендовать как средство частичной или полной коррекции нарушений кровотока, которые возникают в поджелудочной железе и других органах пищеварительной системы при ОП, что может улучшить функциональное состояние этих органов на ранних стадиях болезни и ускорять полное восстановление их функций.

Ключевые слова: L-аргинин; острый панкреатит; поджелудочная железа; печень; слизистая оболочка желудка; корвитин; тканевой кровоток.

**T.V. Vovkun¹, P.I. Yanchuk¹, L.Y. Shtanova¹,
A.S. Shalamay²**

TISSUE BLOOD FLOW IN THE DIGESTIVE ORGANS OF RATS WITH ACUTE PANCREATITIS AFTER CORVITIN ADMINISTRATION

We have investigated the action of quercetin (in a modified form – Corvitin, BCPP, Ukraine) on the rate of blood flow in the pancreas, liver and gastric mucosa of rats with acute pancreatitis (AP) caused by administration of L-arginine. The rate of blood flow was measured by hydrogen clearance method with electrochemical his generation using Polarographs Lr-9 (Czech Republic). During the first 10 days after modelling of AP in these organs it was observed a gradual decrease compared to the intact animals in the rate of blood flow by 42% ($P<0,01$) in the pancreas, by 61% ($P<0,001$) in the liver and by 64% ($P<0,001$) in the gastric mucosa, i.e., the most significant changes occurred in the gastric mucosa, the least – in the tissue of the pancreas. Compared with the control group of animals with modelling acute pancreatitis which during 20 days was administered only saline, application of Corvitin (5 mg/kg, 1 time per day from 11 to 20 days of experiment) in varying degrees promoted to the recovery of the rate of blood flow in all investigated organs: in the pancreas – fully, in the liver – almost entirely and in the gastric mucosa – only partially. Thus, based on obtained results Corvitin can be recommended for partial or complete correction of blood flow disturbances, which arise in the pancreas and other organs of the digestive system in AP. Corvitin can improve the functional state of

these organs in the early stages of the disease and accelerate the full restoration of their functions.

Key words: L-arginine; acute pancreatitis; pancreas; liver; gastric mucosa; Corvitin; rate of blood flow.

¹ Kyiv Taras Shevchenko National University

² Closed Joint Stock Company "Borschagovsky Chemical-Pharmaceutical Plant", Kyiv, Ukraine

REFERENCES

- Sah RP, Garg P, Saluja AK. Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(5):507-15.
- Zhou ZG, Chen YD. Influencing factors of pancreatic microcirculatory impairment in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2002;8:406-412.
- McFadden DW. Organ failure and multiple organ system failure in pancreatitis. *Pancreas*. 1991;6:S37-S43.
- Hegyi P, Rakonczay ZJ, Sári R, Góg C, Lonovics J, Takács T, Czako L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(14):2003-2009.
- Sunamura M, Shibuya K, Yamauchi J, Matsuno S. Microcirculatory derangement and ischemia of the pancreas. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1999;100(5):342-6.
- Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res*. 2005;54(4):363-368.
- Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2006;93(5):518-30.
- Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao VS. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(9):1534-1539.
- Moïsenko OO, Sahach VF, Tkachenko MM, Korkushko OV, Bezrukov VV, Kulchytskyi OK, Stefanov OV, Soloviov AI, Mala LT, Frol'kis VV. Mechanisms of nitric oxide activity in cardiovascular system as a basis of pathogenetic therapy of related diseases. *Physiol Zh*. 2004;50(1):11-30. [Ukrainian].
- Pawlikowska-Pawlega B, Gruszecki WI, Misiak LE. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(4):605-12.
- Yu PX, Zhou QJ, Zhu WW, Wu YH, Wu LC, Lin X, Chen MH, Qiu BT. Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. *Thromb Res*. 2013;131(6):e270-3.
- Arikan S, Ersan I, Karaca T, Kara S, Gencer B, Karaboga I, Hasan Ali T. Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Arq Bras Oftalmol*. 2015;78(2):100-4.
- Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):1018-25.
- Vovkun TV, Yanchuk PI, Shtanova LY, Veselsky SP, Baranowsky VA. Effect of Corvitin on Secretory Processes and Blood Flow in the Rat Gastric Mucosa. *Int J Physiol and Pathophysiol*. 2014;4:70(4):335-43.
- Vinogradova E, Pasichnichenko O, Vovkun T, Yanchuk P. Influence of corvitin on liver blood flow and serotonin on contractile activity of portal vein. *Bull of Kyiv National Taras Shevchenko Univ*. 2012;15:30-32. [Ukrainian].
- Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut*. 2001;49:241-250.
- Yanchuk PI, Palatniy TP, Rusinchuk YI. Modified electrode for registration of local blood flow in the gastric mucosa by hydrogen clearance. *Rus Physiol Journ*. 2005;91(9):1108-1110. [Russian].
- Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery*. 2000;127:399-407.
- Hegyi P, Takacs T, Jarmay K, Nagy I, Czako L, Lonovics J. Spontaneous and cholecystokinin-octapeptide-promoted regeneration of the pancreas following L-arginine-induced pancreatitis in rat. *Int J Pancreatol*. 1997;22:193-200.
- Hegyi P, Takacs T, Tiszlavicz L, Czako L, Lonovics J. Recovery of exocrine pancreas six months following pancreatitis induction with L-arginine in streptozotocin-diabetic rats. *J Physiol Paris*. 2000;94:51-55.
- Hotz HG, Foitzik T, Rohweder J, Schulzke JD, Fromm M, Runkel NS, Buhr HJ. Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg*. 1998;2:518-525.
- Dang SCH, Zhang JX, Qu JG, Wang XQ. Ligustrazine alleviates gastric mucosal injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007;6(2):213-218.
- Dibirov AD, Petukhov VA, Donskoff MD. Changes of pankreatogepatoduodenal zone in experimental acute lipogenic pancreatitis. *Bull Experim Biol and Medicine*. 2000;130(8):232-236. [Russian].
- Zinenko DY, Beregovenko IM. State of hepatic microcirculation and its role in the development of pathological changes in the liver when simulating acute pancreatitis in rats. *Morphology*. 2008;2(3):39-48. [Ukrainian].
- Mozzhelin ME, Vengerovsky AI, Sukhodolov IV, Saratikov A. Liver damage in experimental acute pancreatitis. *Bull of Experim Biol and Med*. 2001;132(1):647-649. [Russian].
- Panek J, Zasada J, Poźniczek M. Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis. *Przegl Lek*. 2007;64(6):435-7.

Матеріал надійшов
до редакції 08.04.2015

Функціональна активність клітин аденокарциноми Ерліха після обробки гібридними наноконструкціями

А.М. Гольцев¹, Н.М. Бабенко¹, Ю.О. Гаєвська¹, О.В. Челомбітько¹, М.О. Бондарович¹, Т.Г. Дубрава¹, М.В. Останков¹, В.К. Клочков², Н.С. Кавок², Ю.В. Малюкін²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; ²Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків; e-mail: cryopato@gmail.com

Розроблено методику отримання гібридних наноконструкцій, які містять наночастинки ортованадатів рідкісноземельних елементів $GdYVO_4:Eu^{3+}$, холестерин та люмінесцентний барвник DiI. Методом імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл до CD44, CD24, CD117 і Sca-1-маркерів встановлено зміну співвідношення пухлинних прекурсорів різного ступеня диференціювання в загальному пулі аденокарциноми Ерліха після обробки гібридними наноконструкціями. Суттєве зниження концентрації найбільш канцерогенних CD44^{hi}-клітин із одночасним збільшенням кількості CD117⁺-клітин підвищувало індекс CD44^{high}/CD117⁺-клітин. Показано, що застосування синтезованих гібридних наноконструкцій пригнічувало ріст пухлини майже на 80 %. Отримані результати підкреслюють значущість кооперативних взаємодій клітин із різними фенотиповими ознаками в підтримці росту пухлинних сайтів. Запроваджено використання індексу CD44^{high}/CD117⁺-клітин як одного із діагностичних і прогностичних показників розвитку та ступеня інактивації пухлинного процесу при застосуванні різних видів протипухлинної терапії.

Ключові слова: стовбурові ракові клітини; наночастинки; аденокарцинома Ерліха; ортованадати.

ВСТУП

Нові способи протипухлинної терапії дають змогу вибірково інактивувати саме пухлинні клітини з мінімальним пошкодженням нормальних тканин [1–3]. Нині цю проблему можливо вирішити за допомогою наноматеріалів, а саме використовуючи наночастинки (НЧ) рідкісноземельних металів (зокрема, ванадію та його сполук). Так, показано, що дихлорид ванадію здатний значно інгібувати проліферацію клітин внаслідок акумуляції в ядерному гетерохроматині з подальшою індукцією мітотичних аберацій, транзиторною супресією мітозів, які призводять до накопичення клітин у пізній фазі S і G₂ [4]. Продemonстровано, що дихлорид ванадію і ацетілацетонат ванадію є ефективними терапевтичними антипроліферативними агентами при лікуванні гліобластоми і раку молочної залози людини [5].

© А.М. Гольцев, Н.М. Бабенко, Ю.О. Гаєвська, О.В. Челомбітько, М.О. Бондарович, Т.Г. Дубрава, М.В. Останков, В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малюкін

Попередні дослідження показали здатність НЧ зі складом $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re=Y, Gd, La$, де Y – ітрій, Gd – гадоліній, La – лантан) на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів сферичної і веретеноподібної форм ідентифікувати пухлинні клітини-попередники *in vitro* [6] та інгібувати їхню проліферативну активність *in vivo* в експериментальній моделі аденокарциноми Ерліха (АКЕ) [7]. Встановлено, що пероральне та внутрішньоочеревинне введення мишам НЧ ванадату гадолінію, активованих європієм, не призводило до загибелі тварин, змін масових коефіцієнтів внутрішніх органів, морфології статевих клітин, що дало змогу віднести синтезовані зразки нанованадату до практично нетоксичних сполук (V клас токсичності) [8].

Для максимального лікувального ефекту протипухлинних засобів необхідна адресна доставка до цитоплазматичного або ядерного компартменту клітини, передумовою якої є

наявність у їхньому складі сполук, споріднених до мембран клітин-мішеней. Такою сполукою може бути холестерин, котрий активно «вилучається» з кровотоку проліферуючими раковими клітинами для побудови біомембран. Цьому може сприяти знаходження на поверхні клітин пухлини великої кількості SR - B1 (від англ. scavenger receptor, class B type I) і кавеолін-1 (Cav-1) рецепторів, які можуть зв'язуватися з вільним холестерином, що «вилучається» з кровоносного русла [9]. При цьому пухлина є не тільки «пасткою» холестерину в організмі, але і сама здатна його синтезувати *de novo*, причому з більшою швидкістю, ніж навколишні нормальні тканини [10].

Додавання до створених нанокомплексів флуоресцентних зондів, здатних до різнокольорового детектування, дає можливість оцінити кількісний вміст клітин-мішеней у тканині. У біологічних дослідженнях як флуоресцентний зонд використовується органічний карбоціаніновий ліпофільний барвник 1,1'-діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиліндокарбоціанін перхлорат (DiI, «Sigma», США). Відомо, що у розчинах він може перебувати у вигляді мономерів і агрегатів [11]. У експериментах *in vitro* моніторинг розподілу мономерної й агрегованої форм барвника надає можливість простежити за динамікою вбудовування комплексу в мембрану клітини за співвідношенням смуг люмінесценції мономера – «J-агрегату» [12].

Ініціація та розвиток пухлинного процесу зумовлені існуванням нечисленної популяції стовбурових ракових клітин (СРК), які здатні до самопідтримки, необмеженої проліферації, високої інвазивності і лікарської резистентності. Показано, що ознаки СРК молочної залози мають клітини з гіперекспресією CD44 молекули (CD44^{high}) та фенотипом CD44⁺CD24⁻ [13,14]. Показано, що через 5 міс після введення мишам усього 200 клітин із фенотипом CD44⁺CD24⁻/loESA⁺ формувалися солідні пухлини в 100 % випадків [13]. Клітини раку молочної залози з фенотипом

CD44⁺CD24⁺ є більш диференційованими порівняно з CD44⁺CD24⁻-субпопуляцією, вони здатні формувати нові пухлини в 30 % випадків при введенні $1 \cdot 10^5$ клітин на мишу [15].

Важливим є наявність серед цих клітин субпопуляцій з Sca-1⁺ і CD117⁺-маркерами. Показано, що Sca-1⁺-клітини існують і в тканині молочної залози здорових мишей, але їхня кількість не перевищує 20 %, тоді як при розвитку раку молочної залози трансгенних мишей із активацією онкогена Wnt-1 під контролем промотору вірусу MMTV їх було в 3 рази більше [16]. При цьому Sca-1⁺-клітини тканин пухлини мали підвищену пухлиноутворювальну активність порівняно зі Sca-1⁻-популяцією. Цей факт підтверджує, що Sca-1⁺-клітини пухлини дійсно можуть бути СРК із підвищеним інвазивним потенціалом.

Високий рівень експресії CD117 найчастіше спостерігається при раку яєчників, саме на акцесорних фібробластоподібних стромальних клітинах [17]. В нормі на епітеліальних клітинах молочної залози кількість клітин з високою експресією CD117 маркера достатньо висока [18]. При розвитку інвазивної форми раку молочної залози кількість його значно знижується аж до повного зникнення [19].

Для експериментального дослідження впливу різних факторів і терапевтичних засобів безпосередньо на ракові клітини зручно використовувати асцитну форму АКЕ, яка є лінією недиференційованих клітин раку молочної залози мишей, що перевидається *in vivo* [20]. Публікації щодо субпопуляційного складу АКЕ та їхньої значимості у підтримці онкопроцесу нечисленні. Так, підтверджено, що при розвитку цієї форми аденокарциноми підвищеним туморогенним потенціалом є фракція CD44⁺-клітин, отримана за допомогою імуномагнітного сортування [21]. В культурі АКЕ, яка була індукована CD44⁺-фракцією, відзначалося формування пухлин з переважним вмістом клітин із фенотипами CD44^{high} і CD44⁺CD24⁻. Але даних

щодо кількості інших субпопуляцій та їхніх співвідношень немає. Крім того, актуальним питанням є визначення кооперативних взаємодій клітин із різними фенотиповими ознаками в підтримці росту пухлинних сайтів після використання таких лікувальних засобів, як наноматеріали.

Метою нашої роботи було дослідити вплив гібридних наноконкомплексів, які містять неорганічні сферичні НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів складу $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, холестерину та барвника DiI, на функціональну активність клітин АКЕ.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 8-місячних самцях мишей лінії Balb/C масою 18 г, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків). Усі маніпуляції з тваринами виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і погоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Первинною культурою були кріоконсервовані клітини АКЕ [22], які після розморожування тричі перевивали *in vivo* для нівелювання впливу факторів заморожування–відігрівання і набуття ними морфологічних та функціональних ознак нативних клітин [23]. «Стабілізовані» таким чином клітини вводили мишам внутрішньоочеревинно в дозі $3 \cdot 10^6$ клітин в 0,3 мл фізіологічного розчину та культивували протягом 7 діб у перитонеальній порожнині. Через 7 діб асцитичну рідину з неї отримували шприцем через голку №10 з внутрішнім діаметром 2,69 мм, попередньо вводячи тварин у легкий ефірний наркоз. Абсолютну кількість клітин визначали за об'ємом накопиченої в ній асцитичної рідини з урахуванням концентрації клітин

АКЕ. Розвиток цієї форми аденокарциноми вважали достатнім, якщо у перитонеальній порожнині мишей загальна кількість клітин становила не менше ніж $3,5 \cdot 10^8$ [23].

Гібридні комплекси, що містять сферичні НЧ ортованадатів рідкісноземельних елементів $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ у концентрації 1,3 г/л, холестерин («Acros organics», Бельгія) у концентрації 0,55 г/л та люмінесцентний барвник DiI у концентрації $2,2 \cdot 10^{-5}$ ммоль/л, були розроблені співробітниками відділу нанокристалічних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України та отримували за методом Клочкова [24]. Сферичні НЧ синтезовані за описаною раніше методикою [25].

Концентрацію компонентів, які входять до створеного наноконкомпозиту, обирали згідно з рекомендаціями розробника. Розподіл кількості НЧ у складі гібридного комплексу за розмірами визначали методом динамічного розсіювання світла $\lambda=659$ нм на приладі ZetaPALS / BI-MAS («Brookhaven Instruments Corp.», США) при куті розсіювання 90° . Вимірювання проводили в спеціальних полістиролових кюветах («BI-SCP», США). Перед їх початком розчини витримували у термостаті при 25°C .

В усіх досліджуваних варіантах інкубацію 900 мкл клітин АКЕ з наноконкомпозитами проводили при кімнатній температурі протягом 3 год, що є оптимальним для зв'язування наноконкомплексів із мембранами клітин [12]. Варіанти обробки АКЕ: 1 – 100 мкл сферичних НЧ у концентрації 1,3 г/л; 2 – 100 мкл сферичних НЧ у концентрації 1,3 г/л та водна суспензія холестерину в концентрації 0,55 г/л; 3 – 100 мкл гібридного комплексу; контроль – клітини АКЕ без обробки наноконкомпозитами.

Перед внутрішньоочеревинним введенням мишам суспензію клітин АКЕ досліджуваних варіантів тричі відмивали фізіологічним розчином (1:1) для видалення надлишків наноконкомпозитів через центрифугування при 400 g.

Фенотип клітин АКЕ оцінювали з використанням моноклональних антитіл («BD Biosciences», США) до CD44 (FITC) (№ 553133, клон IM7), CD117 (FITC) (№ 553352, клон 2B8), Sca-1 (FITC) (№ 553333, клон E13-161.7), а також CD24 (PE) (№ 553262, клон M1/69). Імуноглобуліни тих самих фенотипів (за каталогом № 553988, клон A95-1 і № 553989, клон A95-1; «BD Biosciences», США) були використані як контроль. За допомогою CD44 (FITC) и CD24 (FITC) моноклональних антитіл проводили подвійне імунофенотипове фарбування. Клітини з середнім значенням флуоресценції CD44-маркера більше ніж 10^3 (за логарифмічною шкалою), відносили до CD44^{high}-субпопуляції. Концентрацію вищевказаних субпопуляцій клітин у зразках АКЕ визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur («BD, США»). Для мінімізації помилок у пробах аналізували не менше 10 000 подій. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми «WinMDI 2.8». Індекс CD44^{high} / CD117⁺-клітин визначали як співвідношення відсотка цих клітин в асцитичній рідині з перитонеальної порожнини тварин кожної з досліджуваних груп.

Ступінь інгібіції росту АКЕ обчислювали за формулою: $C_i = ((V(k) - V(d)) / V(k)) \cdot 100 \%$, де $V(k)$ – абсолютна кількість клітин АКЕ в перитонеальній порожнині контрольної

групи; $V(d)$ – у дослідній групі тварин (варіанти 1–3). Інтенсивність росту АКЕ дослідних груп ($I_{рд}$) визначали за формулою: $I_{рд} = I_{рк} - C_i$, де $I_{рд}$ – інтенсивність росту пухлини дослідної групи; $I_{рк}$ – інтенсивність росту пухлини контрольної групи, C_i – ступінь інгібіції росту АКЕ дослідної групи тварин. При розвитку АКЕ інтенсивність росту пухлини приймалася за 100 %, при цьому ступеня інгібіції росту АКЕ не було.

Для статистичної обробки результатів застосовували критерій t Стюдента й комп'ютерну програму «Excel» («Microsoft», США). Результати приводили у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створені гібридні наноконкомплексні мали середній гідродинамічний діаметр 77 нм (рис.1, а). Схематичну будову комплексу представлено на рис.1, б. Додавання до створених наноконкомплексів барвника DiI дає змогу простежити за динамікою вбудовування комплексу в мембрану клітини [11]. Раніше ми показали, що наноконкомплексні були здатні до візуалізації практично всіх клітин із фенотипом CD44⁺, до складу яких входить CD44^{high}-популяція,

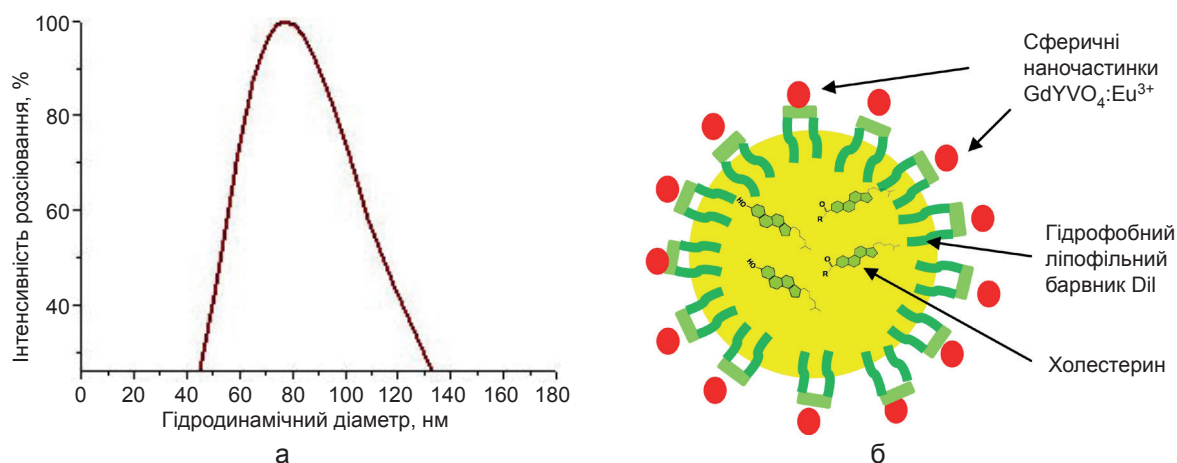


Рис.1. Гібридний наноконкомплекс: а – розподіл за розміром гібридних наноконкомплексів у воді, б – схематична будова комплексу

що має усі ознаки СРК [12]. Саме барвник DiI забезпечував можливість ідентифікації СРК у клітинах АКЕ після інкубації з наноконкомплексам, що було підтверджено методами люмінесцентної мікро- та спектроскопії. Отже, можна вважати, що гібридні наноконкомплекси – агенти таргетного маркування канцерогенних клітин-попередників [12].

З точки зору використання наноконкомплексів такого складу в терапії злоякісних пухлин важлива оцінка їхньої інактивуєної дії на СРК в умовах *in vivo*. Встановлено, що АКЕ (контроль) є гетерогенною популяцією, у якій наявні клітини з такими фенотиповими маркерами: CD44^{high}, CD44⁺CD24⁻, CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁺, CD117⁺, Sca-1⁺ (таблиця).

В умовах розвитку онкопатології дія хімічних агентів або радіації може перерозподіляти субпопуляційний склад пухлини зі включенням каскадів активації/інгібіції проліферативної активності стовбурових клітин. Очікувано, що обробка клітин АКЕ синтезованими наноконкомпозитами виражено перерозподіляла субпопуляції клітин-попередників із різним фенотипом, тобто різним рівнем диференціювання порівняно з контр-

олем (див. таблицю). Виняток – субпопуляція клітин із маркером Sca-1, кількість яких була досить високою у контролі (87,11±4,23) та істотно не змінювалася при всіх видах обробки.

Інкубація клітин АКЕ зі сферичними НЧ (варіант 1) знижувала удвічі порівняно з контролем концентрацію CD44^{high}-клітин. Концентрація СРК з фенотипом CD44⁺CD24⁻ ще більше зменшувалася, а саме у 4,5 рази. При цьому збільшувалася концентрація диференційованих CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁺ та CD117⁺-клітин порівняно з контролем. Деякими авторами підвищення рівня експресії CD117 вважається можливим тестом ефективності протипухлинної терапії [26]. У такому разі відзначене нами підвищення концентрації CD117⁺-клітин удвічі порівняно з контролем на тлі пригнічення росту АКЕ на 58,24±3,45% може бути взаємозумовлюючим та свідчити про позитивний ефект цієї терапії (див. таблицю).

Обробка клітин АКЕ НЧ із холестерином (варіант 2) майже 9-кратно знижувала концентрацію CD44^{high}-клітин порівняно з контролем (див. таблицю). Важливо, що концентрація всіх інших субпопуляцій клітин

Зміна компонентного складу та функціональної активності культивованих *in vivo* клітин аденокарциноми Ерліха (АКЕ) після обробки гібридними наноконкомплексам та їхніми складовими (M±m, n = 5)

Варіанти обробки клітин	Концентрація клітин з вказаним фенотипом, %						Абсолютна кількість клітин у перитонеальній порожнині x10 ⁷ кл	Ступінь інгібіції росту АКЕ, %
	CD44 ^{high}	CD44 ⁺ CD24 ⁻	CD44 ⁺ CD24 ⁺	CD44 ⁻ CD24 ⁺	CD117 ⁺	Sca-1 ⁺		
Контроль АКЕ	0,17±	3,38±	2,08±	1,23±	2,65±	87,11±	34,8±	-
per se	0,03	0,21	0,22	0,14	0,23	4,23	1,27	
АКЕ та сферичні наночастинки	0,09±	0,75±	2,75±	6,18±	5,04±	81,82±	14,53±	58,24±
(варіант 1)	0,01 ^{*, ***, ****}	0,05 ^{*, ***, ****}	0,28 ^{***, ****}	0,32 [*]	0,32 ^{*, ****}	5,28	0,72 ^{*, ***, ****}	3,45 ^{***, ****}
АКЕ, сферичні наночастинки та холестерин	0,02±	0,40±	9,77±	7,85±	10,47±	83,77±	8,80±	74,70±
(варіант 2)	0,001 ^{*, **}	0,02 ^{*, ***, ****}	0,62 ^{*, ***, ****}	0,44 ^{*, **}	0,83 ^{*, **}	5,73	0,25 ^{*, **}	4,38 ^{**}
АКЕ та гібридний комплекс	0,01±	0,35±	8,14±	7,01±	9,29±	87,95±	8,14±	76,61±
(варіант 3)	0,001 ^{*, ***, ****}	0,02 ^{*, **}	0,36 ^{*, **}	0,28 [*]	0,68 ^{*, **}	6,45	0,27 ^{*, **}	4,70 ^{**}

*P < 0,05 відносно контролю, ** відносно варіанту 1, *** відносно варіанту 2, **** відносно варіанту 3.

(виключаючи Sca-1⁺) після такої обробки максимально підвищувалася порівняно з контролем. Такий характер перерозподілу субпопуляційного складу АКЕ супроводжувався посиленням інгібіції росту пухлини порівняно з варіантом 1 ($74,70 \pm 4,38$ і $58,24 \pm 3,45$ % відповідно, $P < 0,05$).

Після введення в комплекс барвника DiI (варіант 3) встановлено зниження кількості тільки CD44^{high}-клітин (порівняно з варіантом 2). Інші показники після обробки клітин АКЕ суттєво не змінювалися. Такий незначний перерозподіл субпопуляцій практично не вплинув і на ступінь пригнічення росту пухлини ($76,61 \pm 4,70$ і $74,70 \pm 4,38$ % відповідно).

Таким чином, можна припустити, що протипухлинна дія синтезованих гібридних наноконкомплексів зумовлена наявністю в їхньому складі сферичних НЧ. Раніше нами була доведена їхня здатність до гальмування росту АКЕ *in vivo* внаслідок максимального зниження концентрації CD44^{high}-клітин [6]. Слід зазначити, що додавання холестерину до НЧ підсилює їхню інгібувальну активність завдяки його спорідненості до мембран клітин

пухлини. Дані аналізу структури і принципів функціонування мембран пухлинних клітин свідчать на користь цього припущення [27]. Автори зробили висновок, що вбудовування холестерину в мембрани клітин пухлини є передумовою адресної доставки ліпосом із терапевтичними речовинами безпосередньо всередину клітини.

Зміна концентрацій усіх популяцій клітин АКЕ після обробки наноконкомплексам дає підставу вважати, що їх мішенню можуть бути майже всі клітини загального пула цієї аденокарциноми (за винятком Sca-1⁺), але насамперед – СРК із фенотипом CD44^{high}. Зниження концентрації CD44^{high}-клітин суттєво впливає на інтенсивність росту АКЕ. Крім того, виявилось, що особливу роль у рості пухлини відіграє співвідношення субпопуляцій CD44^{high}- і CD117⁺-клітин (індекс $CD44^{high} / CD117^{+}$). При всіх видах обробки АКЕ зменшення індексу $CD44^{high} / CD117^{+}$ супроводжувалося зниженням інтенсивності росту пухлини, що обумовлювало збільшення кількості тварин, які вижили до 20-ї доби розвитку АКЕ (рис.2).

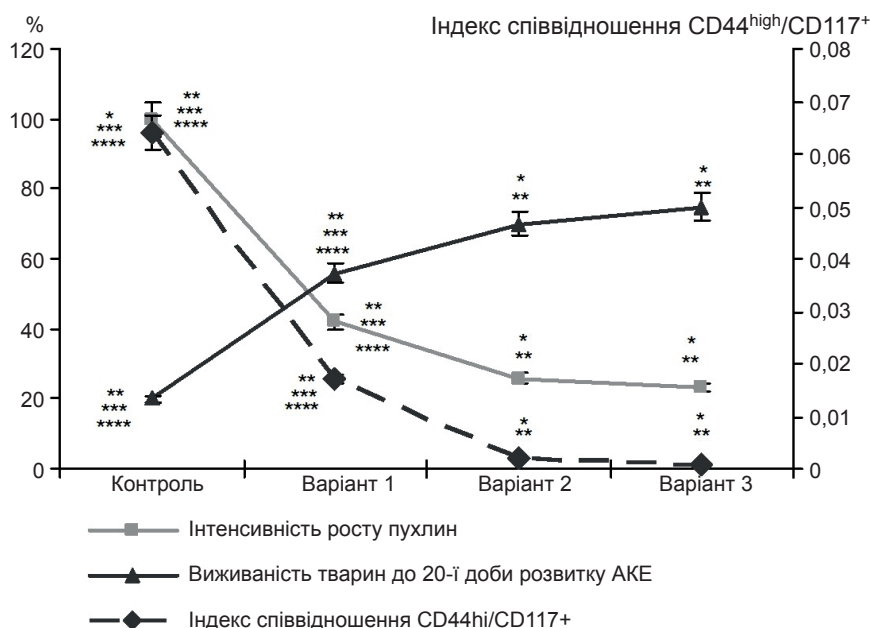


Рис.2. Показники інтенсивності росту аденокарциноми Ерліха, виживаності тварин та індекс співвідношення субпопуляцій клітин CD44^{high}/CD117⁺ після інкубації з наноконкомпозитами. * $P < 0,05$ відносно контролю, ** відносно варіанту 1, *** відносно варіанту 2, **** відносно варіанту 3

Отже, встановлена здатність синтезованих гібридних наноконкомплексів на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів до інгібіції росту пухлини ($76,61 \pm 4,70$ %) на тлі істотної зміни кількісного співвідношення клітин-попередників із різним фенотипом у загальному пулі АКЕ. Кожна зі складових гібридного комплексу робила свій внесок у інгібіцію росту пухлини. Так, сферичні НЧ були здатні значно пригнічувати ріст АКЕ (ступінь інгібіції $58,24 \pm 3,45$ %). Додавання холестерину до наноконкомплексу ампліфікувало протипухлинну дію НЧ, зменшуючи інтенсивність росту пухлини (ступінь інгібіції $74,70 \pm 4,38$ %), а введення в комплекс барвника DiI, хоча й не статистично значуще, але збільшувало цей показник до $76,61 \pm 4,70$ %. При всіх видах обробки АКЕ знижувалася концентрація CD44^{high}-клітин та одночасно підвищувалася кількість CD117⁺-клітин, тому індекс співвідношення CD44^{high}/CD117⁺ може бути запропонований як один із діагностичних і прогностичних показників розвитку та ступеня інактивації онкопроцесу при різних видах протипухлинної терапії.

А.Н. Гольцев, Н.Н. Бабенко, Ю.А. Гаевская, О.В. Челомбитко, Н.А. Бондарович, Т.Г. Дубрава, М.В. Останков, В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малукин

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГИБРИДНЫМИ НАНОКОМПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИХ ОРТОВАНДАТЫ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ХОЛЕСТЕРИН И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ КРАСИТЕЛЬ

Разработана методика получения гибридных наноконкомплексов, содержащих ортованадаты редкоземельных элементов $GdYVO_4:Eu^{3+}$, холестерин и люминесцентный краситель DiI. Методом иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD44, CD24, CD117 и Sca-1 маркерам установлено изменение соотношения опухолевых предшественников разного уровня дифференцировки в общем пуле аденокарциномы Эрлиха после обработки гибридными наноконкомплексми. Существенное снижение концентрации наиболее канцерогенных CD44^{high}-клеток с одновременным увеличением

количества CD117⁺-клеток повышало индекс соотношения CD44^{high} / CD117⁺-клеток. Показано, что применение гибридных наноконкомплексов подавляло рост опухоли почти на 80 %. Доказана значимость кооперативных взаимодействий клеток с разными фенотипическими признаками в поддержании роста опухолевых сайтов. Предлагается использование индекса соотношения CD44^{high} / CD117⁺-клеток как одного из диагностических и прогностических показателей развития и степени инактивации опухолевого процесса при применении различных видов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: стволовые раковые клетки; наночастицы; аденокарцинома Эрлиха; ортованадаты.

A.N. Goltsev¹, N.N. Babenko¹, Yu.A. Gaevskaya¹, O.V. Chelombitko¹, N.A. Bondarovich¹, T.G. Dubrava¹, M.V. Ostankov¹, V.K. Klochkov², N.S. Kavok², Yu.V. Malyukin²

FUNCTIONAL ACTIVITY OF EHRLICH CARCINOMA CELLS AFTER TREATMENT WITH HYBRID NANOCOMPLEXES CONTAINING ORTHOVANADATES OF RARE-EARTH ELEMENTS, CHOLESTEROL AND LUMINESCENT DYE

Tumor development is the consequence of expanding the population of low differentiated cells with unlimited self-maintenance potential, i.e. cancer stem cells (CSCs). Application of new forms of nanocomposites capable of binding to CSCs and inducing the tumor destruction is perspective direction for treating this pathology. There have been developed the methods of obtaining hybrid nanocomplexes containing rare-earth orthovanadates $GdYVO_4:Eu^{3+}$, cholesterol and luminescent dye DiI. By immune fluorescence method using monoclonal antibodies to CD44, CD24, CD117 and Sca-1 markers there has been established the change in the ratio of tumor progenitors of various differentiation levels in a general pool of Ehrlich carcinoma (EC) after treatment with hybrid nanocomplexes. Essential reduction in the concentration of the most tumorigenic CD44^{high} cells with simultaneous rise in the number of CD117⁺-cells resulted in an increased index of CD44^{high} / CD117⁺ ratio. It has been demonstrated that application of hybrid nanocomplexes suppressed the tumor growth almost by 80%. The value of cooperative interactions of the cells with different phenotype signs in tumor sites has been proved. The index of CD44^{high} / CD117⁺ ratio can be used as one of diagnostic and prognostic parameters of development and inactivation rate of tumor process when using different types of anti-tumor therapy.

Key words: cancer stem cells; nanoparticles; Ehrlich carcinoma; orthovanadates.

¹*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;*

²*Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

REFERENCES

1. Ambasta RK, Sharma A, Kumar P. Nanoparticle mediated targeting of VEGFR and cancer stem cells for cancer therapy. *Vasc Cell*. 2011 Nov;3:26. doi: 10.1186/2045-824X-3-26.
2. Prylutska SV, Burlaka AP, Prylutsky YI, Ritter U, Scharff P. Pristine C(60) fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol*. 2011 Sep;33(3):162–4.
3. Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Prylutsky YuI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS. Application of C60 fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo *J Biomed. Nanotechnol*. 2015 July;11(7):1139–52 DOI:10.1166/jbn.2015.2058.
4. Kopf-Maier P, Krahl D. Tumor inhibition by metallocenes: ultrastructural localisation of titanium and vanadium, in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chem Biol Interact*. 1983 Jun;44(3):317–28.
5. Navara CS, Benyumov A, Vassilev A, Narla RK, Ghosh P, Uckun FM. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2001 Apr;12(4):369–76.
6. Goltsev AN, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Bondarovich NA, Ostankov MV, Chelombytko OV, Dubrava TG, Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. Capability of orthovanadate-based nanoparticles to in vitro identification and in vivo inhibition of cancer stem cells. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*. 2013; 11(4): 729–39. [Ukrainian].
7. Goltsev AN, Chelombitko OV, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Bondarovich NO, Ostankov MV, Dimitrov AYU, Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. Functional activity of Ehrlich carcinoma cancer stem cells after treatment by orthovanadate-based nanoparticles. *Ann Oncol*. 2014; 25(suppl 4):iv569. doi: 10.1093/annonc/mdl359.20 *Annals of oncology*.
8. Karpenko NA, Malukin YuV, Koreneva E M, Klochkov VK, Kavok NS, Smolenko NP, Pochernyaeva SS. The effects of chronic intake of nanoparticles of cerium dioxide or gadolinium ortovanadate into aging male rats. *Proceedings of the 3rd Int. Conf. «Nanomaterials: Applications and Properties '2013», September 16-21, 2013: Abstract book - Alushta (Ukraine)*, 2013; 2(4):04NAMB28-1–04NAMB28-4.
9. Al - Jarallah A, Trigatti BL. A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec; 1801(12):1239-48. doi: 10.1016/j.bbali.2010.08.006.
10. Clayman RV, Bilhartz LE, Buja LM, Spady DK, Dietsch JM. Renal cell carcinoma in the Wistar-Lewis rat: a model for studying the mechanisms of cholesterol acquisition by a tumor in vivo. *Cancer Res*. 1986 Jun;46(6):2958–63.
11. Lebed AS, Efimova SL, Guralchuk GYa, Sorokin AV, Borovoy IA. Study of complex formation processes in “fluorescent probe - surface active agent” system in aqueous solutions at the concentration of surface active agents below and under CCM. *Biophysical bulletin*. 2010; 24(1):46-55. [Ukrainian].
12. Goltsev AN, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Ostankov MV, Chelombitko OV, Klochkov VK, Kavok NS. Identification of tumour cells with hybrid complexes based on non-organic nanoparticles and organic biologically active compounds: Collection of 16th International Scientific and Practical Conference “Fundamental and Applied Research, Design and Application of High Technologies in Industry and Economy”, St. Petersburg, December 5-6, 2013. St. Petersburg: Publishing House of Polytechnic University, P.121-31 [Russian].
13. Al-Hajj M, Clarke M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep 20;23(43):7274-82.
14. Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Mazrou A, Barhoush E, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K, Adra CN. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44^{high}/CD24^{low} phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer*. 2013; 13:289. doi: 10.1186/1471-2407-13-289.
15. Yan W, Chen Y, Yao Y, Zhang H, Wang T. Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44⁺/CD24⁺ breast cancer MCF7 cells in vitro and in nude mice. *Cancer Cell Int*. 2013 Jun 24;13(1):62. doi: 10.1186/1475-2867-13-62.
16. Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, Rowlands T, Egeblad M, Cowin P, Werb Z, Tan LK, Rosen JM, Varmus HE. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(26):15853–8.
17. Huang R, Wu D, Yuan Y, Li X, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Suo Z. CD117 expression in fibroblasts-like stromal cells indicates unfavorable clinical outcomes in ovarian carcinoma patients. *PLoS One*. 2014; 9 (11):e112209.
18. Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer*. 1996 May;73(10):1233-6.
19. Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, Gennatas C, Michalaki V, Frangou-Plegmenou M, Chatzipantelis P. Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori*. 2010 Nov-Dec;96(6):978-84.
20. Ozaslan M, Karagoz I D, Kilic I H, Guldur ME. Ehrlich ascites carcinoma. *African J Biotechnology*. 2011 March; 10(13): 2375–8.
21. Goltsev AN, Chelombytko OV, Bondarovich NA, Ostankov MV, Dimitrov AYU. Cryopreservation effect on pluripotency gene expression in Ehrlich carcinoma cells cells: Abstracts Annual Scientific Conference & AGM of the Society for Low Temperature Biology (STBL) «Freezing biological time 50th Anniversary Celebration». London, UK, October 8-10, 2014, P.84.
22. Goltsev AM, Safranchuk OV, Bondarovich MO, Ostankov MV. Change in cryolability of tumour stem cells depending

- on adenocarcinoma growth phase. Fiziol Zh. 2011; 57(4): 68–76 [Ukrainian].
23. Goltsev AM, Safranchuk OV, Bondarovich MO, Ostankov MV, Babenko NN, Gayevskaya YuA, Chelombitko OV. Methodical approaches to the stabilization of structural and functional states of cryopreserved cells of Ehrlich carcinoma. Reports National Acad Sci of Ukraine. 2012; (8):115-22. [Ukrainian].
24. Klochkov VK, 2015. Method of obtaining of an aqueous dispersion of cholesterol. Ukraine. The decision on handing over of UA patent 14.01.2015. [Ukrainian] .
25. Klochkov VK. Aqueous colloid solutions of nanoluminophores $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{Gd}, \text{La}$). Material Science of Nanostructures. 2009; (2):3–8. [Ukrainian].
26. Charpin C, Giusiano S, Charfi S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. Quantitative immunohistochemical expression of c-Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. Br J Cancer. 2009 Jul 7; 101(1): 48–54. doi: 10.1038/sj.bjc.6605113.
27. Betker JL, Kullberg M, Gomez J, Anchordoquy TJ. Cholesterol domains enhance transfection. Ther Deliv. 2013 Apr;4(4):453-62. doi: 10.4155/tde.13.16.

*Матеріал надійшов
до редакції 23.03.2015*

Особливості визначення оптимальних безпечних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців при підготовці та в умовах, близьких до бойових дій

А.А. Чернозуб, Ю.А. Радченко

Чорноморський державний університет ім. Петра Могили, Миколаїв; e-mail: chernozub@gmail.com

Вивчали необхідність і доцільність застосування інтегрального методу визначення найбільш ефективних, але водночас безпечних режимів навантаження для організму військовослужбовців. Встановлено, що незважаючи на досить перспективне використання запропонованого нами режиму навантажень високої інтенсивності ($Ra=0,71$ ум.од.) для підвищення рівня фізичної підготовки військовослужбовців у найкоротші терміни в мирний час (з мінімальним набором бойової екіпіровки), важливим питанням є те, що в більшості випадків спостерігається повна невідповідність досягнутого рівня до тих вимог і завдань, які ставляться в умовах безпосередніх бойових дій. Вирішення цієї проблеми полягає в тому, що при побудові оптимальних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців враховувалися не тільки їх морфометричні показники тіла, стан здоров'я, вік, спрямованість фізичної підготовки залежно від спеціалізації, а також істотна різниця між первинним рівнем їх фізичного розвитку та тими навантаженнями, які їм потрібно буде подолати у разі бойових дій. Використання розробленого нами інтегрального методу визначення безпечних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців дає змогу оптимізувати механізм пошуку найбільш адекватних параметрів обсягу та інтенсивності навантажень, а також прискорити в найкоротші терміни адаптаційні зміни в їх організмі для підвищення максимальної результативності на цьому етапі підготовки.

Ключові слова: інтегральний метод визначення величини навантаження; режими фізичних навантажень; адаптаційні реакції; кортизол; лактатдегідрогеназа; військовослужбовці.

ВСТУП

Однією з основних проблем сучасної системи фізичної підготовки у збройних силах України є відсутність ефективних методів визначення кількісних інформативних показників фізичного навантаження, що дають змогу диференційовано залежно від умов рухової активності, а також рівня функціональних можливостей організму військовослужбовців та стану їх здоров'я – розрахувати найбільш оптимальні, результативні, але водночас безпечні режими м'язової діяльності, котрі забезпечують високий рівень розвитку фізичних якостей, необхідних для

© А.А. Чернозуб, Ю.А. Радченко

виконання поставлених завдань як під час підготовки, так і за умов бойових дій[1, 2]. У зв'язку з абсолютно новими вимогами, що пред'являються до системи фізичної підготовки військовослужбовців (особливо на початковому етапі), а саме, за найбільш короткий проміжок часу домогтися позитивної динаміки результатів, які дають можливість максимально їх реалізувати під час бойових дій – досить сильно підвищує ймовірність перевантажень їх організму, оскільки в більшості випадків контингент складається переважно з фізично не підготовлених до військової служби людей[3, 4]. Таким чином, використання в процесі підготовки військово-

службовців стандартних параметрів фізичного навантаження і загальноприйнятих методів контролю та управління ними, враховуючи функціональні можливості організму сучасного контингенту, що йде до лав збройних сил України, сприятиме лише незначному підвищенню рівня фізичної підготовки, а в більшості випадків буде негативно впливати на стан здоров'я військовослужбовців в результаті неадекватності пропонованих навантажень фізичним можливостям їх організму, що також негативно вплине на весь процес підготовки.

Мета нашої роботи – встановити необхідність і доцільність застосування інтегрального методу визначення найбільш ефективних, але водночас безпечних режимів навантаження для організму військовослужбовців на етапі початкової підготовки та безпосередньо під час бойових дій.

МЕТОДИКА

Обстежено 400 військовослужбовців чоловічої статі віком від 22 до 35 років, які були мобілізовані в збройні сили України в 2015 р. Було створено три дослідних групи: в першу групу увійшли чоловіки до 25 років (вік – $23,1 \pm 0,23$ роки, маса тіла – $88,9 \pm 3,46$ кг); другу – до 30 років (вік – $27,4 \pm 0,65$ років, маса тіла – $92,3 \pm 2,89$ кг); третю – до 35 років (вік – $33,2 \pm 0,48$ років, маса тіла – $95,5 \pm 4,42$ кг).

Для детального контролю фізичних навантажень, управління тренувальним процесом на основі інтегрального розрахунку найбільш оптимального, але абсолютно безпечного режиму навантажень у процесі фізичної підготовки у збройних силах України, враховували досить велику кількість різних показників: маса тіла людини, маса спорядження (зброя, боєприпаси, бронежилет, каска та інше – загальною масою до 25 кг), тривалість м'язової напруги, рівень м'язової сили, кількість рухових дій, амплітуда руху та інше. Використання такої великої кількості показників дає змогу деталізовано оцінювати

не тільки адекватність того чи іншого режиму навантаження в під час виконання певної тренувальної вправи з урахуванням індивідуальних особливостей організму військовослужбовців, а також сприяє найбільш ефективному розвитку фізичних якостей і певних м'язових груп людини залежно від спрямованості процесу підготовки та поставлених задач.

Для визначення початкового рівня підготовки військовослужбовців і здатність їх організму подолати запропоновані нами фізичні навантаження під час виконання стандартних для нормативів ПФП [1, 2], контрольних вправ, результативне виконання яких, особливо в повній бойовій екіпіровці, дасть можливість підвищити рівень фізичної підготовки в мирний час і сприятиме ефективному вирішенню поставлених завдань під час бойових дій. Були розроблені комплексні математичні формули, що можуть досить об'єктивно визначити первинні фізичні можливості обстеженого контингенту і розробити для нього оптимальний режим навантажень, які дають змогу досягти максимальних адаптаційних змін за короткий час без загрози погіршенню здоров'я. У обстежених спочатку визначали вихідні значення таких показників: маса тіла, маса тіла в повній бойовій екіпіровці (маса спорядження близько 25 кг), максимальна кількість повторень при виконанні контрольних вправ ПФП (спрямованих на розвиток сили і силової витривалості) в повній бойовій екіпіровці при стандартній техніці виконання, час тривалості м'язової напруги при виконанні одного повторення, загальна тривалість виконання контрольної вправи, амплітуда руху [5].

Коефіцієнт зовнішнього опору, значення якого повною мірою відображає режим фізичного навантаження, визначається за формулою:

$$Ra = 1 - \left(\frac{N \times T}{M_T + M_z} \times Q \right),$$

де: N – максимальна кількість повторень, які можна виконати під час контрольної вправи до повної м'язової втоми;

M_T – маса тіла військовослужбовця (кг);

Me – маса повної бойової екіпіровки (кг);
T – тривалість виконання одного повторення (с);

Q – коефіцієнт амплітуди руху (ум.од.);

I – максимальні межі адекватності фізичних навантажень функціональним можливостям організму людини.

Індекс фізичного (тренувального) навантаження, значення якого відображає критичні параметри фізичних можливостей військовослужбовців в умовах заданого режиму навантажень, визначається за формулою:

$$ITNA = \frac{N \times Ra}{t} \times \frac{T}{Q},$$

де: Ra – коефіцієнт зовнішнього опору (ум.од.);

N – максимальна кількість повторень, які можливо виконати під час

контрольної вправи до повного м'язового стомлення;

t – загальна тривалість виконання контрольної вправи (с);

T – тривалість виконання одного повторення (с);

Q – коефіцієнт амплітуди руху (ум.од.).

Визначення концентрації кортизолу та лактатдегідрогенази (ЛДГ) у сироватці крові проводили в два етапи з інтервалом в одну годину: 1) в умовах виконання фізичних вправ з власною масою тіла без урахування маси комплексу повної бойової екіпіровки; 2) в умовах виконання фізичних вправ в повній бойовій екіпіровці. На кожному етапі було проведено по два забори крові: до навантаження (у стані спокою) і відразу після закінчення виконання контрольної фізичної вправи. Зразки крові з вени учасників досліджень відбирала медсестра під контролем лікаря з дотриманням усіх необхідних норм стерильності та вимог безпеки. Концентрацію кортизолу визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноклональних антитіл, концентрацію ЛДГ – кінетичним методом на обладнанні фірми «Hightechnologyinc» (США) в умовах сертифікованої медичної лабораторії[6].

Матеріали досліджень піддавали статистичній обробці з використанням пакету програм «Statistica» в системі «Microsoft Excel-2010», орієнтуючись на фізіологічно допустиму норму концентрації кортизолу в сироватці крові здорових людей в межах 150-660 нмоль/л і ЛДГ – 195-462 од/л [7]. Були використані методи параметричної статистики, які визначають середнє арифметичне, стандартну помилку середнього. Рівень вірогідності визначали за допомогою парного двохвибіркового t-тесту для середніх.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На основі аналізу результатів первинного тестування рівня фізичних можливостей організму обстежуваного контингенту, в умовах виконання контрольних вправ, було встановлено, що всього лише 15% (60 осіб) учасників експерименту віком від 22 до 35 років змогли продемонструвати такі показники фізичної підготовки, які відповідають нормам для військовослужбовців цих вікових груп [1, 2]. Рівень фізичної підготовки у більшості (85%) обстежених нами чоловіків віком, які були призвані до лав збройних сил України, не відповідає мінімальним вимогам, що вкрай необхідні для виконання бойових завдань.

Для визначення оптимальних і водночас безпечних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців, які б дали змогу максимально їм підготуватися до виконання завдань в умовах, подібних до бойових дій, було проведено низку досліджень. У табл. 1 представлені результати контрольного тестування фізичної підготовки представників усіх трьох вікових груп (по 20 чоловік у кожній) при виконанні силових вправ (підтягування на перекладині, згинання та розгинання рук в упорі на брусах) в різних умовах: без урахування маси комплексу повної бойової екіпіровки і в повній бойовій екіпіровці. Виявлено, що найбільш високий рівень фізичної підготовки, згідно з нормами ПФП, був у обстежених першої групи. При цьому

Табл. 1. Максимальна кількість повторень, які виконували учасники груп під час контрольних вправ до повного м'язового стомлення ($M \pm m$, $n=20$)

Контрольні фізичні вправи	Етапи контролю			
	Виконання фізичних вправ з власною масою тіла		Виконання фізичних вправ в повній бойовій екіпіровці	
	Норма	Результат	Норма	Результат
Підтягування на перекладині				
група 1	15-10	12,65 \pm 0,71	—	2,40 \pm 0,34
група 2	14-10	9,15 \pm 0,43	—	1,00 \pm 0,21
група 3	13-9	7,10 \pm 0,28	—	0,70 \pm 0,17
Згинання та розгинання рук в упорі на брусах				
група 1	18-14	17,05 \pm 0,60	—	4,85 \pm 0,61
група 2	16-12	13,05 \pm 0,30	—	2,00 \pm 0,38
група 3	14-10	10,90 \pm 0,20	—	1,05 \pm 0,26

результати у чоловіків другої та третьої груп свідчать про те, що з віком, незважаючи на зниження показників нормативної бази, велика кількість обстежуваних (близько 65,5%) не в змозі виконати необхідну кількість повторень у контрольних вправах.

Переважно лише військовослужбовці першої групи (табл. 2) здатні виконувати м'язову діяльність в умовах режиму високої інтенсивності і малого обсягу роботи ($Ra=0,71$ ум.од.), який є найбільш безпечним і одночасно ефективним [8]. Систематичне застосування цього режиму в процесі спеціальної фізичної підготовки дає змогу досягти максимальних адаптаційних змін в організмі людини, незалежно від роду їх діяльності, за найбільш короткий

час при низькому рівні загрози перевтоми [9]. Одночасно, як показали результати контрольного тестування рівня фізичної підготовки, представники другої і третьої групи в таких умовах рухової діяльності зможуть використовувати лише режими навантаження дуже високої інтенсивності ($Ra > 0,78$ ум.од.), що при тривалому застосуванні, ймовірно, приведе до розвитку перетренованості і прояву патологічних змін в їх організмі. При цьому, індекс тренувального навантаження не перевищував критичних меж ($ITNA < 1$) серед представників всіх трьох груп. Це вказує на адекватність використовуваних фізичних навантажень в такому режимі роботи функціональним можливостям організму в умовах

Табл. 2. Параметри режимів силових навантажень, які використовували учасники груп в процесі досліджень ($M \pm m$, $n=20$)

Показники навантаження	Умови виконання фізичних вправ	
	Без урахування маси комплексу повної бойової екіпіровки	В умовах використання комплексу повної бойової екіпіровки
Коефіцієнт величини зовнішнього опору, м.д. (Ra)		
група 1	0,74 \pm 0,16	0,94 \pm 0,14
група 2	0,78 \pm 0,17	0,97 \pm 0,23
група 3	0,83 \pm 0,19	0,98 \pm 0,24
Індекс фізичного навантаження, м.д. ($ITNA$)		
група 1	0,76 \pm 0,21	1,04 \pm 0,17
група 2	0,86 \pm 0,16	1,07 \pm 0,22
група 3	0,92 \pm 0,15	1,08 \pm 0,21

короткочасної роботи (див. табл. 2).

У разі застосування комплексу повної бойової екіпіровки військовослужбовцями всіх трьох груп під час виконання контрольних вправ спостерігалися абсолютно протилежні результати порівняно з показниками на початку експерименту (див. табл. 1). Так, рівень фізичних навантажень і, відповідно, режим роботи не адекватні можливостям організму обстеженого контингенту ($ITNA > 1$; див. табл. 2). Тривале застосування цього режиму ($Ra = 0,94-0,98$ ум.од.) в процесі підготовки сприятиме лише перевантаженню, стомленню та погіршенню фізичного здоров'я, а також можливому зниженню рівня фізичної підготовки військовослужбовців.

У табл. 3 представлено результати контролю концентрації гормону кортизолу та ферменту ЛДГ у сироватці крові військовослужбовців у стані спокою (до навантаження) та після виконання контрольних вправ з власною масою тіла та під час використання в процесі рухової активності додаткової маси комплексу бойової екіпіровки. На початку експерименту після виконання контрольних вправ з власною масою тіла без комплексу бойової екіпіровки концентрація кортизолу в сироватці крові обстежених всіх трьох груп підвищувалася на 11,2% ($P < 0,05$), але не виходила за межі фізіологічної норми. У

свою чергу виявлено незначну тенденцію підвищення концентрації ЛДГ, особливо серед учасників першої групи, що вказує на адекватність фізичних навантажень функціональним можливостям їх організму (див. табл. 3).

Після виконання фізичних вправ в умовах застосування комплексу повної бойової екіпіровки військовослужбовцями всіх трьох груп спостерігається істотне підвищення концентрації кортизолу на 73,3% ($P < 0,05$) та ЛДГ на 21,6% ($P < 0,05$) порівняно зі станом спокою. У чоловіків другої і третьої груп концентрація кортизолу практично сягнула верхньої критичної межі (див. табл. 3). Це вказує на неадекватність запропонованих навантажень, в умовах виконання контрольних вправ у повній бойовій екіпіровці, можливостям їх організму, що й сприяло виникненню досить великого стресу. Представлений факт свідчить про те, що тривале виконання такого фізичного навантаження негативно позначатиметься не тільки на ефективності процесів адаптації, яка необхідна для виконання завдань в умовах наближених до бойових дій, але і на рівень їхнього фізичного здоров'я [10, 11]. Разом з тим концентрація ЛДГ практично сягнула верхньої критичної межі (табл. 3). Це вказує на передчасний початок процесів гліколізу викликаних режимом роботи дуже

Табл. 3. Концентрація кортизолу та лактатдегідрогенази у сироватці крові учасників всіх груп в процесі досліджень ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Етапи контролю			
	В умовах виконання фізичних вправ з власною масою тіла		В умовах виконання фізичних вправ в повній бойовій екіпіровці	
	До навантаження	Після навантаження	До навантаження	Після навантаження
Кортизол, нмоль/л				
група 1	339,83±18,50	377,13±10,98*	324,56±11,97	550,35±21,18*
група 2	347,22±14,96	398,83±12,81*	354,52±16,21	651,95±23,98*
група 3	365,03±11,74	396,56±11,45*	369,11±15,58	648,77±26,37*
Лактатдегідрогеназа, од/л				
група 1	368,31±4,89	376,65±11,09*	365,81±14,95	425,73±11,78*
група 2	346,52±9,78	368,74±10,36*	352,76±14,21	440,23±12,92*
група 3	352,47±11,23	374,56±11,31*	363,42±12,78	449,87±15,21*

* $P < 0,05$ порівняно зі станом спокою (до навантаження)

високої інтенсивності ($Ra=0,98$ ум.од.), і, ймовірно, свідчить про різке підвищення енерговитрат при тривалому використанні такого характеру роботи в процесі фізичної підготовки військовослужбовців [12, 13].

Таким чином, незважаючи на можливе досить перспективне застосування найбільш безпечного і ефективного режиму навантаження ($Ra=0,71$ ум.од.), для підвищення рівня фізичної підготовки військовослужбовців у найкоротші терміни в мирний час (з мінімальним набором бойової екіпіровки), проблемним питанням є, в більшості випадків, повна невідповідність досягнутого рівня фізичного розвитку організму в процесі стандартної базової системи підготовки тим вимогам і завданням, які ставляться в умовах безпосередніх бойових дій. Так, вирішення цієї проблеми полягає в тому, що б при побудові оптимальних режимів фізичного навантаження для мобілізованих враховувалися не тільки їх морфометричні показники, стан здоров'я, вік, спрямованість фізичної підготовки залежно від спеціалізації, а істотна різниця між первинним рівнем їх фізичного розвитку та тими навантаженнями, які їм необхідно буде подолати в умовах бойових дій.

Використання розробленого нами інтегрального методу визначення безпечних режимів фізичного навантаження для військовослужбовців дає змогу оптимізувати механізми пошуку найбільш адекватних параметрів обсягу та інтенсивності навантажень, а також прискорити в найкоротші терміни адаптаційні зміни в їх організмі для підвищення максимальної результативності цього етапу підготовки. Одночасно в найкоротші терміни і при мінімальних витратах визначити первинний рівень фізичної підготовки військовослужбовців і критичні пороги навантаження для їх організму в різних умовах рухової активності, а також проводити відбір контингенту для різних військових підрозділів.

На основі отриманих результатів можна визначити не тільки рівень фізичного розвит-

ку, а й причини за якими мобілізовані люди не можуть виконувати ті чи інші фізичні вправи ПФП. До них переважно відносяться: низький рівень функціональних можливостей (недостатній розвиток серцево-судинної системи, низький рівень адаптації організму до різних видів фізичного навантаження, низький рівень енергозабезпечення рухової активності); слабо розвинені м'язові групи, необхідні для виконання контрольних вправ.

Таким чином, визначивши первинний рівень фізичної підготовки мобілізованого контингенту і встановивши причини, які не дають змоги результативно виконати контрольні вправи ПФП, використання розроблених нами режимів тренувальних навантажень можуть не тільки прискорити розвиток фізичних якостей (швидкісний і статичної сили, силової витривалості), а і підвищити рівень адаптації їх організму до заданих умов рухової діяльності незалежно від індивідуальних функціональних можливостей за досить короткий проміжок часу (близько 3 міс підготовки) при мінімальному обсязі виконаній роботі, а найголовніше – без перевантажень і втрати фізичного здоров'я.

А.А. Чернозуб, Ю.А. Радченко

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ БЕЗОПАСНЫХ РЕЖИМОВ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ ДЛЯ ВОЕННО- СЛУЖАЩИХ ПРИ ПОДГОТОВКЕ И В УСЛОВИЯХ, ПРИБЛИЖЕННЫХ К БОЕВЫМ ДЕЙСТВИЯМ

Изучали необходимость и целесообразность применения интегрального метода для определения наиболее эффективных, но в тоже время безопасных режимов нагрузки для организма военнослужащих. Установлено, что несмотря на достаточно перспективное применение предложенного нами режима нагрузки высокой интенсивности ($Ra=0,71$ усл.ед.) для повышения уровня физической подготовки военнослужащих в кратчайшие сроки в мирное время (с минимальным набором боевой экипировки), проблемным вопросом является то, что в большинстве случаев наблюдается полное несоответствие достигнутой степени физического развития организма военнослужащих тем требованиям и задачам, которые ставятся в условиях непосредственных боевых действий. Решение этой

проблема заключается в том, что бы при построение оптимальных режимов физической нагрузки для военнослужащих учитывались не только их морфометрические показатели, состояние здоровья, возраст, направленность физической подготовки в зависимости от специализации, а также существенная разница между первичным уровнем их физического развития и теми нагрузками, которые им необходимо будет преодолеть в условиях боевых действий. Использование разработанного нами интегрального метода определения безопасных режимов физической нагрузки для военнослужащих позволяет оптимизировать механизм поиска наиболее адекватных параметров объёма и интенсивности нагрузок, а также ускорить в кратчайшие сроки адаптационные изменения в их организме для повышения максимальной результативности на данном этапе подготовки.

Ключевые слова: интегральный метод определения величины нагрузки; режимы физических нагрузок; адаптационные реакции; кортизол; лактатдегидрогеназа; военнослужащие.

A. Chernozub, Y. Radchenko

DETERMINATION OF THE OPTIMAL SAFE MODE OF PHYSICAL ACTIVITY FOR THE MILITARY SERVANTS UNDER CONDITIONS CLOSE TO FIGHTING

The paper presents the results of research, allowing to establish the need for and feasibility of an integrated method to determine the most effective but at the same time safe modes of load to the body troops. We found that despite the rather promising application of our proposed mode of load of high intensity ($R_a = 0,71$) to increase the level of physical military training as soon as possible in time of peace (with a minimum set of combat equipment), problematic issue is that in most cases there is a complete mismatch achieved in the degree of physical development of the body of military requirements and the challenges posed in terms of direct hostilities. Using the integral method developed by us we determine the safest modes of exercise for the military servants to optimize the most appropriate parameters of volume and intensity of the load, and speed up the adaptive changes in their body to enhance maximum performance at this stage of preparation.

Key words: integral method for determining the load; exercise regimes; adaptive response; the military.

Chernomorsk State University named after P.Mogila, Nikolayev.

REFERENCES

1. Nastanova z fizichnoyi pidgotovki u Zbrojnikh Silakh Ukrayini. Guidelines for physical training in the Armed Forces of Ukraine (NFP-1997). Kiev. Ministry of Defence of Ukraine. 1997; 129. [Russian].
2. Nastanova z fizichnoyipidgotovki u Zbrojnikh Silakh Ukrayini. Guidelines for physical training in the Armed Forces of Ukraine (NFP-2009). Kiev. Ministry of Defence of Ukraine. 1997; 231. [Russian].
3. Glazunov S. I. Perspektivi udoskonalennia sistemi kontroliu fizichnoyi pidgotovlenosti vijs'kovosluzhbovciv mekhanizovanikh pidrozdiliv Sukhoputnikh vijs'k. Fiz Pidgotovka Vijs'kovosluzhbovciv. 2001; 1: 16-18. [Russian].
4. Leont'ev V.P. Teoriia i metodika fizichnogo vikhovannia i sportu. Theory and Methods Physical Education and Sport. 1999; 1: 76-81. [Russian].
5. Chernozub AA. Method of determining the index of training load in athleticism. Pat. UA 76705 U, MPK A61B 5/22 (2006.01), № u201208376. [Russian].
6. Painter P. C. Reference information for the clinical laboratory. Philadelphia. 1999; 1799.
7. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Lab Techniques in Biochem and Mol Biology. 1985; 15: 674.
8. Chernozub A. Peculiarities of cortisol level changes in the blood of athletes and untrained boys in response to heavy power training loads. Eur International J Sci and Technol. 2013; 2 (9):52-57.
9. Chernozub A. Dynamics of the condition of autonomic heart rhythm regulation in athletic trainings. Eur International J Sci and Technol. 2013; 2(6):17-22.
10. Seynnes OR, Kamandulis S, Kairaitis R. Effect of androgenic-anabolic steroids and heavy strength training on patellar tendon morphological and mechanical properties. J Appl Physiol. 2013; 115 (1):84-9.
11. Wahl P, Mathes S, Köhler S, Mester J. Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different endurance training protocols. Horm Metab Res. 2013; 45 (11): 827-33.
12. Goto K, Ishii N, Kizuka R, Kraemer R. Hormonal and metabolic responses to slow movement resistance exercise with different durations of concentric and eccentric actions. Eur J Appl Physiol. 2009; 106 (5): P. 731-9.
13. Kraemer RR, Hollander DB, Reeves GV, Ramadan ZG. Similar hormonal responses to concentric and eccentric muscle actions using relative loading. Eur J Appl Physiol. 2006; 96 (5): 551-7.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.08.2015*

Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу

Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець¹, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, О.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, М.Е. Дзержинський, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; ¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: gtolstanova@gmail.com

Вивчено вплив 5-добового введення антибіотиків групи цефалоспоринов - цефтріаксону (50 мг/кг) та групи макролідів - азитроміцину (15 мг/кг) на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів-самців лінії Вістар (180-250 г) методом перфузії ізольованої ділянки in situ. Дія азитроміцину зумовлювала в 2,4 раза ($P < 0,001$) підвищення, а цефтріаксону в 1,9 раза ($P < 0,001$) зменшення всмоктування води. Ці зміни не були пов'язані зі зрушеннями в кількісному та якісному складі просвітної та пристінкової мікробіоти кишечника. Збільшення поглинання води за дії азитроміцину підвищувало експресію протеїну водного каналу - AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, тоді як зменшення всмоктування води за дії цефтріаксону не викликало змін, але супроводжувалося прозапальними процесами та дегрануляцією тучних клітин у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Ключові слова: товста кишка; цефтріаксон; азитроміцин; діарея; AQP8; тучні клітини.

ВСТУП

Одним з найчастіших симптомів, пов'язаних з прийомом антибіотиків, є розвиток діареї. Антибіотикасоційована діарея (ААД) – це як мінімум три і більше епізодів неоформленого випорожнення, які розвиваються на тлі застосування антибактеріальних препаратів чи впродовж 4-8 тиж після їх відміни. Частота розвитку такого стану становить 5 - 30% [1]. Згідно з сучасною теорією етіопатогенезу ААД, не більше ніж 20% випадків асоційовані з інфікуванням *Clostridium difficile* (*C. difficile*) [2]. Патогенез ідіопатичної ААД (не виявлений конкретний збудник діареї) може залежати від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Так, їх розвиток пов'язують з посиленням моторики кишечника (макроліди з 14-членим лактоном кільцем); підвищенням внутрішньопросвітнього осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (цефоперазон, цефіксим); підвищенням активності секре-

торної функції кишечника у відповідь на порушення декон'югації жовчних кислот чи змін вмісту коротколанцюгових жирних кислот, при зрушеннях у складі та метаболічній активності кишкової мікробіоти (характерно для антибіотиків широкого спектра дії: флуороквінолони, цефалоспоринони, кліндаміцин тощо) [3]. Одним із механізмів діареї за дії різних груп лікарських препаратів є прямий вплив на всмоктувальну функцію епітелію кишечника, так бісакодил - чи мізопростолвикликана діарея зумовлені активацією аденілатциклази ентероцитів з наступною стимуляцією активної секреції Cl^- , HCO_3^- , пасивного відтоку Na^+ , K^+ та води. Блокада АТФази, дігоксином, ауранофіном, колхіцином чи олсалазіном, викликає діарею через пригнічення активності Na^+ , K^+ -насосу [4]. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД, з огляду на механізм дії різних груп антибіотиків, не досліджувалося, хоча існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію [5].

© Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець¹, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, О.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, М.Е. Дзержинський, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова

Антибіотики широкого спектра дії ряду макролідів та цефалоспоринів є найбільш вживаними в клінічній практиці. Цефалоспориноу властивий бактерицидний ефект, а макролідам – бактеріостатичний [6]. Макроліди мають макроциклічне лактонне кільце (макролідне кільце), яке з'єднане з одним або кількома вуглеводневими залишками. Залежно від числа атомів вуглецю, які входять до складу лактонного кільця, макроліди поділяться на 12-, 14-, 15-, 16- та 17-членні. Препарати групи макролідів порушують синтез білка, що призводить до пригнічення розмноження і зниження вірулентності мікробних клітин, через зворотне зв'язування з каталітичним пептидил-трансферазним центром 50S-субодиниці рибосом [7].

Цефалоспорино – ряд природних і напівсинтетичних антибіотиків, які являють собою біциклічні з'єднання, що складаються з β -лактамних і дигідротіазинового кілець. Обидва кільця утворюють 7-аміноцефалоспоринову кислоту – загальне ядро молекули цефалоспоринів. Останні пригнічують синтез клітинної стінки бактерій, що викликає загибель бактерій внаслідок осмотичного лізису [8]. За даними літератури, при призначенні цефалоспоринів діарея виникає у 4 - 9 % випадків, а макролідів – 2 – 5 % [9].

Метою нашої роботи був порівняльний аналіз впливу азитроміцину (антибіотик групи макролідів з 15-членним лактоном кільцем) і цефтріаксону (антибіотик групи цефалоспоринів III покоління) на потік води через епітелій товстої кишки щурів.

МЕТОДИКИ

Дослідні тварини та схема експерименту. Дослідження проводили на 58 білих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря. Експерименти проводили згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики,

міжнародним угодам, національному законодавству у цій галузі [10] та біоетичною комісією ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини були розподілені на 4 групи: I (n=12) і II (n=19) контрольні, яким вводили 1 мл і 0,1 мл води для ін'єкцій перорально і внутрішньом'язово відповідно; III дослідна група (n=13) – перорально отримували азитроміцин (“ПЛІВА” Хорватія) в дозі 15 мг/кг у вигляді водної суспензії з концентрацією діючої речовини 4 мг/мл; IV дослідна група (n=14) – щодобово внутрішньом'язово вводили цефтріаксон (“Артеріум”, ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна) в дозі 50 мг/кг протягом 5 діб. На 6-ту добу після початку експерименту (на початку експерименту вважали перший день введення антибіотика) у щурів визначали сумарний потік води через епітелій товстої кишки, методом перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ*. Частину щурів, у яких не перфузували товсту кишку, збирали фекалії для мікробіологічного дослідження, після цього їх умертвляли за допомогою цервікальної дислокації, видаляли товсту кишку. Два сантиметра товстої кишки на відстані 3 см від анального отвору занурювали в 10 %-й формалін для гісто- та цитохімічного аналізу, 1 см кишки брали на мікробіологічний посів, з решти кишки зішкрябували слизову та занурювали в рідкий азот для подальших молекулярно-біологічних досліджень.

Здійснювали щодобовий моніторинг клінічних параметрів стану щурів: за масою тіла, млявістю (0-3 бали: 0 - норма, 1 – помірно піднята шерсть, 2 – тварина брудна, зменшення спонтанних рухів, 3 – тварина майже не рухається, не реагує на інших тварин), діареєю (визначали за м'якістю випорожнення).

Сумарний транспорт води через епітелій товстої кишки щурів досліджували методом перфузії ізольованої ділянки товстої кишки *in situ* [11]. Тварин наркотизували уретаном (“Sigma Chemical Co”, США), з розрахунку

1,15 г/кг (внутрішньоочеревинно). Сталу температуру тіла щурів (37°C) підтримували за допомогою грілки. Для попередження респіраторної недостатності виконували трахеотомію. Після цього відкривали черевну порожнину (лапаротомія), підтягували товсту кишку, накладали першу лігатуру на межі переходу сліпої у висхідну частину ободової кишки та робили надріз кишки і вводили привідний катетер для подачі перфузійного розчину. Через 8-10 см дистальніше від першої лігатури, накладали другу. Сегмент товстої кишки промивали теплим фізіологічним розчином та вводили вивідний катетер для збору відтікаючого (аспірованого) розчину, який фіксували другою лігатурою. Після цього закривали черевну порожнину. Привідний катетер під'єднували до багатоканального перистальтичного насоса ("Minipuls 3", Gilson®), який подавав перфузійний розчин (37°C) з постійною швидкістю 0,18-0,2 мл/хв. Як перфузійний розчин використовували модифікований ізотонічний розчин Кребса-Хенселяйта (ммоль/л): NaCl – 117; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 24,8; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 5,5; pH 7,4, до якого додавали неабсорбований маркер феноловий червоний (20 мг/л).

Після 60-хвилинної перфузії (еквілібраційний період) відтікаючий розчин збирали впродовж 180 хв, через кожні 20 хв. Результати, отримані за кожний період, усереднювали. В кінці експерименту щурів умертвляли введенням летальної дози наркозу. Сегмент кишки, що перфузували, швидко видаляли, розрізали його в повздовжньому напрямку, обережно промокали фільтрувальним папером та висушували в термостаті (60°C, 20 год), для отримання сухої маси в грамах.

Для розрахунку сумарного потоку (J_{net}) води визначали концентрацію неабсорбованого маркера фенолового червоного колориметричним аналізом на спектрофотометрі (Synergy HT BioTek), при трьох довжинах хвиль 520, 560, 600 нм для визначення поправки на неспецифічну абсорбцію [12].

Сумарний потік води вираховували за формулою:

$$J_{\text{net води}} = \frac{v \cdot \left(1 - \frac{C_n}{C_a}\right)}{W}, \text{ де}$$

$J_{\text{net води}}$ – сумарний потік води (мкл/хв·г);

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв);

C_n і C_a – концентрація фенолового червоного в перфузійному і в аспірованому розчині відповідно;

W – суха маса сегменту кишки (г).

Позитивний результат свідчить про всмоктування, негативний – секрецію.

Імуноблотинг. Ізольовану ділянку товстої кишки подрібнювали за допомогою гомогенізатора "Dounce" ("Sigma", США) в лізуючому буфері (0,1% додецилсульфат натрію, 1% тритон x100, 2 мкмоль/л фенілметилсульфонілфлуорид, з додаванням коктейлю інгібіторів протеїназ 16,65 мл; ("Sigma", США) та фосфатаз (10 мкмоль/л ортованадат натрію; "Sigma", США). Концентрацію загального протеїну вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору «Bio-Rad для білкового аналізу» ("Bio-Rad", США). Розділення та визначення вмісту протеїнів (100 мкг загального протеїну/зразок) методом імуноблотингу проводили в 12%-м содіум додецилсульфатному поліакріламідному гелі з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану "Hybond-ECL" ("Amersham Biosciences", США), згідно з стандартним протоколом фірми «Bio-Rad». Антитіла до AQP8 (1:500; "Sigma-Aldrich", Німеччина), використовували для визначення вмісту відповідних протеїнів, з наступною інкубацією з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину (1:10000, "Santa-Cruz Biotech.", США). Візуалізацію імуноблоту проводили ентерохромофіноподібним реагентом (H₂O – 9 мл, тріс для 1М ентерохромофіноподібного-реагента – 10 мл, 68 ммоль кислоти кумарі – 225 мкл (-20 °C), 1,2 ммоль люмінол – 500 мкл (-20 °C) ("Amersham Biosciences", США). Результати, не менше двох різних експериментів, аналізували за допомогою програми Phoretix1D.

Морфометричний аналіз гістологічних зрізів товстої кишки. Ділянки товстої кишки довжиною 2 см, які видаляли на відстані 3 см від анального отвору, фіксували у 10%-му формаліні, заливали у парафін за загальноприйнятою методикою, та виготовляли поперечні зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікротомі (“Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome”). Зрізи забарвлювали гематоксиліном з дофарбуванням еозином та аналізували під мікроскопом для виявлення морфологічних змін. Для морфометричного аналізу виготовляли цифрові мікрофотографії при збільшенні у 100 та 400 разів. Використовували мікроскоп *Olympus System Microscope Model BX41* та фотокамеру *Olympus Digital Camera C5050 Zoom* (Японія). За допомогою комп’ютерної програми *Image J* вимірювали товщину слизової оболонки, глибину крипт, висоту епітеліоцитів та площу поперечного перерізу їх ядер, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин. Також підраховували кількість келихоподібних клітин.

Цитохімічне визначення тучних клітин. Зрізи товстої кишки забарвлювали за допомогою набору для цитохімічної ідентифікації тучних клітин толуїдиновим синім (ТОВ «БіоВитрум», Росія). Забарвлення проводили згідно з протоколом фірми-виробника. В тучних клітинах підраховували кількість гранул на одну клітину під іммерсійним об’єктивом мікроскопа (“*Olympus System Microscope Model BX41*”). У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

Мікробіологічний аналіз вмісту кишечника. Для мікробіологічного аналізу збирали 1 г фекалій та ділянки слизової оболонки (1 см²) товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору. Фекалії відбирали у пробірку з 9 мл фізіологічного розчину, після чого здійснювали поступове розведення з 10⁻¹ до 10⁻⁹ (фекальний біопат). Ділянки товстої кишки тричі промивали від хімусу у фізіологічному розчині, після чого подрібнювали у гомогенізаторі Поттера та робили розведення з 10⁻¹ по 10⁻⁵ у фізіологічному розчині (при-

стінковий біопат). Експериментально було адаптовано основні розведення для засіву на відповідні елективно-диференційні середовища (“HiMedia Laboratories Pvt.Ltd”, Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-метаболічними показниками. Вміст бактерій представляли як кількість колонієутворюючих одиниць на 1 г фекалій чи колоніє утворюючих одиниць на 1 см² пристінкового біоптату товстої кишки.

Статистична обробка результатів. Аналіз результатів проводили з використанням програми *Statistica 8.0*. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для порівняння вибірок результатів сумарного потоку води використовували непараметричний метод – ранговий критерій груп U-тест Манна-Вітні. За умов нормального розподілу вибірок використовували критерій *t* Стьюдента. Середні значення сумарних потоків води представлені у вигляді медіани та процентиля [25;75], решта результатів – середнє значення \pm стандартна помилка середнього ($M \pm m$). Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

П’ятидобове введення азитроміцину не викликало значних змін у масі тіла та характері випорожнень щурів. Дослідження транспортної функції епітелію товстої кишки тварин на наступний день після останнього введення азитроміцину (6-ту добу експерименту) виявило збільшення всмоктування води в 2,4 раза ($P < 0,001$). Так, сумарний потік води через епітелій товстої кишки в контрольній групі щурів становив 17,87 [9,74; 37,54] мкл/хв-г, а після введення азитроміцину – 47,67 [40,72; 59,14] мкл/хв-г (рис.1).

Після ін’єкції цефтріаксону розвивалася діарея впродовж всього дослідного періоду. При цьому кількість тварин з рідким випо-

роженням пропорційно збільшувалася з подовженням терміну терапії: з 5% - на 2-й день до 11% - на 6-й день експерименту. Клінічні прояви діареї супроводжувалися зменшенням в 1,9 раза ($P < 0,001$) всмоктування води через епітелій товстої кишки, з 30,49 [16,33; 51,02] мкл/хв·г у контрольній групі до 15,73 [7,77; 30,46] мкл/хв·г у дослідній (див. рис. 1). Отже, азитроміцин та цефтріаксон мають різнонаправлений вплив на потік води через епітелій товстої кишки.

Вважається, що одним із механізмів розвитку діарейних явищ при антибіотикотерапії є порушення колонізаційної резистентності нормобіоти. Ми досліджували вплив введення азитроміцину та цефтріаксону на просвітну (фекальну) та пристінкову (як таку, що визначає цілістність епітеліального бар'єра) мікробіоту. Слід відмітити, що кількість облігатних цукролітичних біктерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у обох біоптатах залишалась у межах норми. Підвищення кількості *Propionibacterium* при введенні азитроміцину в просвітному біоптаті (з $\lg 5,5 \pm 0,2$ до $\lg 8,0 \pm 0,9$ КУО/г, $P < 0,05$) та цефтріаксону у пристінковому біоптаті (з $\lg 5,7 \pm 0,4$ до $\lg 7,7 \pm 0,3$ КУО/г, $P < 0,05$) може розглядатись як компенсаторний механізм у забезпеченні трофічного та енергетичного живлення епі-

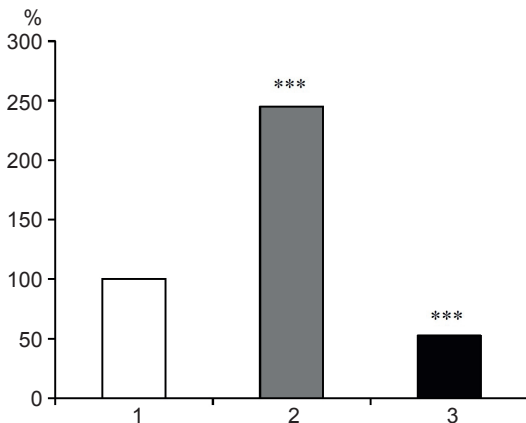


Рис.1. Сумарний потік води через епітелій товстої кишки щурів після 5- добового введення антибіотиків азитроміцину (15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово): 1 – контроль; 2 – азитроміцин; 3 – цефтріаксон.

*** $P < 0,001$ відносно показників у контрольній групі

теліоцитів. Збільшення числа представників роду *Clostridium* у пристінковому, при введенні азитроміцину, та фекальному біоптатах, при введенні цефтріаксону, можна розглядати з двох позицій: з одного боку вони відносяться до умовно-патогенної мікробіоти, а вид *C. difficile* вважається одним з факторів розвитку псевдомембранозного коліту [2]; з іншого боку – клостридії є найбільш активними продуцентами бутирату, який вважається найкращим енергетичним субстратом для клітин епітелію товстої кишки та відіграє суттєву роль в їх проліферації і диференціації [13]. Ми спостерігали підвищення кількості мікроорганізмів гемолітичної мікробіоти в фекаліях щурів після ін'єкції цефтріаксону (з $\lg 0 \pm 0$ до $\lg 5,0 \pm 0,2$ КУО/г, $P < 0,05$), при цьому на фоні азитроміцину цей показник становив $\lg 0 \pm 0$ КУО/г. У пристінковому біоптаті після терапії цефтріаксону чи азитроміцину не спостерігався ріст гемолітичної мікрофлори. Більше того, кількість інших умовно-патогенних мікроорганізмів залишалась у межах контрольних значень як у фекальному, так і пристінковому біоптатах. Ми припускаємо, що виявлена гемолітична мікрофлора є транзитornoю, і не може спричинювати стійку діарею. Таким чином, зміни всмоктувальної функції епітелію товстої кишки після терапії з азитроміцином чи цефтріаксоном не пов'язані з ростом умовно-патогенної мікрофлори.

Всмоктування води через епітелій товстої кишки відбувається двома шляхами: парацелюлярно (міжклітинний) та трансцелюлярно (за допомогою спеціальних, вбудованих в апікальну та базолатеральну мембрани каналів, що носять назву аквапорини – AQP) [14]. На сьогодні відомо 11 типів AQP-каналів, серед яких: 1, 3, 7, 10 та 11 експресуються в різних відділах травного тракту, тоді як AQP 8 є селективними для товстої кишки [15]. У дослідженнях на ізольованих колоноцитах показано, що блокада AQP 8-каналів маленькими інтерферуючими РНК значно пригнічує трансцелюлярний транспорт води

через апікальну мембрану поверхневих колоноцитів [16]. Зменшення їх експресії у слизовій оболонці товстої кишки пов'язані з розвитком діареї, викликаной інфільтрацією нейтрофілів на фоні терапії 5-флуороурацилом [17], за умов експериментальної харчової алергії у мишей [18], а також у пацієнтів з діареєю при синдромі подразненого кишечника [19]. Логічно припустити, що отримані зміни у потоці води можуть бути пов'язані з рівнем експресії AQP 8-каналів.

Нами було показано значну експресію протеїну AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів контрольної групи, що свідчить про визначну роль цих каналів в її функціонуванні. Щодобове введення щурам антибіотика групи макролідів азитроміцину зумовлювало підвищення експресії протеїну AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів у 10% ($P < 0,05$;

рис. 2). На відміну від азитроміцину, для цефтріаксону не чинило статистично вірогідних змін у рівні експресії протеїну AQP8.

Відомо, що антибіотики ряду макролідів використовуються для лікування хронічної діареї, при цьому встановлено, що позитивний ефект був пов'язаний з антизапальною дією на епітелій кишечника [20]. Нами вперше встановлено, що азитроміцин підвищує рівень експресії AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що супроводжувалося збільшенням всмоктування води і може бути додатковим фактором при призначенні антибіотиків цієї групи для лікування хронічної діареї. Описаний в літературі розвиток діареї на фоні терапії макролідами [9] не підтвердився в наших дослідженнях з азитроміцином. Ми припускаємо, що випадки діареї на фоні застосування макролідів пов'язані з їх проки-

Таблиця 1. Вплив азитроміцину (15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово) на мікробіоту товстої кишки щурів

Мікроорганізми	Азитроміцин				Цефтріаксон			
	Просвітна, lg КУО/г		Пристінкова, lg КУО/см ²		Просвітна, lg КУО/г		Пристінкова, lg КУО/см ²	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
<i>Bifidobacterium sp.</i>	8,6 ± 0,1	8,5 ± 0,5	5,7 ± 0,1	4,7 ± 0,9	8,7 ± 0,3	7,7 ± 0,8	5,3 ± 1,0	4,0 ± 0,3
<i>Lactobacillus sp.</i>	7,0 ± 0,4	6,7 ± 0,3	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,9	6,3 ± 0,4	5,0 ± 1,5	2,0 ± 0,9	2,4 ± 0,3
<i>Propionibacterium sp.</i>	5,5 ± 0,2	8,0 ± 0,9*	3,6 ± 0,1	4,5 ± 0,5	8,2 ± 0,9	7,1 ± 0,3	5,7 ± 0,4	7,7 ± 0,3*
<i>E.coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	6,8 ± 0,2	3,5 ± 1,5*	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,9	4,5 ± 0,5	2,1 ± 1,6*	1,7 ± 0,3	0 ± 0*
<i>E.coli</i> зі зниженими ферментативними властивостями	4,6 ± 0,4	4,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,5	4,7 ± 0,3	5,5 ± 0,4	0,7 ± 0,6	0 ± 0
Умовно-патогенні ентеробактерії	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	2,0 ± 0,2	4,0 ± 1,0*	1,4 ± 0,8	1,0 ± 0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3	0	3,5 ± 1,2	5,0 ± 0,8	0 ± 0	0 ± 0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,6 ± 0,3	6,0 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,5 ± 0,8	3,1 ± 1,2	0	0
<i>Clostridium sp.</i>	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,4	0	1,6 ± 0,1*	1,8 ± 0,6	4,1 ± 1,0*	0	0
<i>Candida sp</i> та інші гриби	0	0	0	0	1,8 ± 1,6	0	0	0
Гемолітична мікрофлора	2,8 ± 0,2	0	0	0	0	5,0 ± 0,2*	0	0

* $P < 0,05$ відносно значень у відповідній контрольній групі.

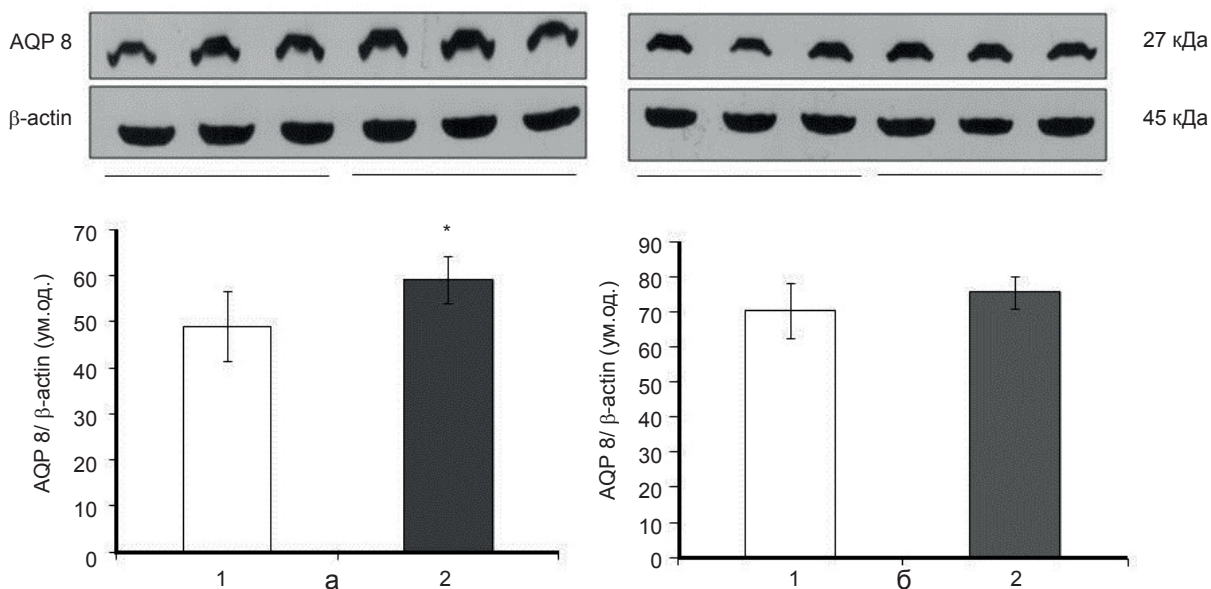


Рис. 2. Імуноблотинграма вмісту протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення антибіотиків азитроміцину (а; 15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксону (б; 50 мг/кг, внутрішньом'язово): 1 – контроль; 2 – дослід.
* $P < 0,05$ відносно показників у контрольній групі

нетичною дією, яка описана для антибіотиків з 15-членним лактонним кільцем [21].

На відміну від антибіотиків ряду макролідів, які використовуються для зменшення запалення та лікування алергічних реакцій, антибіотики ряду цефалоспоринів можуть мати побічну дію у вигляді алергічної реакції, що пов'язано з активацією тучних клітин і розвитком запалення [22]. Збільшення числа тучних клітин у слизовій оболонці товстої кишки може супроводжуватися розвитком діареї. Це доведено як на експериментальних моделях [23], так і в клінічних спостереженнях. Показано, що блокатори H1-гістамінових рецепторів і стабілізатори мембрани тучних клітин зменшували прояви діареї [24]. Відомості щодо впливу цефалоспоринів на стан тучних клітин слизової оболонки товстої кишки, як один із причинних факторів розвитку діареї, відсутні.

У нашій роботі 5-добове введення цефтріаксону викликало значні прозапальні зміни у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Спостерігався виражений набряк і десквамація епітелію. Дані морфометричного аналізу виявили впродовж збільшення в 1,6

раза товщини слизової оболонки ($P < 0,001$), в 1,4 раза – глибини кишкових крипт ($P < 0,001$) та площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів ($P < 0,001$). Також спостерігалось збільшення кількості келихоподібних клітин, але зменшення їх розміру (табл. 2).

Ми припустили, що прозапальні зміни за дії цефтріаксону і, пов'язана з ними діарея, є результатом активації тучних клітин слизової оболонки кишечника. Провели порівняльний аналіз рівня дегрануляції тучних клітин (показник активації клітин) після 5-добової терапії азитроміцином чи цефтріаксоном. Останій зумовлював зменшення кількості гранул тучних клітин в 2,4 раза ($P < 0,05$) порівнянно з контрольною групою тварин, тоді як азитроміцин не впливав на цей показник (рис. 3).

Отримані результати дозволяють припустити, що розвиток діареї за короткотривалої дії антибіотика групи цефалоспоринів цефтріаксону пов'язаний зі здатністю β-лактамних антибіотиків активувати тучні клітини [22]. Основним медіатором тучних клітин є гістамін, який є потужним стимулятором секреції через епітелій товстої кишки [25], що є підґрунтям

Таблиця 2. Морфометричний аналіз слизової оболонки товстої кишки щурів після 5-добової терапії цефтріаксоном (50 мг/кг, внутрішньом'язово)

Показники	Контроль	Цефтріаксон
Товщина слизової оболонки, мкм	138,03 ± 34,85	215,02 ± 34,85***
Глибина крипт, мкм	129,47 ± 18,5	179,42 ± 40,52***
Площа поперечного перерізу, мкм ²		
ядер ентероцитів,	14,85 ± 4,85	20,52 ± 5,0***
келихоподібних клітин	72,94 ± 31,62	62,08 ± 28,55*

* P < 0,05; *** P < 0,001 відносно значень у контрольній групі.

для подальшого тестування стабілізаторів тучних клітин чи антагоністів гістамінових рецепторів для запобігання розвитку діареї на фоні терапії цефалоспоринами.

ВИСНОВКИ

1. П'ятидобова терапія з антибіотиком групи макролідів азитроміцином чи групи цефалоспоринів цефтріаксоном викликала різнонаправлений ефект на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів. Азитроміцин зумовлював підвищення, а цефтріаксон зменшення всмоктування води.

2. Зміни в транспортній функції епітелію товстої кишки щурів після терапії з азитроміцином чи цефтріаксоном не були пов'язані зі змінами у кількісному та якісному складі просвітної та пристінкової мікробіоти.

3. Збільшення всмоктувальної здатності слизової оболонки товстої кишки щурів після

введення азитроміцину може бути пояснене підвищенням експресії протеїну AQP8, а зменшення після застосування цефтріаксону, може бути пояснене розвитком прозапальних змін та активацією тучних клітин в слизовій оболонці кишечника.

Робота була виконана за кошти гранта Президента України для обдарованої молоді «Розробка методів прогнозування та профілактики порушень в шлунково-кишковому тракті, викликаних антибактеріальною терапією» (договір № 12/2011) та бюджетної теми 01БФ-03601 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій».

Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, А.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, Н.Э. Дзержинський, Т.В. Береговая, А.Н. Толстанов

ТРАНСПОРТ ВОДЫ ЧЕРЕЗ ЭПИТЕЛИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИЗБИОЗУ

Изучено влияние 5-дневного введения антибиотиков группы цефалоспоринов - цефтриаксона (50 мг/кг) и группы макролидов - азитромицина (15 мг/кг) на транспорт воды через эпителий толстой кишки крыс-самцов линии Вистар (180-250 г) методом перфузии изолированного участка кишки *in vivo*. Действие азитромицина вызывало в 2,4 раза усиление, а цефтриаксон в 1,9 раз уменьшение всасывания воды. Эти изменения не были связаны с нарушениями в количественном и качественном составе фекальной и пристеночной микрофлоры толстой кишки. Усиление всасывания воды на фоне введения азитромицина сопровождалось повышением экспрессии белка водных каналов – AQP 8 в слизистой оболочке толстой кишки крыс, тогда как уменьшение всасывания воды на фоне введения цефтриаксона не вызывало изменений но сопровождалось провоспалительными изменениями

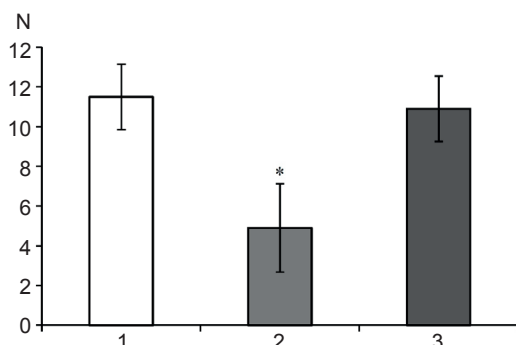


Рис.3. Рівень дегрануляції тучних клітин після 5-добової терапії азитроміцином (15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксоном (50 мг/кг, внутрішньом'язово).

1 – контроль; 2 – цефтріаксон; 3 – азитроміцин. * P < 0,05 відносно показників у контрольній групі

и дегрануляцией тучных клеток слизистой оболочки толстой кишки.

Ключевые слова: толстая кишка; цефтриаксон; азитромицин; диарея; AQP 8; тучные клетки.

T. Dovbynchuk, ¹L. Zakordonets, A. Putnikov, I. Vareniuk, O. Tiapko, N. Roslova, T. Sergiyshuk, O. Lynchak, M. Dzerzhynsky, T. Beregova, G. Tolstanova

NET WATER TRANSPORT VIA RAT COLON EPITELIUM UNDER THE EXPERIMENTAL DYSBIOSIS

The aim of the present study was to investigate the effect of cephalosporin antibiotic ceftriaxone (50 mg/kg, i/m) and macrolide antibiotic azithromycin (15 mg/kg, per.os.) on net water transport across rat colonic epithelium. Study was done on male Wistar rats (180-250 g). Azithromycin or ceftriaxone was injected daily for 5 days. Net water transport was evaluated on the 6th day by isolated colonic loop perfusion technique in vivo on anaesthetized rats. Treatment with azithromycin increased 2,4-fold the absorption of water, while ceftriaxone caused decrease 1,9-fold water absorption. The antibiotics treatment within five days didn't change the composition of the fecal and colonic parietal microbiota. Azithromycin-induced increase in water absorption was associated with upregulation of AQP 8 water channel expression ($P<0,05$) in colonic mucosa. Ceftriaxone treatment didn't change protein level of AQP 8 but induced pro-inflammatory changes in colonic mucosa structure and mast cells degranulation. We showed for the first time the opposite effects of macrolide and *cephalosporin* antibiotics on net water transport across rat colonic epithelium.

Key words: colon; ceftriaxone; azithromycin; diarrhea; AQP 8; mast cell.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv;

¹O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

REFERENCES

1. Beaugerie L, Flahault A, Barbut F. et al. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(7):905-12.
2. McFarland LV. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works. *J Med Microbiol.* 2005;54:101-11.
3. Kostyukevich OI. Antibiotic-associated diarrhea: myths and reality. *Rus J Med.* 2009;17(7):459-64. [Russian].
4. Ratnaike RN, Jones TE. Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the elderly. *Drugs Aging.* 1998 Sep;13(3):245-53.
5. Goldhill JM, Rose K, Percy WH. Effects of antibiotics on epithelial ion transport in the rabbit distal colon in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48(6):651-6.
6. Alekhine EK. How do antibiotics. *Soros Educ J.* 2000;6(4). [Russian].

7. Veselov AV, Kozlov RS. Azithromycin: Modern Clinical aspects of application. *Klin microbiol antimicrobial himioter.* 2006;8(6):18-32. [Russian].
8. Koritnyuk RS, Vaytenko GM, Dultseva OV. The properties and rational application of antibiotics and sulfanilamide drugs. *Metodichni rekomendatsii.* – K., 2007. – 40c. [Ukrainian].
9. Kostyukevich OI. Antibiotic-associated diarrhea: myths and reality. *Health Ukraine.* 2010;18(247):56-57. [Ukrainian].
10. The first national congress on bioethics. *Ezhenedelnyk PHARMACY.* 2001;308(37) (from 24.09.2001). [Ukrainian].
11. Sladen GE, Harries JT. Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo. *Biochem Biophys Acta.* 1972;288(2):P.443-56.
12. Schedl HP, White D. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man. *Gut.* 1966;7(2):159-63.
13. Golovenko OV, Halyf IL, Golovenko AO. Role maslyanoy treatment of organic acids in functional diseases and colon. *Clinic. prospects gastroenterology, hepatology.* 2011;3:20-29. [Russian]
14. Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM. et al. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(3):647-63.
15. Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H. et al Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 1):C621-7.
16. Laforenza U, Cova E, Gastaldi G, Tritto S, Grazioli M, LaRusso NF. et al. Aquaporin-8 is involved in water transport in isolated superficial colonocytes from rat proximal colon. *J Nutr.* 2005;135(10):2329-36.
17. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Jo A, Hirosaki A, Takase K. et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. *Pharmacol Res.* 2014;87:71-9.
18. Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy. *Life Sci.* 2007;81(2):115-20.
19. Wang JP, Hou XH. Expression of aquaporin 8 in colonic epithelium with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Chin Med J.* 2007;120(4):313-6.
20. Blackwood RS, Tarara RP, Christie KL, Spinner A, Lerche NW. Effects of the macrolide drug tylosin on chronic diarrhea in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med.* 2008;58(1):81-7.
21. Costalos C, Gounaris A, Varhalama E, Kokori F, Alexiou N, Kolovou E. Erythromycin as a prokinetic agent in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(1):23-5.
22. Carson HJ, Cook BA. Mast cell tryptase in a case of anaphylaxis due to repeat antibiotic exposure. *Leg Med (Tokyo).* 2009;11(5):234-6.
23. Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi

- S, Sakamoto H. et al. Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. PLoS One. 2014 16; 9(1):e85888.
24. Baum CA, Bhatia P., Miner P.B. Jr. Increased colonic mucosal mast cells associated with severe watery diarrhea and microscopic colitis. Dig Dis Sci. 1989;34(9):1462-5.
25. Xu JD, Liu S, Wang W, Li LS, Li XF, Li Y et al. Emodin induces chloride secretion in rat distal colon through activation of mast cells and enteric neurons. Br J Pharmacol. 2012;165(1):197-207.

*Матеріал надійшов
до редакції 29.01.2015*

Склад шлункового соку та жовчі щурів при хронічному панкреатиті

З.А.Горенко, О.А.Грінченко, С.П.Весельський, В.М.Бабан

*Науково-дослідний інститут фізіології ім. академіка Петра Богача Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка;
e-mail: geminiz@ukr.net*

Особливості секреторних функцій шлунка та печінки щурів вивчали за умов експериментального хронічного панкреатиту, який моделювали за допомогою L-аргініну. Базальну шлункову секрецію досліджували в хронічних спробах методом аспірації на 10-ту та 63-тю доби, а підшлункову та печінкову – в гострих дослідках на 13-ту та 68-му доби після останнього введення L-аргініну. Встановлено, що характер секреторної відповіді органів травного тракту залежить від тривалості перебігу патології. На 10-ту добу функціональний стан секреторного апарату шлунка у щурів із хронічним панкреатитом характеризується посиленням кислотоутворення та секреторною недостатністю слизепродукуючих клітин. На 13-ту добу при збільшенні об'ємів панкреатичного та печінкового секретів відбувається перерозподіл у спектрі холатів, який свідчить про погіршення детергентних властивостей жовчі, пригнічення кислого шляху біосинтезу жовчних кислот та кон'югації холанових кислот з таурином. Через 2 міс перебігу патології загальний дефіцит амінокислот у шлунковому соку корелює з екзокринною недостатністю підшлункової залози. При цьому кислотність шлункового вмісту частково відновлюється, натомість рівень секреції білків та слизу продовжує знижуватись. У печінці пригнічуються процеси гідроксилювання, а також кон'югації жовчних кислот з амінокислотами, що свідчить про порушення синтетичної та детоксикаційної функцій залози.

Ключові слова: хронічний панкреатит; шлункова секреція; соляна кислота; жовчоутворення; жовчні кислоти.

ВСТУП

Хронічний панкреатит є одним з найбільш складних і тяжких захворювань травної системи. За даними МОЗ України у 2005-2010 рр. його питома вага серед усіх хвороб органів травлення становила 10,5 %, а смертність від панкреатитів та пухлин підшлункової залози посіла друге місце у гастроентерологічній клініці після цирозу печінки. Етіологічними чинниками виникнення панкреатиту можуть бути патології інших органів травлення: гіпота-анацидний гастрити, атрофічний дуоденіт, пептична виразка та дивертикули дванадцятипалої кишки. Такий зв'язок зумовлений порушенням гуморального шляху регуляції зовнішньосекреторної функції підшлункової залози [1,2].

Однією з основних причин високої летальності при панкреатитах (24-70 %) є виникнення панкреонекрозу, котрий в багатьох випадках розвивається через пізні звертання хворих за допомогою, помилки у діагнозі, недооцінку важкості стану пацієнта, обрання неадекватної тактики лікування [3]. Як наслідок у хворих виникають ускладнення у вигляді серцево-судинної, ниркової, респіраторної та печінкової недостатності, а також різноманітні дисфункції шлунка, зокрема набряк, ерозії, крововиливи та виразки слизової оболонки [4,5]. Такі ускладнення виникають внаслідок зміни співвідношення факторів захисту та агресії на користь останніх. Деякі автори відносять панкреатит до кислотозалежних захворювань. Підвищення

рН або ацидифікація дванадцятипалої кишки порушують гуморальні механізми регуляції зовнішньосекреторної функції підшлункової залози, що може бути одним з механізмів розвитку чи збільшення тяжкості перебігу хронічного панкреатиту [6]. Вже за першу добу розвитку панкреатиту в тканинах підшлункової залози, шлунка, печінки, легенів, селезінки та в циркулюючій крові різко зростає концентрація активних форм кисню, оксиду азоту та всіх медіаторів запалення, що пояснює механізми розвитку локальної, органної та системної запальної відповіді [7]. Через порталну вену та грудну лімфатичну протоку у системний кровотік потрапляє велика кількість ферментів, цитокінів та різноманітних метаболітів, котрі утворюються в підшлунковій залозі, позаочеревинній клітковині, черевній порожнині та в порожнині шлунково-кишкового тракту, що призводить до розвитку панкреатогенної токсинемії. Токсичні метаболіти, котрі циркулюють у крові, здійснюють прямий ушкоджувальний вплив на легені, нирки, печінку, ЦНС [4].

Розвиток печінкової недостатності при панкреатитах зумовлений тим, що печінка – перший і головний бар'єр для активованих панкреатичних та лізосомальних ферментів, а також токсичних продуктів розпаду паренхіми, котрі надходять по системі ворітної вени від підшлункової залози та із черевної порожнини. Розлади функцій печінки при панкреатиті пов'язані з розвитком глибоких мікроциркуляторних порушень, дегенеративно-дистрофічними змінами гепатоцитів та декомпенсацією внутрішніх механізмів детоксикації. В результаті порушення кровообігу, гіпоксії та морфологічних змін страждають жовчоутворювальна, білоксинтезувальна, детоксикаційна та інші функції печінки, що в свою чергу погіршує перебіг панкреатиту [5,8,9].

Зважаючи на актуальність вивчення механізмів формування та перебігу гострого і хронічного панкреатитів, а також особливостей функціонування інших органів і систем

при цих патологіях, різними авторами було запропоновано низку інвазивних та неінвазивних експериментальних моделей панкреатитів [7,10]. Однією з неінвазивних та легко відтворюваних моделей як гострого, так і хронічного панкреатиту є L-аргінінова, при якій не пошкоджуються острівці Лангерганса, тобто не страждає ендокринна функція підшлункової залози [11]. Механізми пошкоджувальної дії аргініну до кінця не з'ясовані, проте дані багатьох досліджень свідчать, що провідну роль у розвитку цієї патології відіграють радикали кисню [12] та оксид азоту [13], медіатори запалення [14], метаболіти арахідонової кислоти [15]. Окрім того, при гострому панкреатиті у щурів, викликаному застосуванням аргініну, характерною рисою є пошкодження цитоскелета панкреатичних ацинарних клітин, що супроводжується збільшенням вмісту білків теплового шоку, зокрема HSP27 та HSP70 [16].

Незважаючи на численні експериментальні роботи, а також дані клінічних спостережень щодо функціонального стану шлунка та печінки при хронічному панкреатиті, залишається відкритим питання про якісний склад шлункового соку та жовчі.

Метою нашої роботи було дослідити особливості секреторної функції шлунка та печінки щурів за умов хронічного панкреатиту.

МЕТОДИКА

Для створення моделі хронічного панкреатиту самцям білих нелінійних щурів вихідною масою 190 – 200 г робили ін'єкції 25%-го розчину L-аргініну («Sigma», США) внутрішньочеревинно за такою схемою: 1-ша доба – в дозі 5 г/кг; 4, 7, 10-та доба – 2,5 г/кг маси тіла [11]. Контрольним тваринам (n=12) у зазначені вище терміни інтраперитонеально вводили відповідні об'єми фізіологічного розчину. Секреторну функцію шлунка, підшлункової залози та печінки вивчали на одних і тих самих тваринах. Щури знаходилися на звичайному харчовому раціоні віварію, а за 18 – 24 год

перед дослідом вони підлягали харчовій депривації з вільним доступом до води. Згідно з даними літератури впродовж 10 діб ін'єкцій L-аргініну відбуваються зміни в структурі підшлункової залози [11], зокрема деструкція до 90 % ацинарних клітин, а через 2 міс нормальна панкреатична паренхіма заміщується жировою тканиною, діаметр протоків підшлункової залози зменшується [17]. Тому ми дослідили секреторну активність органів травлення на ранніх та пізніх етапах перебігу хронічного панкреатиту. Базальну шлункову секрецію досліджували в хронічних спробах методом аспірації на 10-ту ($n=12$) та 63-тю ($n=6$) доби, а підшлункову та печінкову – в гострих дослідках на 13-ту ($n=6$) та 68-му ($n=6$) доби після останнього введення L-аргініну. Шлунковий вміст отримували за допомогою тонкого металевго зонда, через який у шлунок тварин вводили 2 мл дистильованої води і відразу, не виймаючи зонда, відбирали вміст шлунка разом із введеною рідиною [18]. В аспіраті вимірювали концентрації соляної кислоти за допомогою титрування шлункового вмісту 0,01 Н розчином NaOH за наявності індикатора – 0,5%-го спиртового розчину диметиламіноазобензолу; загального білка спектрофотометрично [19]; гексозамінів та вільних амінокислот методом хроматографічного розподілу [20]. Через 3 – 5 діб після проведення аспірації тварин наркотизували уретаном (1 г/кг, внутрішньоочеревино), і після лапаротомії канюлювали проксимальний відділ загальної жовчної протоки однією поліетиленовою канюлею, через яку збирали жовч, а дистальний відділ – іншою канюлею, через яку отримували панкреатичний сік. Упродовж 3 год дослідку одночасно збирали 6 півгодинних порцій жовчі та три 60-хвилинні порції підшлункового соку, враховуючи їх об'єм у мікролітрах. У кожній відібраній пробі жовчі методом тонкошарової хроматографії та за допомогою денситометра ДО-1М визначали концентрації вільних (холева – ХК, хенодезоксихолева – ХДХК та дезоксихолева – ДХК) та кон'югованих (таурохолева – ТХК,

тауроходезоксихолева – ТХДХК, тауродезоксихолева – ТДХК, глікохолева – ГХК, глікохенодезоксихолева – ГХДХК та глікодезоксихолева – ГДХК) жовчних кислот [21].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.0 («StatSoft», США), використовуючи критерій t Стьюдента, оскільки вони мали нормальний розподіл при перевірці за тестом Шапіро – Вілка. Статистично значущими вважали відмінності між контролем і дослідом при $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших досліджень показали, що якість шлункового секрету під час перебігу хронічного панкреатиту змінюється. На 10-ту добу після останньої ін'єкції L-аргініну кислотність шлункового вмісту була вдвічі вищою ($P<0,05$), ніж у контролі (табл.1). Натомість концентрація загального білка зменшилася на 61,7 % ($P<0,05$). Отже, підвищення кислотності шлункового соку супроводжувалося зменшенням у ньому вмісту білкових компонентів. Шлунковий сік ставав агресивнішим внаслідок збільшення кількості соляної кислоти в ньому.

На 63-тю добу перебігу патології кислотність шлункового вмісту зменшувалася щодо такої на 10-ту добу, наближаючись до контрольних значень (див. табл.1). Проте тенденція до її підвищення щодо контролю зберігалась і через 2 міс перебігу панкреатиту. При цьому концентрація загального білка в секреті на 63-тю добу продовжувала знижуватись і була на 68,2 % меншою, ніж у контролі.

Як на 10-ту, так і на 63-тю добу перебігу хронічного панкреатиту концентрація гексозамінів у шлунковому соку була меншою, ніж у контролі на 23,8 % ($P<0,001$) і 32,2 % ($P<0,001$) відповідно (див. табл.1). Це свідчить про пригнічення секреції слизу, який виконує захисну і бар'єрну функції, клітинами слизової оболонки шлунка. Отже, вона

Таблиця 1. Концентрація окремих складових шлункового вмісту голодних щурів упродовж перебігу експериментального хронічного панкреатиту ($M \pm m$)

Складові шлункового соку	Контроль (n=12)	Панкреатит	
		10-та доба (n=12)	63-тя доба (n=6)
Соляна кислота, ммоль/л	2,09±0,32	4,18±1,04*	2,8±1,13
Загальний білок, мкг/мл	38,69±7,88	14,82±2,5*	12,29±2,74*
Гексозаміни, мг/дл	4,28±0,17	3,26±0,17***	2,9±0,16***
Вільні амінокислоти, мг/дл	4,57±0,07	4,4±0,15	3,91±0,08**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ щодо контролю.

стає більш вразливою до дії соляної кислоти та інших пошкоджувальних факторів. Наші результати узгоджуються з відомостями про те, що у пацієнтів із хронічним панкреатитом знижується функціональна активність поверхнево-епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка [1]. Проте у щурів з експериментальним панкреатитом кислотність шлункового вмісту підвищувалася, тоді як у хворих на хронічний панкреатит спостерігався різний рівень секреції соляної кислоти та ферментів. Так, збережена або підвищена функціональна активність парієтальних клітин супроводжувалася секрецією ферментів на рівні контролю, тоді як у пацієнтів із гіпоацидним станом концентрація ферментів у соку була істотно зменшена [1].

Оскільки останнім часом зміни вмісту вільних амінокислот у біорідинах при хронічному панкреатиті пов'язують із розвитком системного запалення та кишкової мальабсорбції, а самі амінокислоти є регуляторами шлункової секреції [22], ми дослідили зміни вмісту вільних амінокислот у шлунковому соку за умов перебігу хронічного панкреатиту. З'ясовано, що їх сумарна концентрація зменшувалася після 2 міс перебігу патології на 14,4 % ($P < 0,01$). Ці результати відповідають клінічним даним [23], згідно з якими індивідуальні концентрації більшості вільних амінокислот, зокрема серину, гістидину, аргініну, треоніну, тирозину, валіну, метіоніну, цистину, лейцину, ізолейцину та аспартату в крові знижувались. Отже, за умов хронічного панкреатиту у шлунковому соку знижується вміст вільних амінокислот, що може впливати

на секрецію його основних компонентів, на стан слизової оболонки шлунка та підшлункової залози.

На 13-ту добу перебігу захворювання об'єм базальної секреції підшлункового соку впродовж 3 год більше ніж утричі перевищував контрольні значення (рис.1), і в сумі за дослід приріст становив 332 % ($P < 0,01$). Такі зміни є логічними, оскільки на 10-ту добу у щурів відмічалася гіперсекреція соляної кислоти (див. табл.1). Отже, посилення секреції панкреатичного соку може бути пов'язано з ацидифікацією дванадцятипалої кишки, що в свою чергу викликає вивільнення секретину та холецистокініну – стимуляторів зовнішньосекреторної функції підшлункової залози [24]. На 68-му добу перебігу патології об'єм базальної панкреатичної секреції зменшився до 0,5 – 1,0 мкл/год, тобто у тварин спостерігалася екзокринна недостатність підшлункової залози, що відповідає клінічній картині хронічного панкреатиту.

З перебігом хронічного панкреатиту змінювалась і секреторна відповідь печінки щурів (рис.2). Так, на 13-ту добу після індукції патології статистично вірогідно збільшується об'єм секретованої жовчі (рис.2). У перші півгодини дослідження таке збільшення становило 70,0 %, в другі 79,1 %, в треті 77,4 %, в четверті 78,3%, в п'яті 71,1 %, в шості 72,5 % ($P < 0,001$). Усього за 3 год печінка дослідних щурів секретувала на 74,9 % ($P < 0,001$) жовчі більше, ніж контрольних тварин. Літературні дані свідчать, що у хворих на хронічний панкреатит концентрація холецистокініну в плазмі крові значно підвищується, тоді як у

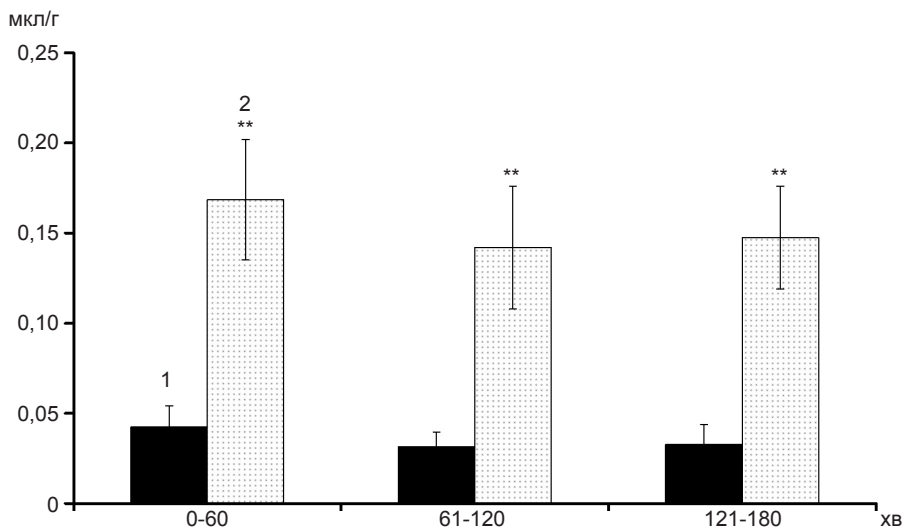


Рис. 1. Базальна секреція підшлункового соку у щурів з хронічним панкреатитом; 1 – контроль (n=6), 2 – панкреатит, 13-та доба (n=6); ** P<0,01 щодо контролю

пацієнтів з панкреатичною недостатністю вміст цього гормону знижується [25,26]. Оскільки відомо, що холецистокінін та секретин є стимуляторами не тільки підшлункової секреції, а й секреції жовчі [27,28], підвищення рівня холерезу на 13-ту добу може бути результатом зростання концентрації цих гормонів у сироватці крові. Натомість на 68-му добу на фоні екзокринної недостатності підшлункової залози показники об'ємної

швидкості холесекреції не мали статистично значущих відмінностей від контрольних значень (див. рис.2).

Біохімічний аналіз жовчі показав, що співвідношення жовчних кислот у спектрі також залежало від терміну перебігу хронічного панкреатиту. Так, на 13-ту добу в жовчі щурів упродовж усього дослідження статистично вірогідно зменшувалися концентрації як вільних, так і таурокон'югованих жовчних кислот. При

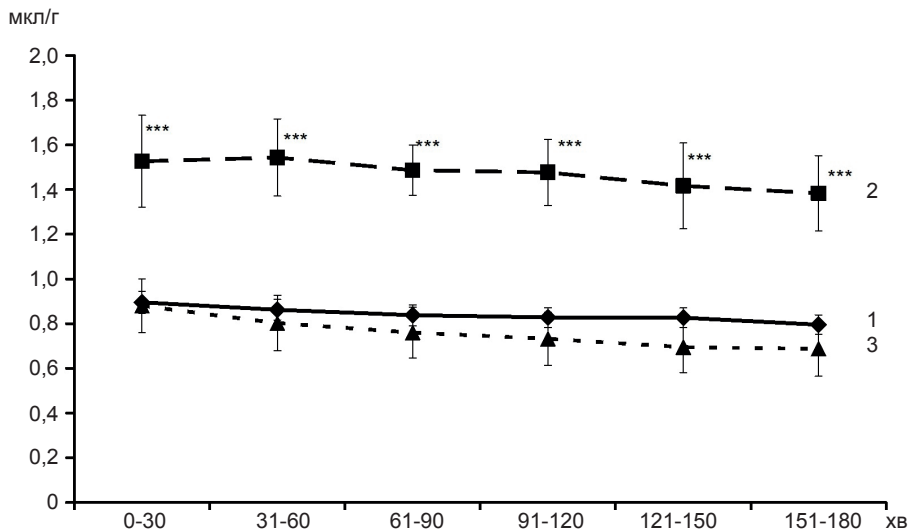


Рис. 2. Секреція жовчі у щурів у різні терміни перебігу хронічного панкреатиту; 1 – контроль, 2 – панкреатит, 13-та доба, 3 – панкреатит, 68-ма доба; *** P<0,001 щодо контролю

Таблиця 2. Зміни концентрації (мг/дл) жовчних кислот в жовчі щурів у різні терміни перебігу хронічного панкреатиту (M±m)

Серія дослідів	Півгодинні проміжки часу	Жовчні кислоти					
		таурохолева	таурохолено-дезоксихолева та тауролідезоксихолева	глікохолева	глікохолено-зоксихолева та гліколідезоксихолева	холева	хенодезоксихолева та дезоксихолева
Контроль	1	191,8±5,1	88,1±3,7	141,5±4,5	24,8±2,1	19,5±1,84	11,1±1,32
Панкреатит 13-та доба		155,9±7,4**	53,1±6,7***	165,0±9,2*	37,1±4,6*	12,8±2,08	4,7±0,52*
Панкреатит 68-ма доба		142,2±6,3***	49,5±5,4***	67,8±6,81***	19,0±0,7	26,5±2,58	14,8±1,11
Контроль	2	192,0±4,7	89,9±3,7	139,7±5,8	24,0±1,5	19,3±1,67	10,6±1,06
Панкреатит 13-та доба		155,0±7,8**	54,5±5,6***	166,4±11,4*	38,3±4,8**	13,3±1,37	5,1±0,41*
Панкреатит 68-ма доба		144,7±7,6***	50,4±6,0***	67,1±6,2***	17,8±0,3*	27,8±2,56*	14,2±1,34
Контроль	3	190,6±4,6	89,5±4,0	138,6±4,9	23,7±1,8	18,7±1,51	9,9±1,21
Панкреатит 13-та доба		149,9±7,1**	52,4±3,6***	164,9±11,9*	38,9±4,1**	12,5±1,96	5,2±0,59
Панкреатит 68-ма доба		140,6±6,8***	48,1±6,1***	64,9±6,9***	17,6±0,2*	27,8±2,27**	14,5±1,58*
Контроль	4	186,2±4,2	86,7±3,3	135,5±4,7	22,6±1,4	17,5±1,37	9,6±1,02
Панкреатит 13-та доба		146,9±7,4***	48,5±3,5***	162,3±12,0*	37,1±4,1**	11,4±1,68*	4,6±0,50*
Панкреатит 68-ма доба		139,9±6,2***	46,8±4,7***	63,7±7,0***	16,6±0,5*	26,2±1,96**	13,7±1,15*
Контроль	5	179,2±3,6	83,2±3,3	130,8±5,4	21,4±1,2	16,8±1,25	9,1±0,97
Панкреатит 13-та доба		140,9±6,2***	47,9±3,6***	160,4±13,6*	34,4±3,6**	10,5±1,17*	4,6±0,58*
Панкреатит 68-ма доба		135,9±6,4***	43,7±4,1***	60,0±6,1***	16,0±0,5*	24,7±1,81**	12,8±1,16*
Контроль	6	175,2±3,6	81,4±3,1	126,8±6,0	19,9±1,1	16,3±1,07	8,7±0,89
Панкреатит 13-та доба		135,5±5,6***	47,0±4,8***	157,2±13,5*	33,2±4,2**	10,3±1,05*	4,2±0,58*
Панкреатит 68-ма доба		133,9±5,5***	43,5±4,3***	58,2±6,3***	15,4±0,4*	24,1±1,62**	12,0±1,28

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 щодо контролю

цьому концентрація кон'югованих з гліцином холатів була в усіх півгодинних пробах жовчі значущо більшою, ніж у контролі (табл.2). Оскільки відомо, що кон'югація холанових кислот з таурином відбувається переважно у перипортальній зоні печінкової часточки [29], зменшення вмісту таурохолатів може свідчити про пошкодження функцій гепатоцитів саме цієї зони. До того ж існують дані про те, що функціонування тауринової транспортної системи в перипортальних гепатоцитах визначає інтенсивність кон'югації жовчних кислот з цією амінокислотою [30]. Отже, наші результати можуть свідчити про пригнічення активності транспортерів таурину та зменшення надходження цієї амінокислоти до гепатоцитів на 13-ту добу перебігу хронічного панкреатиту.

Важливе значення для оцінки функціонального стану печінки та якості секретованої жовчі є співвідношення окремих груп жовчних кислот [31]. Співвідношення кон'югованих і вільних холатів – один з по-

казників детоксикаційної, а тригідрокси- та дигідроксихоланових – синтетичної функцій печінки. Нами показано, що у щурів на 13-ту добу перебігу хронічного панкреатиту значно зменшується сумарна концентрація вільних жовчних кислот. При цьому вміст кон'югованих холатів також мав тенденцію до зменшення (табл.3) і був вірогідно нижчим від контролю у четвертому півгодинному проміжку часу на 13,6 % ($P<0,05$). Внаслідок цих змін коефіцієнт кон'югації збільшився (див. табл.3). Проте це не можна розцінювати як покращення детергентних властивостей жовчі, оскільки в ній значно зменшився вміст таурохолатів, котрі мають більшу здатність підтримувати колоїдостійкість жовчі, ніж глікохолати, вміст яких при цьому збільшився (див. табл.2). Окрім того, на 13-ту добу в жовчі щурів значущо зменшилася концентрація дигідроксихоланових жовчних кислот, становлячи в першій пробі $94,9\pm 7,15$, у другій $97,9\pm 5,9$, у третій $96,5\pm 3,07$, у четвертій $90,2\pm 2,87$, у п'ятій $86,9\pm 3,63$ і в шостій

Таблиця 3. Зміни коефіцієнта кон'югації у щурів з експериментальним хронічним панкреатитом ($M\pm m$)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Контроль	Хронічний панкреатит	
			13-та доба	68-ма доба
Сумарна концентрація кон'югованих жовчних кислот, мг/дл	1	446,2 \pm 13,2	411,1 \pm 14,0	278,5 \pm 11,7***
	2	445,7 \pm 11,5	414,2 \pm 11,2	270,3 \pm 18,4***
	3	439,5 \pm 14,3	406,1 \pm 9,0	271,3 \pm 15,2***
	4	431,0 \pm 11,3	372,5 \pm 29,6*	267,0 \pm 12,2***
	5	381,3 \pm 28,9	362,0 \pm 31,7	246,6 \pm 16,0***
	6	405,6 \pm 11,8	352,1 \pm 32,5	240,2 \pm 3,3***
Сумарна концентрація вільних жовчних кислот, мг/дл	1	30,5 \pm 2,84	17,5 \pm 2,60*	41,3 \pm 3,41*
	2	29,9 \pm 2,42	18,4 \pm 1,78*	42,0 \pm 2,94*
	3	28,5 \pm 2,40	17,7 \pm 2,52*	42,3 \pm 3,15**
	4	27,1 \pm 2,11	16,1 \pm 2,15*	39,9 \pm 2,50**
	5	25,9 \pm 1,95	15,1 \pm 1,73*	37,5 \pm 2,37**
	6	25,0 \pm 1,74	14,5 \pm 1,63**	36,2 \pm 2,15**
Коефіцієнт кон'югації	1	14,6	23,5	6,7
	2	14,9	22,5	6,4
	3	15,4	22,9	6,4
	4	15,9	23,1	6,7
	5	14,7	24,0	6,6
	6	16,2	24,3	6,6

* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ щодо контролю

84,5±6,45 мг/дл порівняно з відповідними значеннями у контролі (123,9±4,08, 1124,5±3,72, 123,2±4,51, 118,8±3,56, 113,7±3,6, 112,2±3,48 мг/дл), що може свідчити про пригнічення кислого шляху біосинтезу холатів.

На 68-му добу на фоні незмінного рівня холерезу відзначається значне зростання концентрації вільних жовчних кислот (див. табл.2). Це збільшення було значущим в усіх півгодинних порціях жовчі і в середньому за дослід для ХК становило 46 %, а для суміші ХДХК та ДХК – 39 %. Натомість концентрації кон'югованих з таурином та гліцином як тригідроксильованих (ХК), так і дигідроксильованих (ХДХК та ДХК) холанових кислот були статистично вірогідно меншими відповідних контрольних значень (див. табл.2). Так, зменшення концентрації ТХК у середньому за дослід становило 25 %, ТХДХК і ТДХК – 46 %, ГХК – 53 %, а ГХДХК і ГДХК – 25 %. Окрім того, в жовчі змінилося співвідношення сумарних кон'югованих та сумарних вільних жовчних кислот. У контрольних тварин відсоткове співвідношення кон'юговані/вільні холати становило 92,6:7,4 %, а у щурів з хронічним панкреатитом – 85,4:14,6 %. Такі зміни призвели до зменшення коефіцієнта кон'югації до патологічно низьких значень (див. табл.3). Тобто наші результати можуть свідчити не тільки про зменшення надходження амінокислот до гепатоцитів, а й про пригнічення активності ферменту N-ацетилтрансферази, котрий бере участь у кон'югації жовчних кислот з амінокислотами [32]. До того ж зменшення вмісту в жовчі ди- та тригідроксихолатів вказує на пригнічення не тільки процесів гідроксилювання в гепатоцитах, а й синтетичної та детоксикаційної функцій печінки.

Таким чином, характер секреторної відповіді органів травного тракту залежить від тривалості перебігу хронічного панкреатиту. На 10-ту добу функціональний стан секреторного апарату шлунка щурів із такою патологією характеризується посиленням кислотоутворення, секреторною недостат-

ністю додаткових і поверхнево-епітеліальних клітин слизової оболонки, зменшенням вмісту загального білка в шлунковому соку. На 13-ту добу при збільшенні об'ємів панкреатичного та печінкового секретів відбувається перерозподіл у спектрі холатів, який свідчить про погіршення детергентних властивостей жовчі, пригнічення кислого шляху біосинтезу жовчних кислот та кон'югації холанових кислот з таурином. Через 2 міс перебігу патології кислотність шлункового вмісту частково відновлюється, натомість рівень секреції білків та слизу продовжує знижуватися, що супроводжується зменшенням загального пулу вільних амінокислот. На 68-му добу на фоні екзокринної недостатності підшлункової залози в печінці пригнічуються процеси гідроксилювання, а також кон'югації жовчних кислот з амінокислотами, що свідчить про порушення синтетичної та детоксикаційної функцій печінки.

З.А.Горенко, О.А.Грінченко, С.П.Весельський, В.Н.Бабан

СОСТАВ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА И ЖЕЛЧИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Особенности секреторных функций желудка и печени крыс изучали при экспериментальном хроническом панкреатите, который моделировали с помощью L-аргинина. Базальную желудочную секрецию исследовали в хронических опытах методом аспирации на 10-е и 63-и сутки, а поджелудочную и печеночную – в острых опытах на 13-е и 68-е сутки после последнего введения L-аргинина. Установлено, что характер секреторного ответа органов пищеварительного тракта зависит от длительности течения панкреатита. На 10-е сутки функциональное состояние секреторного аппарата желудка крыс с хроническим панкреатитом характеризуется усилением кислотообразования и секреторной недостаточностью продуцирующих слиз клеток. На 13-е сутки при увеличении объемов панкреатического и печеночного секретов наблюдается перераспределение в спектре холатов, которое свидетельствует об ухудшении детергентных свойств желчи, угнетении кислого пути биосинтеза холатов и конъюгации холановых кислот с таурином. Через 2 мес патологии общий дефицит аминокислот в желудочном соке коррелирует с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы. При этом кислотность желудочного содержимого частично восстанавливается, а уровни секреции белков и

слизи продолжают снижаться. В печени угнетаются процессы гидроксирования и конъюгации желчных кислот с аминокислотами, что свидетельствует о нарушении синтетической и дезинтоксикационной функций железы. Ключевые слова: хронический панкреатит; желудочная секреция; соляная кислота; желчеобразование; желчные кислоты.

**Z.A.Gorenko, O.A.Grinchenko, S.P.Veselsky,
V.M.Baban**

COMPOSITION OF GASTRIC JUICE AND BILE IN RATS AT THE EXPERIMENTAL CHRONIC PANCREATITIS

Chronic pancreatitis is an inflammatory disease of the pancreas, which is characterized by destruction of pancreatic secretory parenchyma and progressing exocrine and endocrine insufficiency. Usually these patients have complications as cardiovascular, renal, respiratory and liver failure, and various gastric dysfunctions. The data of clinical observations do not reveal fully the functional state of the stomach and liver in chronic pancreatitis also remains an open question about the quality of the gastric juices and bile by this pathology. Therefore our aim was to investigate the secretory functions of the stomach and liver features in rats at the experimental chronic pancreatitis. This pathology modeled using L-arginine. Basal gastric secretion was investigated in chronic experiment by aspiration method for 10th and 63rd days, and pancreas and liver – in acute experiments at 13th and 68th days after the last administration of L-arginine. It was established that the character of the secretory response of the digestive tract depends on the duration of the pathology course. On the 10th day the functional state of the gastric secretory glands in rats with chronic pancreatitis characterized by twice increase of gastric acid production but decrease the level of hexosamines on 23,8% ($P<0,001$) that indicate a increase of gastric content aggressiveness and mucus producing cells secretory insufficiency. In these animals the rate of total protein decreased on 61,7 % ($P<0,05$). On the 13th day observed the increase of pancreatic juice on 332% ($P<0,01$), hepatic secret volume on 74,9% ($P<0,001$) and redistribution in the cholates spectrum: glycocholates level increased but tauro-, free and total dehydroxylated bile acids decreased. These changes suggest deterioration of bile detergent properties, inhibition of acidic pathway of bile acids biosynthesis and conjugation of cholates with taurine. In two months total deficit of amino acids in gastric juice correlated with exocrine pancreatic insufficiency. Herein the acidity of gastric content partially restored, while the level of protein and mucus secretion proceed to decline. Consequently gastric mucosa is more vulnerable. In these rats the rates of free bile acids greatly increased while tauro- and glycocholates significantly decreased. Thus the processes of hydroxylation and conjugation of bile acids with amino acids inhibited suggesting interruption of synthetic and detoxification functions of the

liver. The present work is important for comprehension the pathophysiological aspects of chronic pancreatitis particularly the digestive system functioning features at this pathology. These data could be considered in the appointment of treatment to avoid complications.

Key words: chronic pancreatitis; gastric secretion; hydrochloric acid; bile formation; bile acids.

Peter Bogach Institute of Physiology Educational and Scientific Centre "Institute of Biology" National Taras Shevchenko University of Kyiv

REFERENCES

1. Stepanov YuM, Krylova OO, Rudenko AI, Tropko LV, Seilt TM The peculiarities of secretory function and character of microbial contamination of the stomach in various forms of chronic pancreatitis. *Modern Gastroenterol.* 2013; 3(71):33-9. [Ukrainian].
2. Cao M, Li J, Xu J, Feng Y, Lin X, Han T, Chen C. Cannabinoid HU210 protect isolated rat stomach against impairment caused by serum of rats with experimental acute pancreatitis. *PLoS ONE.* 2012 Dec; 7(12): e52921.
3. Kong L, Santiago N, Han TQ, Zhang SD. Clinical characteristics and prognostic factors of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2004 Nov 15;10(22):3336-8.
4. Browne GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2006 Nov 28; 12(44):7078-96.
5. Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg.* 2002; 6:474-80.
6. Mayev IV, Kucheryavy YuA. Gastric acid production and chronic pancreatitis: how strong is the mutual relationship? *RJGHC.* 2008; 3:4-14. [Russian].
7. Hegyi P, Raconzay Z, Sari R, God C, Lonovics J, Takacs T, Czako L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2004 July 15; 10(14):2003-9.
8. Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2006 May; 93(5):518-30.
9. Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol.* 2007 Mar; 211(4):383-8.
10. Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sendler M, Lerch MM. Animal model for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2011 Dec 1; 4(1):26.
11. Delaney CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: a new model using serial intraperitoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol.* 1993 Dec; 28(12):1086-90.
12. Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegui P, Matkovics B, Lonovics J. Oxidative stress in distant organs and the effects of allopurinol during

- experimental acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 2000 Jun; 27(3):209-16.
13. Takacs T, Czako L, Morschl E, Laszlo F, Tiszlavicz L, Rakonczay Z Jr, Lonovics J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas*. 2002 Oct; 25(3):277-82.
 14. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002; 9(4):401-10.
 15. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fisher CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am*. 2007 Dec; 87(6):1325-40.
 16. Tashiro M, Schäfer C, Yao H, Ernst SA, Williams LA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut*. 2001 Feb; 49:241-50.
 17. Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, Nagashiro Y, Tashiro M, Nakamura H, Otsuki M. Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis. *Pancreas* 2005 Nov; 31(4):365-72.
 18. Campbell CA, Gaskin PJ, Darton J, Chiu P, Lee K, McLean PG. Validation of a conscious rat model for the discovery of novel agents that inhibit gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jul; 589(1-3):260-3.
 19. Kochetov GA. A practical guide to enzymology. Severin S.E., editor. Moscow: Graduate school: 1980. [Russian].
 20. Korobeinikova EM, Mescheryakova GV. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. Laboratory case. 1981; 4:221-4. [Russian].
 21. SU 1624322 A1 copyright certificate description No. 4411066/14 IPC G 01 N 33/50. A method for determination of bile acids in biological liquid. Veselsky SP, Lyashchenko PS, Lukyanenko IA. [Russian].
 22. Hrinchenko OA, Ianchuk PI. The pathways of taurine influences on gastric secretion. *Fiziol Zh*. 2010; 56(4):111-20. [Ukrainian].
 23. Girish BN, Rajesh G, Vaidyanathan K, Balakrishnan V. Alterations in plasma amino acid levels in chronic pancreatitis. *JOP J Pancreas*. 2011 Jan 5; 12(1):11-8.
 24. Singh J, Salido GM, Camello PJ, Lennard R, Render C, Wisdom D, Pozo MJ, Pariente JA. Interactions between cholecystokinin-octapeptide and secretin in the rat pancreas in vivo and in vitro. *Exp Physiol*. 1992 Jan; 77(1):191-204.
 25. Gielkens HA, Eddes EH, Vecht J, van Oostayen JA, Lamers CB, Maslee AA. Gallbladder motility and cholecystokinin secretion in chronic pancreatitis: relationship with exocrine pancreatic function. *J Hepatol*. 1997 Aug; 27(2):306-12.
 26. Otsuki M. Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar; 15 Suppl: D71-83.
 27. Guerrier M, Attili F, Alpini G, Glaser S. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Jun; 3 (3): 118-25.
 28. Reeve JR Jr, Wu V, Keire D, Faull K, Chew P, Solomon TE, Green GM, Coskun T. Differential bile-pancreatic secretory effects of CCK-58 and CCK-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Mar; 286(3):G395-G402.
 29. Ding WG, Tooyama I, Kimura H, Kuriyama K. Immunohistochemical localization of taurine-conjugated bile acids in the liver of mouse, rat, monkey and human. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 359:91-8.
 30. Ikeda S, Tachikawa M, Akanuma S, Fujinawa J, Hosoya K. Involvement of γ -aminobutyric acid transporter 2 in the hepatic uptake of taurine in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Aug 1; 303(3):G291-G297.
 31. Vasheka IP, Vesel'skyi SP, Horenko ZA, Hrinchenko OA, Karbovs'ka LS, Makarchuk MIu. The influence of amylin on the bile acid spectrum in rats. *Fiziol Zh*. 2014; 60(3):46-53. [Ukrainian].
 32. Furutani M, Arii S, Higashitsuji H, Mise M, Fukumoto M, Nakano S, Nakayama H, Imamura M, Fujita J. Reduced expression of kan-1 (encoding putative bile acids-CoA-amino acid N-acyltransferase) mRNA in livers of rats after partial hepatectomy and during sepsis. *Biochem J*. 1995 Oct 1; 311(1):203-8.

*Матеріал надійшов
до редакції 02.12.2014*

Вуглеводний обмін при цукровому діабеті 1-го типу у щурів за умов застосування водного екстракту лушпиння квасолі звичайної

М.Ю. Кузнєцова, Т.І. Галенова, О.М. Савчук, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка;
e-mail: kifenkomarjana@gmail.com

*Вивчали вплив водного екстракту лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* – *P.vulgaris*) на показники вуглеводного обміну за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) 1-го типу у щурів. Встановлено, що довготривале пероральне введення цього екстракту у дозі 200 мг/кг щурам з моделлю ЦД знижувало показники глікемії та глікозильованого гемоглобіну на фоні хронічної гіпоінсулінемії. Слід відмітити підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини та гексокіназної активності у клітинах печінки щурів. У контрольних щурів і тварин з моделлю ЦД зростав загальний вміст білка ГЛЮТ-4 у м'язовій тканині. Таким чином, механізм гіпоглікемічної дії *P.vulgaris* може бути пов'язаний зі здатністю активних фітокомпонентів цієї рослини безпосередньо впливати на ключові внутрішньоклітинні ланки вуглеводного обміну тканин-мішеней інсуліну за умов ЦД 1-го типу.*

Ключові слова: цукровий діабет 1-го типу; вуглеводний обмін; *Phaseolus vulgaris*; квасоля; водний екстракт.

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) – це ендокринно-обмінне захворювання, що проявляється станом хронічної гіперглікемії, порушенням усіх видів обміну речовин і поліорганими ураженнями. Патологічне підвищення концентрації глюкози в крові може бути пов'язане як з недостатнім синтезом і вивільненням інсуліну β -клітинами острівців Лангенганса, так і зі змінами на рівні гормонорецепторної взаємодії в інсуліночутливих тканинах (печінка, м'язова та жирова тканини). Згадані ускладнення призводять до дисбалансу на внутрішньоклітинному метаболічному рівні тканин-мішеней гормону, зокрема порушення процесів утилізації глюкози, гліколізу та глікогенезу [1–3].

Актуальною проблемою сучасної медичної біохімії залишається розробка нових високоефективних терапевтичних підходів, направлених на нормалізацію вуглеводного обміну в умовах ЦД. Одним із них вважається

фітотерапія, яка і нині є потужним додатковим засобом лікування цього захворювання та його ускладнень. У контексті проблеми ЦД рослинна сировина України має значну цінність для дослідження, оскільки її ефективність доведена досвідом застосування впродовж багатьох століть. Популярним серед українського населення гіпоглікемічним фітозасобом є відвар лушпиння квасолі звичайної, який здавна використовується в народній медицині для лікування ЦД та профілактики його вторинних ускладнень [4]. Аналіз літературних першоджерел переконав нас, що науковий інтерес до антидіабетичного потенціалу *Phaseolus vulgaris* (*P.vulgaris*) завжди був високим, але особливої актуальності набув протягом останнього десятиріччя. Численні дослідження на модельних системах *in vitro/in vivo* демонструють потужні гіпоглікемічні та антиоксидантні властивості цієї рослини [5,6]. Однак у науковій літературі відсутня інформація про проведення комплексних

досліджень щодо біохімічних і молекулярних механізмів дії *P. vulgaris* на клітинному рівні для встановлення джерела її гіпоглікемічних ефектів, а також одержання біологічно активних речовин для створення нових фітозасобів з цукрознижувальною дією.

Метою нашої роботи було дослідити вплив водного екстракту лушпиння квасолі звичайної (*P. vulgaris*) на показники вуглеводного обміну за умов експериментального ЦД 1-го типу у щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на білих нелінійних щурах обох статей віком 1,5-2 міс, масою 120-150 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986) та Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р.

Експериментальний ЦД 1-го типу моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням розчину стрептозотоцину (“Sigma”, США) з розрахунку 4,5 мг на 100 г маси тіла тварини [7]. Щурам контрольної групи вищезазначеним способом вводили 10 ммоль/л цитратного буфера (pH 4,5), який використовували для розчинення стрептозотоцину. Через 2 доби після моделювання ЦД у крові тварин перевіряли рівень глікемії натще. У експериментах використовували щурів з концентрацією глюкози крові в діапазоні 25-31,2 ммоль/л.

Дослідних тварин було поділено на 4 групи по 10 щурів у кожній. До 1-ї та 2-ї контрольних груп увійшли тварини, яким вводили впродовж 28 діб деіонізовану воду (*per os*) та водний екстракт лушпиння квасолі у дозі

200 мг/кг відповідно. Тварини з модельованим ЦД увійшли до 3-ї і 4-ї груп. Щурам 3-ї групи вводили воду, а 4-ї – лушпиння квасолі впродовж 28 діб.

Водний екстракт лушпиння квасолі звичайної готували таким чином. Подрібнене сухе лушпиння квасолі масою 132 г заливали 1 л окропу. Суміш поміщали на киплячу водяну баню на 20 хв, після чого відвар настоювали протягом 18 год при 25°C. Екстракт фільтрували та центрифугували при 1000 g протягом 10 хв. Отриманий супернатант ліофільно висушували за допомогою апарата “LyoQuest” (“Telstar”, Іспанія) до одержання сухого залишку екстракту масою 8 г, який зберігали при -20°C. Для досліджень використовували свіжоприготовлений водний розчин висушеного екстракту [4].

На 29-ту добу експерименту, після 12-годинного голодування, тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Концентрацію глюкози у крові щурів визначали за допомогою глюкометра “Глюкофот-II” (“Норма”, Україна); глікозильованого гемоглобіну – спектрофотометричним методом, використовуючи реактиви комерційного набору (“Філісіт-діагностика”, Україна).

Для визначення концентрації інсуліну у крові щурів, зразки їхньої сироватки попередньо розводили в 10 разів 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфером (pH 7,4), який містив 0,13 моль/л NaCl. Досліджувані проби об’ємом 100 мкл інкубували протягом ночі при 4°C. Наступні етапи експерименту відповідали загальній схемі проведення імуноферментного аналізу [8]. Під час дослідження були використані первинні антиінсулінові антитіла кроля (“Santa Cruz”, США), антикролячі вторинні антитіла, кон’юговані з пероксидазою хрину (“Bio-Rad”, США) та субстрат *o*-фенілєндіамін/пероксид водню (“Sigma”, США). Вимірювання проводили на мікропланшеточному спектрофотометрі при довжині хвилі 492 нм. Значення оптичної густини були використані для вираження концентрації інсуліну (умовні одиниці) у пере-

рахунку на вміст загального білка сироватки крові, який визначали методом Бредфорд [9].

Активність ключових ферментів вуглеводного обміну досліджували у постмітохондріальному гомогенаті печінки та м'язової тканини дослідних щурів, який отримували центрифугуванням загального 10%-го гомогенату відповідної тканини, що готували на 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфері (рН 7,4), при 15 000 g протягом 30 хв [10]. Вміст глюкозного транспортера (ГЛЮТ-4) вивчали в постмітохондріальному гомогенаті клітин м'язової тканини, який попередньо солюбілізували за наявності 1%-го неіонного детергента Тритон Х-100, з подальшим осадженням несолубілізованого матеріалу при 40 000 g протягом 30 хв.

Загальну гексокіназну активність визначали спектрофотометрично, за швидкістю відновлення нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ) за наявності 10 ммоль/л глюкози та надлишку дегідрогенази глюкозо-6-фосфату і виражали у наномолях НАДФН, що утворився за 1 хв інкубації при 37°C у перерахунку на 1 мг білка. Глікогенсинтазну активність встановлювали за кількістю уридиндифосфату (УДФ), що вивільнився з комплексу УДФ–глюкоза [12]. Концентрацію вільного УДФ визначали спектрофотометричним методом, який базується на використанні спряженої системи ферментативних реакцій, що поєднують фосфорилування УДФ з окисненням відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН) [13]. Активність глікогенсинтази виражали у наномолях НАДН, що перетворився за 1 хв інкубації при 37°C у перерахунку на 1 мг білка.

Вміст ГЛЮТ-4 визначали методом імуноферментного аналізу [8]. Як антиген використовували солюбілізований білковий матеріал м'язової тканини щурів, розведений до концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,4), який містив 0,13 моль/л NaCl. Досліджувані зразки об'ємом 100 мкл інкубували протягом ночі при 4°C. Для детекції вмісту ГЛЮТ-4 у зразках використовували первинні кроля-

чі поліклональні антитіла проти щурячого ГЛЮТ-4 ("Millipore", США), які виявляли за допомогою вторинних антикролячих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрину ("Bio-Rad", США). Як субстрат пероксидазної реакції у роботі використовували *o*-фенілендіамін / пероксид водню ("Sigma", США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм. Значення оптичної густини були використані для вираження вмісту ГЛЮТ-4 (умовні одиниці) у перерахунку на 1 мг білка в досліджуваних пробах.

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою стандартних методик варіаційної статистики. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Водний екстракт лушпиння *P. vulgaris* мав виражений гіпоглікемічний ефект у щурів з моделлю ЦД 1-го типу, знижуючи рівень глікемії у 2,5 раза порівняно з відповідним показником у тварин з діабетом, які замість екстракту отримували воду (таблиця). Однак повної нормалізації концентрації глюкози внаслідок дії екстракту в крові щурів з ЦД не спостерігалось, що у свою чергу може зумовлювати підвищену концентрацію глікозильованого гемоглобіну у тварин цієї групи (див. таблицю). Слід зазначити, що у групі щурів з діабетом, які отримували екстракт (4-та група), цей показник все-таки був нижчим на 20 %, ніж у тварин, які отримували воду (3-тя група).

Загальновідомим фактом є те, що з прогресуванням патологічних змін у структурно-функціональному стані β -клітин підшлункової залози внаслідок токсичного впливу стрептозотоцину порушується синтез і вивільнення інсуліну, що призводить до дисбалансу глюкозного і ліпідного гомеостазу та, як наслідок, розвитку діабету у тварин [14].

Згідно з отриманими результатами (див. таблицю), концентрація інсуліну в сироватці крові тварин з діабетом, які протягом експерименту отримували воду (3-тя група), була

Концентрація глюкози, глікозильованого гемоглобіну в крові та інсуліну в сироватці крові щурів

Група тварин	Глюкоза, ммоль/л	Глікозильований гемоглобін, ммоль фруктози/г гемоглобіну	Інсулін, ум.од./мг білка
Контрольні тварини, яким вводили			
воду (група 1)	4,9 ± 0,4	0,11 ± 0,01	23,7 ± 1,1
екстракт (група 2)	5,8 ± 0,2	0,12 ± 0,01	19,4 ± 2,1
Тварини з моделлю цукрового діабету, яким вводили			
воду (група 3)	28,2 ± 3,7*	0,27 ± 0,05*	15,8 ± 2,6*
екстракт (група 4)	11,4 ± 2,7*,**	0,22 ± 0,01*,**	16,6 ± 3,4*

* $P < 0,05$ порівняно з 1-ю групою контрольних тварин; ** $P < 0,05$ порівняно з 3-ю групою тварин з моделлю цукрового діабету.

у 1,5 раза нижчою від значень контрольних тварин (1-ша група). У тварин 4-ї групи не спостерігалось нормалізації концентрації інсуліну (див. таблицю). В літературі є дані про те, що екстракт *P. vulgaris* може посилювати секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози [15]. Зважаючи на особливості використаної експериментальної моделі ЦД, отримані нами результати не суперечать раніше встановленим даним щодо інсуліностимульовального ефекту цієї рослини, однак можуть свідчити про відсутність репаративних властивостей її фітокомпонентів щодо зруйнованих токсичною дією стрептозотоцину інсулінопродукуючих клітин підшлункової залози.

Варто відмітити, що у групі контрольних щурів вживання екстракту *P. vulgaris* (2-га група) суттєво не позначалося на досліджуваних показниках (див. таблицю). Отже, отримані результати дають підставу стверджувати, що водний екстракт лушпиння квасолі виявляє свої гіпоглікемічні властивості лише за умов високої концентрації глюкози, яка є характерною для цієї патології.

Оскільки, як свідчать наші результати, гіпоглікемічні властивості водного екстракту *P. vulgaris* не пов'язані з посиленням секреції інсуліну, ми припустили, що цукрознижувальний ефект може бути наслідком прямого впливу його певних фітокомпонентів на клітини-мішені інсуліну. Для перевірки цієї гіпотези нами було досліджено активність деяких ключових внутрішньоклітинних ферментів обміну глюкози в основних глюкозоутілізу-

ючих тканинах організму: печінці та м'язах.

Гексокіназна реакція проходить всередині клітини та опосередковує перетворення глюкози на глюкозо-6-фосфат. Відомо про існування, щонайменше чотирьох тканинспецифічних ізоформ гексокінази (I-IV), які змінюють свою активність під впливом гормонів, насамперед інсуліну [2]. Найбільшою специфічністю до глюкози відзначається гексокіназа IV – глюкокіназа, яка експресується виключно в печінці і функціонує як сенсор концентрації глюкози, регулюючи синтез глікогену, швидкість гліколізу в цьому органі. Для таких інсулінозалежних тканин, як скелетні м'язи і жирова, характерна гексокіназа II, активність якої корелює з переміщенням білка-транспортера глюкози ГЛЮТ-4 [2, 3]. Однак найбільші можливості щодо утилізації глюкози має печінка, в клітинах якої окрім повного набору ізоферментів гексокінази експресується інший білок-транспортер глюкози ГЛЮТ-2, функціонування якого не контролюється інсуліном, що, власне, і дало підставу віднести печінку до інсулінонезалежних органів [2].

У тварин з моделлю ЦД, які отримували воду (3-тя група), гексокіназна активність у клітинах печінки була знижена майже у 2,5 раза порівняно з контролем (див. рис. 1, а). А у тварин, які вживали водний екстракт лушпиння квасолі (4-та група), була на 60% вищою, ніж у тварин 3-ї групи, однак залишалися статистично нижчою від значень контрольних тварин 1-ї групи (див. рис. 1, а).

При дослідженні гексокіназної активності

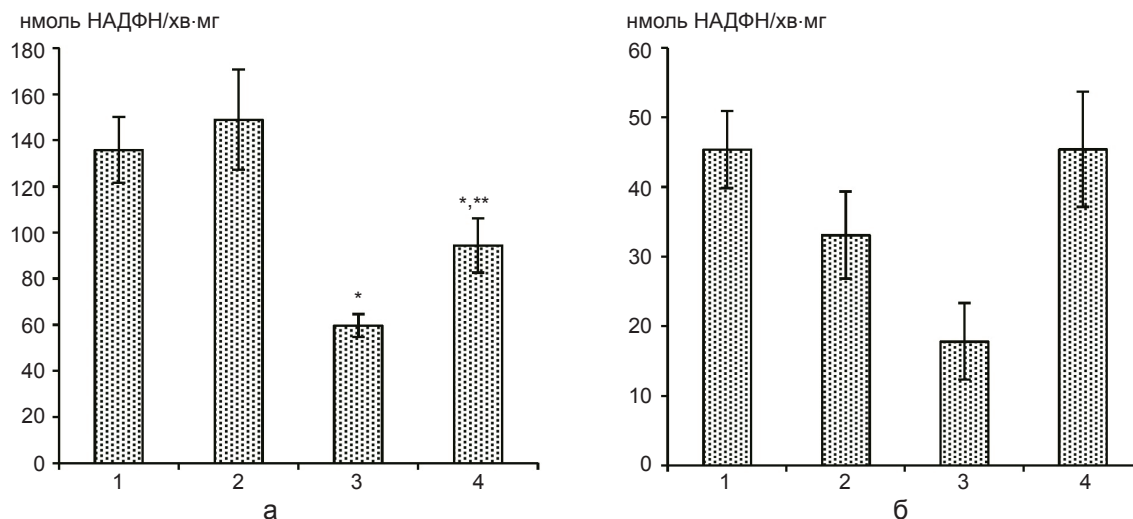


Рис. 1. Гексокіназна активність у клітинах печінки (а) та м'язової тканини (б) контрольних щурів (1 – вода, 2 – екстракт) та щурів з моделлю ЦД (3 – вода, 4 – екстракт). * $P < 0,05$ порівняно з 1-ю групою контрольних тварин; ** $P < 0,05$ порівняно з 3-ю групою тварин з моделлю цукрового діабету

в м'язовій тканині дослідних тварин не було встановлено вірогідних міжгрупових відмінностей (див. рис. 1, б). Такі результати можна пояснити спираючись на експериментальні дані інших дослідників [16], які показали, що за умов стрептозотоциніндукованого діабету у щурів спостерігається зниження інсулінозалежної експресії гена гексокінази II, головним чином у жировій тканині, тоді як вміст мРНК цього ферменту в скелетних м'язах залишається незмінним. Такі дані узгоджуються з нашими результатами щодо гексокіназної активності в м'язовій тканині щурів з модельованим діабетом.

Одним із шляхів подальшого внутрішньоклітинного перетворення глюкозо-6-фосфату, продукту гексокіназної реакції, є синтез глікогену. Незначною мірою біосинтез глікогену відбувається майже у всіх тканинах організму, проте найбільше він виражений у печінці та м'язах. Ключовим ферментом цього процесу є глікогенсинтаза – кінцева мішень фосфатидилінозитол-3-кіназного сигнального каскаду, що активується у відповідь на дію інсуліну [2, 3]. Глікогенсинтаза каталізує перенесення залишку глюкози від УДФ-глюкози на глікоген. Ця реакція являє собою лімітуючу стадію синтезу глікогену.

На каталітичну активність цього ферменту можуть впливати як алостеричні модулятори (глюкозо-6-фосфат), так і ковалентна модифікація. Процес фосфорилування/дефосфорилування молекули глікогенсинтази регулюється протеїнкіназою А, кіназою глікогенсинтази 3 – ферментами, які є складовою частиною каскадних механізмів дії інсуліну на клітини. В умовах патогенезу ЦД відмічено низку порушень у регуляції функціонування глікогенсинтази [2, 3, 15].

Результати дослідження глікогенсинтазної активності в печінці та м'язовій тканині щурів усіх дослідних груп представлені на рис. 2. У тварин з моделлю ЦД, які протягом експерименту отримували воду (3-тя група), глікогенсинтазна активність у клітинах печінки та м'язів була знижена у 2,2 та 2,5 раза відповідно порівняно зі значеннями 1-ї контрольної групи (див. рис. 2, а, б). У тварин 4-ї групи цей показник у клітинах м'язової тканини був на рівні контрольних значень (див. рис. 2, б), тоді як у печінці знижувався у 3,3 раза порівняно із значеннями контрольних щурів 1-ї групи та не відрізнявся статистично від показників у тварин з 3-ї групи (див. рис. 2, а).

Як було зазначено раніше, синтез глікогену є інсулінозалежним, а отже низькі значення глі-

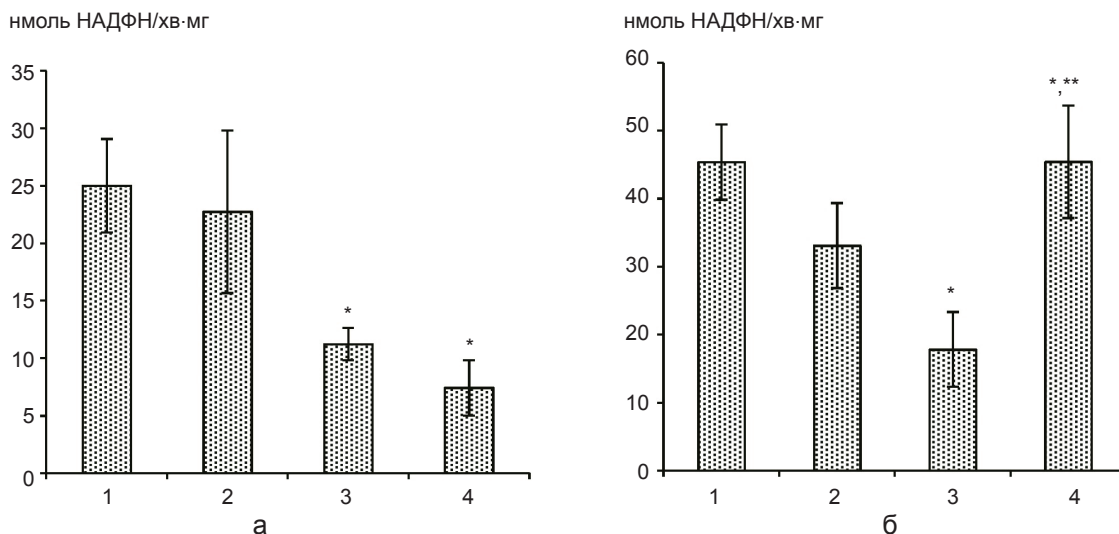


Рис. 2. Глікогенсинтазна активність у клітинах печінки (а) та м'язової тканини (б) контрольних щурів (1 – вода, 2 – екстракт) та щурів з моделлю ЦД (3 – вода, 4 – екстракт).

* $P < 0,05$ порівняно з 1-ю групою контрольних тварин; ** $P < 0,05$ порівняно з 3-ю групою тварин з моделлю цукрового діабету

когенсинтазної активності в клітинах печінки та м'язів щурів з моделлю ЦД 1-го типу можна пояснити низькою концентрацією інсуліну в сироватці їх крові. Однак, як свідчать наші результати, за умов споживання екстракту *P. vulgaris* тваринами з моделлю ЦД відзначалося підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини на фоні вірогідно низької концентрації інсуліну, що може бути наслідком прямого впливу фітокомпонентів екстракту квасолі на сигнальні молекули інсулінового каскаду. Однак у той самий час ми не спостерігали нормалізації глікогенсинтазної активності у клітинах печінки тварин з моделлю ЦД, які отримували екстракт *P. vulgaris*, що ймовірно вказує на різнобічний вплив його фітокомпонентів на клітини інсулінозалежних та інсулінонезалежних тканин.

Гіперглікемія – ключовий патофізіологічний прояв ЦД і може бути наслідком не лише порушень внутрішньоклітинного метаболізму глюкози, а й зниження її утилізації. У клітинах інсулінозалежних тканин, серед яких основними є м'язова та жирова, інсулін збільшує швидкість надходження глюкози за рахунок активації внутрішньоклітинних процесів транслокації ГЛЮТ-4 [16]. Окрім

того, він регулює експресію генів білків-транспортерів глюкози [16].

Показано, що у тварин 3-ї групи загальний вміст білка ГЛЮТ-4 був знижений на 25 % порівняно з контрольними щурами 1-ї групи (див. рис. 3). Наші результати можуть свідчити про порушення експресії гена цього білка, що, ймовірно, є наслідком стану довготривалої гіпоінсулінемії, яку спостерігали за умов досліджуваної моделі ЦД (див. таблицю). У групі щурів з діабетом, які отримували водний екстракт *P. vulgaris*, загальний вміст внутрішньоклітинного білка-транспортера глюкози був на 60 % вищий, ніж у тварин 3-ї групи, які отримували воду. Цікаво, що підвищений вміст внутрішньоклітинного ГЛЮТ-4 (на 25 %) спостерігали також у м'язових клітинах щурів 2-ї контрольної групи. Наші результати можуть вказувати на здатність активних фітокомпонентів *P. vulgaris* впливати на експресію гена ГЛЮТ-4, призводячи до збільшення загального вмісту цього білка. У літературі є дані про те, що деякі інші лікарські рослини можуть регулювати експресію білків інсулінового сигнального каскаду, що дало змогу використовувати їх не лише при ЦД 1-го типу, а й при таких ін-

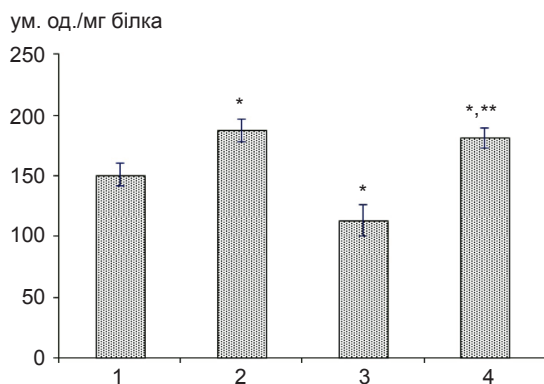


Рис. 3. Загальний вміст внутрішньоклітинного білка ГЛЮТ-4 у м'язовій тканині контрольних щурів (1 – вода, 2 – екстракт) та щурів з моделлю ЦД (3 – вода, 4 – екстракт). * $P < 0,05$ порівняно з 1-ю групою контрольних тварин; ** $P < 0,05$ порівняно з 3-ю групою тварин з моделлю цукрового діабету

сулінорезистентних станах, як ЦД 2-го типу, метаболічний синдром [17].

Отже, довготривале пероральне введення водного екстракту лущиння *P. vulgaris* щурам з моделлю ЦД 1-го типу призводило до зниження гіперглікемії на фоні вірогідно низької концентрації сироваткового інсуліну. За умов споживання досліджуваного екстракту тваринами з діабетом спостерігалось підвищення глікогенсинтазної активності у клітинах м'язової тканини та гексокіназної активності у клітинах печінки. Це може вказувати на пряму дію фітокомпонентів *P. vulgaris* на функціонування ключових ферментів вуглеводного обміну. Також було встановлено, що екстракт *P. vulgaris* впливає на вміст ГЛЮТ-4 у м'язовій тканині як контрольних щурів, так і тварин з моделлю ЦД, можливо, через регуляцію експресії гена цього білка.

М.Ю. Кузнецова, Т.І. Галенова, А.Н. Савчук, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА СТРУЧКОВ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Изучали влияние водного экстракта стручков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* – *P. vulgaris*) на показатели углеводного обмена в условиях экспериментального

сахарного диабета (СД) 1-го типа у крыс. Показано, что длительное пероральное введение этого экстракта в дозе 200 мг/кг крысам с моделью СД приводит к снижению показателей гликемии и гликозилированного гемоглобина на фоне хронического состояния гипoinsулинемии. Следует отметить повышение гликогенсинтазной активности в клетках мышечной ткани и гексокиназной активности в клетках печени крыс. У контрольных крыс и животных с моделью СД повышалось общее содержание внутриклеточного белка ГЛЮТ-4. Таким образом, механизм гипогликемического действия *P. vulgaris* может быть связан со способностью активных фитокомпонентов данного растения непосредственно влиять на ключевые внутриклеточные звенья углеводного обмена тканей-мишеней инсулина в условиях СД 1-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа; углеводный обмен; *Phaseolus vulgaris*; фасоль; водный экстракт.

M.Y. Kyznietsova, T.I. Halenova, O.M. Savchuk, V.V. Vereschaka, L.I. Ostapchenko

CARBOHYDRATE METABOLISM IN TYPE 1 DIABETIC RATS UNDER THE CONDITIONS OF THE KIDNEY BEAN PODS AQUEOUS EXTRACT APPLICATION

The influence of the aqueous pods extract of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) on indicators of carbohydrate metabolism under the condition of experimental type 1 diabetes in rats was studied. It was shown that long-term oral administration of the extract at a dose of 200 mg/kg to rats leads to the decreasing of blood glucose and glycosylated hemoglobin in the background of chronic hypoinsulinemia conditions. The use of studied extract led to an increase of glycogen synthase activity in rat muscle cells and hexokinase activity in rat liver cells under the conditions of type 1 diabetes. It was estimated that administration of the aqueous extract to control rats and animals with studied model of diabetes increases GLUT-4 protein content in muscle tissue. Thus, the mechanisms of *P. vulgaris* hypoglycemic action can be related with the ability of the particular phytoconstituents directly effect on key intracellular elements of insulin target tissues carbohydrate metabolism under the conditions of type 1 diabetes.

Key words: type 1 diabetes; carbohydrate metabolism; *Phaseolus vulgaris*; kidney bean; aqueous extract.

ESC 'Institute of Biology', Taras Shevchenko National University of Kyiv.

REFERENCES

1. Tkachenko VI. Analysis of the Prevalence and Incidence of Diabetes Mellitus Among the Population of the World and Ukraine. 2003-2013. *Liky Ukraïny pljus*. 2014;4(21):55-9. [Ukrainian].
2. Kuzyshyn AV, Kovalyshyn NV, Almashyna Kh.V. Biochemistry of the Diabetes: 1. Theoretical Part (Re-

- view). Bulletin of the Ivano-Frankivsk Region Physical Society of Ukraine and Prekarpathian University. 2010;9:74-115. [Ukrainian].
3. Balamurugan R, Vendan SE, Aravinthan A, Kim JH. Isolation and structural characterization of 2R, 3R taxifolin 3-O-rhamnoside from ethyl acetate extract of *Hydnocarpus alpina* and its hypoglycemic effect by attenuating hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*. 2015 Feb 17;111:70-81. PubMed PMID: 25698613.
4. Kyznetsova MY, Lavrovska DO, Zhyvolozhnyi AY, Dovgusha OV, Halenova TI, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Effect of Aqueous Extract from *Phaseolus vulgaris* Pods On Cytokine Profile Of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *RJPBCS* 2015 Feb;6(1):1511-20.
5. Luka CD, Olatunde A, Tijjani H, Olisa-Enewe IA. Effect of Aqueous Extract of *Phaseolus vulgaris* L. (Red Kidney Beans) on Alloxan-induced Diabetic Wistar Rats. *IJSIT* 2013;2(4):292-301.
6. Helmstädter AJ. Beans and diabetes: *Phaseolus vulgaris* preparations as antihyperglycemic agents. *J Med Food*. 2010 Apr;13(2):251-4.
7. Zafar M, Naqvi S. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *Int J Morphol*. 2010;28 (1):135-42.
8. Crowther JR. The ELISA Guidebook. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*. 1976;72:248-54.
10. Rybal'chenko VK. Membrane Structure and Function: *Praktykum*. Vyshha shkola. 1988. [Ukrainian].
11. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercisetraigned rats. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93(4):439-45.
12. Danforth W. Glycogen synthase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of glycogen synthesis. *J Biol Chem*. 1965 Feb;240:588-93.
13. Breckenridge B, Crawford E. Glycogen Synthesis from Uridine Diphosphate Glucose in Brain. *J Biol Chem*. 1960;235(11):3054-7.
14. Lenze S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-26.
15. Pari L, Venkateswaran S. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes. *Pharmazie*. 2003;58:916-19.
16. Burcelin R, Printz RL, Kande J, Assan R, Granner DK, Girard J. Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am J Physiol*. 1993 Sep;265(3): 392-401.
17. Cao H, Graves DJ, Anderson RA. Cinnamon extract regulates glucose transporter and insulin-signaling gene expression in mouse adipocytes. *Phytomedicine*. 2010 Nov;17(13):1027-32.

Матеріал надійшов
до редакції 25.03.2015

Дихання та окисне фосфорилювання мітохондрій тканин щурів за перорального введення таурину

Р.Д. Остапів^{1,2}, В.В. Манько¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка;

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів; e-mail: vvmanko@lnu.edu.ua

Досліджували вплив тривалого перорального введення таурину на інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилювання у тканинах печінки, головного мозку, сім'яників і стегнового м'яза щурів. Для цього самців щурів лінії Вістар масою 190–220 г розділили на три дослідні групи, яким щоденно протягом 28 днів вводили питну воду (контрольна група) або розчин таурину у розрахунку 40 чи 100 мг / кг (I та II дослідні групи відповідно). Швидкість дихання визначали полярографічно з використанням електрода Кларка під час окиснення ендogenous субстратів (V_1), за додавання екзогенних α -кетоглутарату (5 ммоль/л) або сукцинату (1 ммоль/л; V_4^S), коли додавали АДФ до кінцевої концентрації 200 мкмоль/л (V_3) та після використання АДФ мітохондріями (V_4^{ATP}). З'ясувалося, що за тривалого введення таурину V_1 зросла у тварин обох дослідних груп у печінці та мозку на 50–60%, проте знижувалась у сім'яниках та м'язах I дослідної групи на 48–73%. У печінці тварин I дослідної групи як за окиснення α -кетоглутарату, так і сукцинату V_4^S , V_3 , та V_4^{ATP} були у 4–7 разів вищими за контроль. У печінці тварин II дослідної групи за окиснення α -кетоглутарату ці показники були вищими на 57–126 %. У м'язах I дослідної групи у разі додавання α -кетоглутарату і сукцинату V_4^S , V_3 , та V_4^{ATP} були нижчими на 41,4–60,9 %, у м'язах тварин II дослідної групи під час окиснення α -кетоглутарату V_3 була на 23,7 % вища. При додаванні сукцинату V_4^S , та V_4^{ATP} зросли на 31–70 % у сім'яниках тварин обох дослідних груп та у мозку I дослідної групи. Однак у мозку тварин II дослідної групи інтенсивність дихання V_4^S була на 38,3 % нижчою. Отже, вплив тривалого введення таурину на інтенсивність споживання кисню мітохондріями є дозозалежним і тканиноспецифічним і, вочевидь, має різне значення та реалізується різними механізмами.

Ключові слова: таурин; інтенсивність дихання мітохондрій; окисне фосфорилювання; печінка; мозок; сім'яники; стегновий м'яз.

ВСТУП

Таурин – сірковмісна амінокислота, котра у високих концентраціях є у всіх тканинах хребетних тварин [1]. Печінка, мозок, сім'яники та м'язи – органи, які найбільше його потребують для виконання функцій. Ця сполука синтезується у печінці і наявна там у найвищих концентраціях та утилізується до таурохолевих кислот [2]. Печінка є центральною ланкою у білковому, ліпідному та вуглеводному обміні, а, отже, може бути маркером для визначення ефекту таурину на інтенсивність споживання кисню мітохондріями. У мозку таурин відіграє роль протек-

тора нейронів і може слугувати стимулятором нервової діяльності [3]. Для проходження нормального сперміогенезу та підтримання існування спермій у сім'янику таурин необхідний у мілімолярних концентраціях, які забезпечують антиоксидантний захист та осмотичну регуляцію [4].

Таурин може підвищувати акумуляційну здатність мітохондрій для Ca^{2+} у нейронах й запобігати некрозу [5]. Ця сполука взаємодіє з першим комплексом дихального ланцюга мітохондрій мозку, попереджуючи інгібування транспорту електронів [6], і знищує вільні радикали кисню [7]. Однак механізм такої

взаємодії достеменно невідомий. Крім того, таурин запобігає апоптозу, спричиненого гіпоксією, і деструкції мітохондрій [8], підвищує їхній трансмембранний потенціал та інтенсифікує синтез АТФ [8]. Він є постійним складником мтРНК і бере участь у синтезі компонентів дихального ланцюга [9]. Разом з цим високі концентрації цієї сполуки можуть негативно впливати на обмінні процеси, активувати апоптоз клітин [8], а дефіцит чи повна відсутність – спричиняють мітохондріальні захворювання (міопатії, енцефалопатії та лактацидоз) [9].

Метою нашого дослідження було вивчити вплив тривалого перорального введення таурину на особливості мітохондріального дихання, окисного фосфорилування та активність окремих ланок електронно-транспортного ланцюга у різних тканинах шурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на самцях шурів лінії Вістар масою 190–220 г. Тварин ділили на три групи – контрольну та дві дослідні, яким протягом 28 діб щоденно вводили у стравохід розчин таурину у розрахунку 40 (І дослідна група) та 100 (ІІ дослідна група) мг/кг відповідно. Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварин декапітували під легким хлороформним наркозом і видаляли

печінку, мозок, сім'яники та стегновий м'яз.

Тканини подрібнювали за допомогою гомогенізатора Поттера-Евельгейма при 4°C у співвідношенні 1 г тканини на 5 мл розчину. Для гомогенізації використовували розчини мозку та сім'яників сахарози (250 ммоль/л) [3], для м'язів – KCl (250 ммоль/л) [10], для печінки такого складу (ммоль/л): сахароза – 250, EGTA – 1, HEPES – 10; pH 7,2 [11]. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв (2000 g), надосадову рідину відбирали та центрифугували протягом 20 хв (9000 g). Після другого центрифугування супернатант зливали, а осад ресуспендували у середовищі, яке використовували для реєстрації дихання (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 10; pH 7,4 [12].

Інтенсивність поглинання кисню мітохондріями визначали полярографічно у термостатованій комірці (25 °C). Швидкість споживання кисню визначали (рис. 1, а, б) за ендогенного дихання (відсутності екзогенних субстратів; V_1 за Чансом [12]), за додавання субстратів окиснення α -кетоглутарату у концентрації 5 ммоль/л чи сукцинату у концентрації 1 ммоль/л (V_4^S), а також за додавання на фоні екзогенних субстратів АДФ (200 мкмоль/л; V_3) та після використання АДФ ($V_4^{\text{АТФ}}$).

На основі отриманих результатів розраховували відношення швидкостей V_3/V_4^S та $V_3/V_4^{\text{АТФ}}$ – дихальні контролю (ДК) за Ларді та Чансом, ефективність фосфорилування АДФ/О та час фосфорилування t_ϕ . Вміст білка у суспензії мітохондрій визначали методом Лоурі ($\lambda_{\text{abc}} = 750 \text{ nm}$) [14].

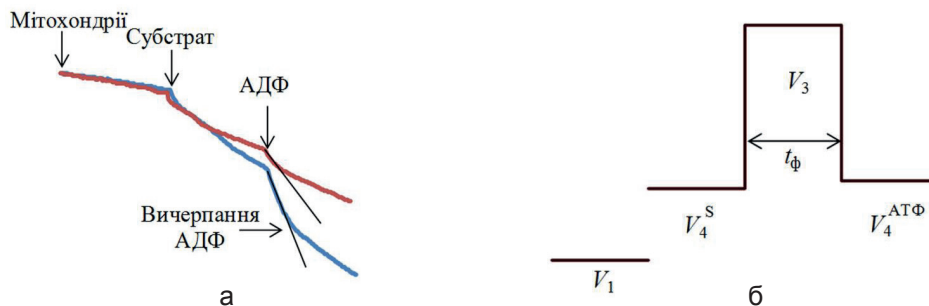


Рис. 1. Протокол експерименту: а – типовий полярографічний запис; б – схема представлення результатів

Результати досліджень на рисунках представлені у вигляді середніх арифметичних значень, а у таблицях – середніх арифметичних значень і їхніх похибок ($M \pm m$), вірогідність змін у всіх визначали за непарним критерієм t Стюдента [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Значення ендogenous дихання (V_1) мітохондрій печінки контрольної групи тварин було в межах $0,087\text{--}0,131$ нмоль $O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка. У разі стимулювання активності комплексу I дихального ланцюга α -кетоглутаратом інтенсивність дихання (V_4^S) зросла на 159,3 % ($P < 0,05$). Внесення АДФ (V_3) стимулювало окисне фосфорилювання і швидкість споживання кисню збільшувалася порівняно з V_4^S на 100 % ($P < 0,01$; рис. 2, а). Після використання

АДФ мітохондріями швидкість поглинання кисню (V_4^{ATP}) зменшувалася щодо значень V_3 на 65,1 % ($P < 0,01$).

Додавання сукцинату у дихальну камеру спричиняло зростання V_4^S на 321,3 % ($P < 0,001$). Внесення АДФ підвищило споживання кисню ще на 102,8 % ($P < 0,01$) відносно V_4^S . Швидкість дихання V_4^{ATP} знизилася на 52,9 % ($P < 0,01$) порівняно з V_3 .

Розраховані ДК за Ларді та Чансом та коефіцієнт АДФ/О як за окиснення α -кетоглутарату, так і сукцинату (табл. 1) згідно з даними літератури були у межах фізіологічної норми [2, 3, 10, 11]. Подібна закономірність спостерігалася і у всіх інших досліджуваних тканинах контрольної та обох дослідних груп. Однак за тривалого введення таурину тваринам суттєво змінювалися швидкості дихання мітохондрій. Зокрема, тривале

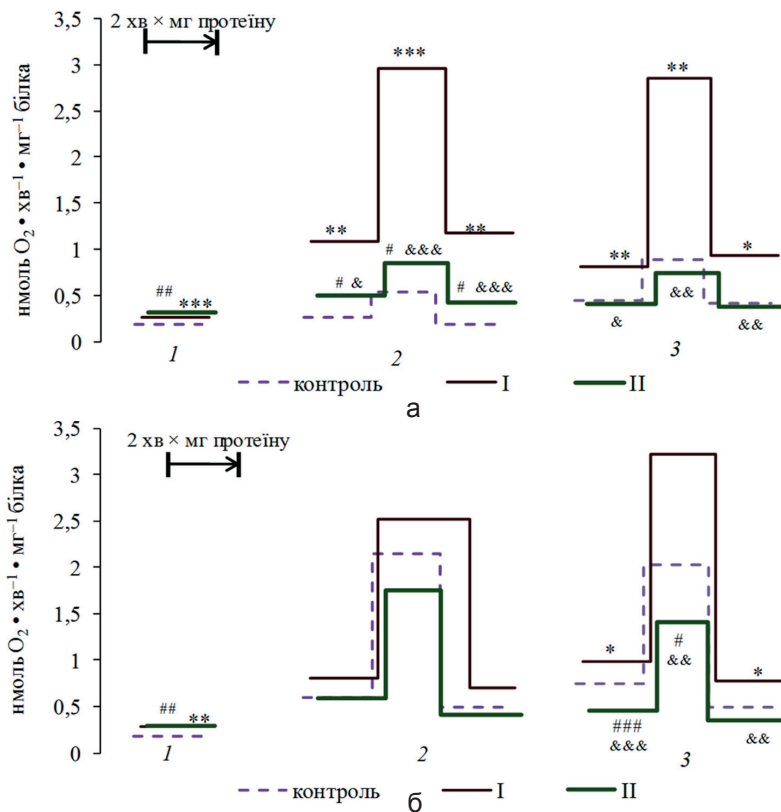


Рис. 2. Інтенсивність дихання мітохондрій: печінки (а) та мозку (б) шурів за ендogenous дихання (1), окиснення α -кетоглутарату (2) і сукцинату (3); I – перша дослідна група, II – друга дослідна група, * статистично вірогідна різниця між показниками тварин I дослідної та контрольної групи, # – II дослідної та контрольної групи, & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$, три – з $P < 0,001$)

введення таурину підвищувало на 78,9 та 47,7 % V_1 мітохондрій печінки тварин I та II дослідних груп порівняно з контролем (див. рис. 2, а). Під час окиснення α -кетоглутарату V_4^S , V_3 , V_4^{ATP} у I дослідній групі зросли у 4–7 разів щодо контролю. Подібна тенденція (з менш вираженими змінами) виявлена у II дослідній групі, де інтенсивність споживання кисню була вищою на 57–126 %. ДК за Ларді у тварин I дослідної групи був на 24,0 % вищим, а у II дослідній групі – на 17,2 % нижчим (див. табл. 1). Якщо зростання ДК у I дослідній групі було пов'язано зі збільшенням V_3 , то зниження у II дослідній групі – зі збільшенням V_4^S .

Активация сукцинатзалежного шляху окиснення у мітохондріях печінки тварин I дослідної групи спричинила аналогічні зміни, однак інтенсифікація дихання була менш вираженою. Споживання кисню мітохондріями печінки тварин II дослідної групи за цих умов було у межах похибки середнього арифметичного. У I дослідній групі ДК за Ларді зріс на 42,3 %, а за Чансом – на 82,6 % порівняно з контролем, через збільшення V_3 . У мітохондріях II дослідної групи тварин ДК за Ларді виявився нижчим, ніж у тварин контрольної та I дослідної груп (див. табл. 1).

Отже, у печінці тварин I дослідної групи інтенсивність дихання зростала у всіх досліджуваних швидкостях за Чансом. Вищі ДК за Ларді та Чансом вказують на збільшену спряженість дихання і окисного фосфорилування у разі додавання сукцинату. Інтенсивність ендogenous дихання у II дослідній групі була вищою за контроль, але V_4^S , V_3 і V_4^{ATP} не відрізнялися від нього. ДК за Ларді у тваринах цієї групи знижувався порівняно з показниками контрольної групи під час додавання α -кетоглутарату, що може вказувати на негативний вплив високих доз таурину на мітохондріальне дихання.

Подібно до тканини печінки V_1 мітохондрій мозку тварин обох дослідних груп був вищим за контроль (рис. 2, б). У разі окиснення α -кетоглутарату не виявлено вірогідної різниці у V_4^S , V_3 , V_4^{ATP} , а також між показниками дихання і окисного фосфорилування у тварин контрольної, I та II дослідних груп (див. табл. 1). Коли окиснювався екзогенний сукцинат, V_4^S мітохондрій мозку тварин I дослідної групи була на 31,8 % вищою, а у щурів II дослідної – нижчою на 38,9 %. Подібна залежність спостерігалась у V_3 , та V_4^{ATP} . Однак незважаючи на підвищення швидкості споживання кисню мітохондріями

Таблиця 1. Показники споживання кисню мітохондріями печінки щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль (n = 3)	Дослідні групи	
		I (n = 5)	II (n = 3)
α-Кетоглутарат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	2,05±0,14	2,54±0,23*	1,70±0,02 ^{#&}
за Чансом (V_3/ V_4^{ATP})	3,14±0,61	2,54±0,16	1,96±0,15 ^{&}
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	3,38±0,30	2,90±0,50	3,29±0,27
Сукцинат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	2,18±0,14	3,70±0,57*	1,79±0,08 ^{&}
за Чансом (V_3/ V_4^{ATP})	2,03±0,12	3,12±0,36*	2,00±0,12
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	2,35±0,53	2,14±0,50	2,49±0,51

Примітка: тут і в табл. 2–4 * статистично вірогідна різниця між показниками тварин I дослідної та контрольної групи, # – II дослідної та контрольної групи, & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$, три – з $P < 0,001$)

мозку за цих умов, спряження між фосфорилуванням та окисненням субстратів і ДК за Ларді та Чансом у тварин І та ІІ дослідної групи лежали у межах похибки середнього арифметичного (табл. 2).

Отже, рівень ендogenousного дихання мітохондрій мозку у обох дослідних групах є вищим, ніж у контролі. При цьому введення таурину щурам обох дослідних груп не впливало на швидкість споживання кисню під час окиснення α -кетоглутарату у всіх досліджуваних станах за Чансом. Коли окиснювався сукцинат, швидкість дихання підвищувалась у тварин І дослідної групи, а у тварин ІІ дослідної групи знижувалася, проте ДК за Ларді та Чансом не змінювалися.

У сім'яниках дослідних груп у разі введення таурину спостерігалась інша закономірність. У тварин І дослідної групи V_1 мітохондрій була нижчою на 48,3 % порівняно з контролем (рис. 3, а). За окиснення α -кетоглутарату V_4^S мітохондрій сім'яників у тварин І та ІІ дослідних груп вірогідно не відрізнялася від контрольних значень. У тварин ІІ дослідної групи V_3 мітохондрій сім'яників була вищою на 29,2 %. Проте швидкість споживання кисню V_4^{ATP} виявилася на 30,6 % нижчою,

порівняно з контролем. ДК за Ларді та Чансом у сім'яниках ІІ дослідної групи були на 95,6 та 101,6 % вищими, оскільки зростало АДФ-стимульоване дихання (табл. 3).

Під час окиснення сукцинату V_4^S мітохондрій сім'яників тварин І дослідної групи збільшувалася на 50,1 %, а у тварин ІІ дослідної групи – на 67,9 % відносно контролю. У обох дослідних групах V_3 вірогідно не відрізнялася від контролю. У тварин І дослідної групи V_4^{ATP} була вищою на 74,5 %, а у тварин ІІ дослідної групи – на 36,3 %. Порівняно з контрольними значеннями За таких умов у тварин І дослідної групи ДК за Ларді та Чансом виявилися нижчими на 30,6 та 46,2% (див. табл. 3).

Отже, тривале введення тваринам ІІ дослідної групи таурину збільшило швидкість V_3 мітохондрій сім'яників, коли окиснювався екзогенний α -кетоглутарат. При цьому зростали й ДК за Ларді та Чансом. Під час використання сукцинату як субстрату окиснення зростали V_4^S і V_4^{ATP} в обох дослідних групах, що у І дослідній групі спричиняло зниження ДК за Ларді та Чансом.

Подібно до сім'яників, тривале введення таурину тваринам І дослідної групи знижува-

Таблиця 2. Показники споживання кисню мітохондріями мозку шурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль (n = 3)	Дослідні групи	
		I (n = 5)	II (n = 3)
α-Кетоглутарат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	4,21±0,40	3,22±0,36	3,26±0,33
за Чансом (V_3/ V_4^{ATP})	4,52±0,69	4,09±0,74	4,10±0,37
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	3,38±0,30	2,99±0,59	3,02±0,52
Сукцинат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	2,69±0,10	3,32±0,47	3,18±0,58
за Чансом (V_3/ V_4^{ATP})	4,20±0,10	4,10±0,12	4,10±0,25
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	2,35±0,53	2,34±0,39	2,07±0,30

Таблиця 3. Показники споживання кисню мітохондріями сім'яників шурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль (n = 3)	Дослідні групи	
		I (n = 5)	II (n = 3)
α-Кетоглутарат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	2,16±0,20	1,99±0,45	4,35±0,62 ^{#&}
за Чансом (V_3/V_4^{ATP})	3,00±0,21	2,26±0,36	5,87±0,72 ^{#&}
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	3,38±0,30	3,05±0,87	3,27±0,30
Сукцинат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	3,95±0,37	2,56±0,22*	3,69±0,88
за Чансом (V_3/V_4^{ATP})	3,48±0,42	2,07±0,40*	3,85±0,75
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	2,35±0,53	2,13±0,25	2,13±0,31

ло інтенсивність V_1 стегнового м'яза на 43,5% (рис. 3, б). Під час окиснення α -кетоглутарату V_4^S , V_3 та V_4^{ATP} у I дослідній групі були на 41,4–60,9 % нижчі за контроль. Водночас у тканині стегнового м'яза не було зафіксовано

різниці між інтенсивністю дихання мітохондрій сім'яників тварин II дослідної групи та ДК за Ларді та Чансом в обох дослідних групах (табл. 3).

Коли сукцинат окиснювався мітохонд-

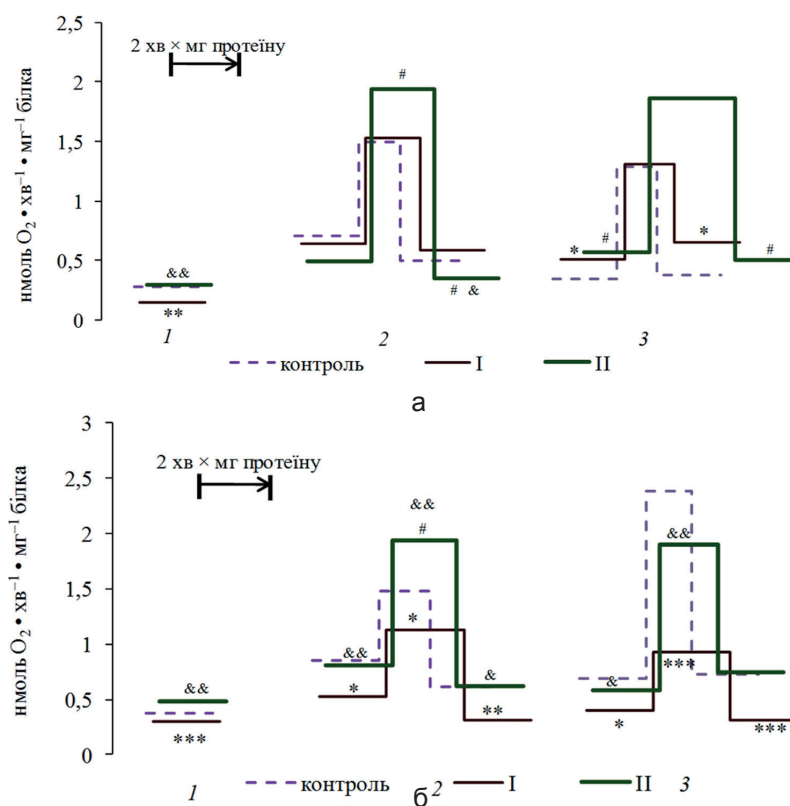


Рис. 3. Інтенсивність дихання мітохондрій: сім'яників (а) та стегнового м'яза (б) шурів за ендогенного дихання (1), окиснення α -кетоглутарату (2) і сукцинату (3); I – перша дослідна група, II – друга дослідна група, * статистично вірогідна різниця між показниками тварин I дослідної та контрольної групи, # – II дослідної та контрольної групи, & – I та II дослідних груп (один значок – з $P < 0,05$, два – з $P < 0,01$, три – з $P < 0,001$)

ріями стегнового м'яза I дослідної групи спостерігалася подібна залежність. Найістотніше знижувалась V_3 – на 23,7 %. У м'язах II дослідної групи V_4^S , V_3 та V_4^{ATP} були на рівні контролю. У обох дослідних групах вірогідно не змінились ДК за Ларді та Чансом (табл. 4).

Таким чином, під час окиснення як екзогенного α -кетоглутарату, так і сукцинату інтенсивність дихання мітохондрій стегнового м'яза у тварин I дослідної групи знижувалась. У тварин II дослідної групи за додавання α -кетоглутарату V_3 зростала, незважаючи на це ДК за Ларді та Чансом не відрізнялися від контролю.

Тривале пероральне введення таурину тваринам спричиняє різні зміни мітохондріального дихання у різних тканинах і залежить від типу окисного метаболізму. Відомо, що за випоювання щурам таурину в їхній крові знижується концентрація глюкози та підвищується активність лактатдегідрогенази [17]. Такі зміни, як і зареєстроване нами збільшене V_1 у тканині печінки (див. рис. 2, а) та мозку (див. рис. 2, б) обох дослідних груп тварин, вказують на підвищений рівень метаболізму в організмі.

Для полегшення аналізу змін мітохондріального дихання за окиснення екзогенних субстратів отримані результати представлено у вигляді нормалізованих величин на рис. 4. Найбільші зміни показників дихання мітохондрій за перорального введення таурину зареєстровані у печінці тварин I дослідної

групи, де інтенсивність споживання кисню зросла більше ніж у 6 разів (див. рис. 4, а).

Ймовірно, що такий результат є впливом декількох чинників. Зокрема таурин спричинює збільшення вмісту Ca^{2+} у мітохондріях [6]. Оскільки α -кетоглутаратдегідрогеназа є Ca^{2+} -залежним ферментом [11], то зростання вмісту іонів призведе до інтенсифікації окиснення α -кетоглутарату, що спостерігається у мітохондріях печінки тварин II дослідної групи. Однак це не пояснює збільшення споживання кисню у разі додавання сукцинату у I дослідній групі. Зміни у диханні мітохондрій печінки можуть бути результатом інтенсифікації синтезу білків дихального ланцюга. Існують дані, які підтверджують входження таурину до складу мтРНК [9]. Більше того, у дослідженнях на культурах клітин виявлено, що надлишок таурину в середовищі спричиняє інтенсифікацію синтезу компонентів електронно-транспортного ланцюга та призводить до посилення синтезу АТФ і збільшення мембранного потенціалу мітохондрій [9].

Дещо інша картина спостерігається у мозку (див. рис 4, б). Введення таурину не впливає на НАД-залежне дихання. А у разі окиснення сукцинату V_4^S , V_3 , V_4^{ATP} мітохондрій мозку I дослідної групи зростають. Це може бути наслідком збільшеної потреби мозку у швидкому синтезі АТФ. Результати позитивного впливу таурину підтверджують

Таблиця 4. Показники споживання кисню мітохондріями стегнового м'яза щурів та окисного фосфорилування за окиснення екзогенних α -кетоглутарату та сукцинату ($M \pm m$)

Показники	Контроль (n = 3)	Дослідні групи	
		I (n = 5)	II (n = 3)
α-Кетоглутарат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	1,74±0,07	2,16±0,15	2,51±0,34
за Чансом (V_3/V_4^{ATP})	2,43±0,16	3,74±0,43	3,20±0,40
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	3,38±0,30	3,29±0,39	3,15±0,34
Сукцинат			
Дихальний контроль			
за Ларді (V_3/V_4^S)	3,31±0,38	2,40±0,38	3,31±0,57
за Чансом (V_3/V_4^{ATP})	3,48±0,26	3,00±0,25	2,60±0,23
АДФ/О, мкмоль АДФ/нмоль О ₂	2,35±0,53	2,46±0,52	2,44±0,55

досліди, проведені на нейронах. За їхньої інкубації у середовищі з таурином підвищується мітохондріальна ємність Ca^{2+} , мембранний потенціал мітохондрій і синтез АТФ [2]. Але як свідчать наші результати досліджень, V_4^S та V_3 у мітохондріях мозку II дослідної групи знижуються (див. рис. 4, б). Це може бути зумовлено розвитком гіпоксії, оскільки для сукцинатзалежного шляху окиснення необхідно більше кисню і він чутливий до його нестачі [11]. Розвиток гіпоксії передбачає збільшення активності O_2 -незалежного шляху утилізації глюкози і утворення лактату з подальшим транспортуванням у печінку. Протилежні за напрямом процеси розвиваються у сім'яниках та стегновому м'язі. Зниження V_1 мітохондрій сім'яників тварин I дослідної групи (див. рис. 2, а) та всіх інших швидкостей дихання

у м'язах (див. рис. 4, г) може бути результатом збільшення активності O_2 -незалежного шляху утилізації глюкози. Внаслідок інтенсифікації цього шляху підвищується продукція лактату, тому активність лактатдегідрогенази має теж зростати – для перетворення лактату і пірувату. Лактат транспортується у печінку, перетворюється на піруват, який надходить у цикл Кребса [11]. Це частково пояснює можливу причину інтенсифікації мітохондріального дихання у печінці.

З іншого боку, таурин є амінокислотою, що опосередковано підвищує активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту [1]. Збільшення активності ферментів антиоксидантного захисту може бути результатом посилення процесів перекисного окиснення ліпідів. За таких умов мембрана мітохондрій ймовірно

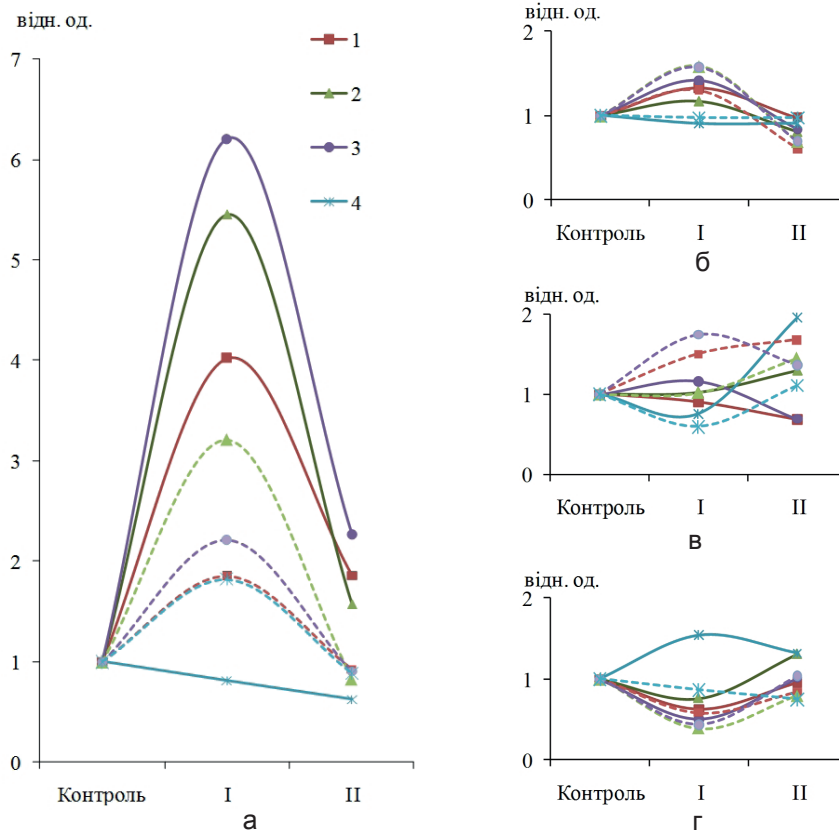


Рис 4. Нормалізовані щодо контролю показники дихання мітохондрій за Чансом у разі окиснення: α -кетоглутарату (неперервна лінія) та сукцинату (пунктирна лінія): за одиницю приймали відповідні показники у контролі; а – печінка, б – мозок, в – сім'яники, г – стегновий м'яз; 1 – швидкість дихання V_4^S , 2 – V_3 , 3 – V_4^{ATP} , 4 – дихальний контроль за Чансом (за Ларді не представлено)

пошкоджується і інтенсивність дихання знижується. Надмірна активація ензимів анти-оксидантного захисту призводить до зниження інтенсивності мітохондріального дихання.

У сім'яниках тварин I дослідної групи знижуються ДК під час окиснення сукцинату. Це збігається з дослідом на мітохондріях печінки, де таурин частково знижує спряження дихання з окисним фосфорилуванням (див. рис. 4, в). У тварин II дослідної групи ДК за стимуляції α -кетоглутаратом зростають у 2–2,5 рази порівняно з контролем. Такі результати вказують на участь таурину у перебудові мембрани. Адже він може сприяти ацилюванню ненасичених жирних кислот, захищаючи їх від вільних радикалів кисню [1]. Збільшується й V_3 , що свідчить про збільшену потребу у АТФ, яка може використовуватись на синтетичні процеси, наприклад сперміогенез [5].

Отже, пероральне введення таурину призводить до зростання інтенсивності дихання у тканині печінки обох дослідних груп тварин, мозку I дослідної групи та сім'яників II дослідної групи. При цьому пригнічення інтенсивності дихання у м'язах та ДК у сім'яниках I дослідної групи вказує на зниження утворення АТФ цими тканинами. Тому вплив тривалого введення таурину на інтенсивність дихання мітохондрій та окисне фосфорилування залежить від дози та типу тканини, і, вочевидь, реалізується різними механізмами. Зокрема ці зміни можуть бути спричинені зсувом рівноваги між киснезалежним і кисненезалежним метаболізмом, зростанням мембранного потенціалу мітохондрій, зміною Ca^{2+} -гомеостазу чи збільшенням кількості мітохондріальних білків.

Р.Д. Остапів^{1,2}, В.В. Манько¹

ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ТАУРИНА

Исследовали влияние длительного введения таурина на интенсивность дыхания митохондрий в тканях печени, головного мозга, семенников и бедренной мышцы крыс.

Для этого самцов крыс линии Вистар массой 190–220 г разделили на три исследовательские группы, которым ежедневно в течение 28 сут вводили питьевую воду (контрольная группа) или раствор таурина в расчете 40 или 100 мг / кг (I и II экспериментальные группы соответственно). Интенсивность дыхания определяли полярографически с использованием электрода Кларка при окислении эндогенных субстратов (V_1), добавлении экзогенных α -кетоглутарата (5 ммоль/л) или сукцината (1 ммоль/л, V_4^S), АДФ до конечной концентрации 200 мкмоль/л (V_3) и после использования АДФ (V_4^{ATP}). Выяснилось, что длительное введение таурина приводило к повышению на 50–60% V_1 митохондрий у животных обеих экспериментальных групп в печени и мозгу, но она снизилась на 73–48% в семенниках и мышцах животных I экспериментальной группы. В печени животных этой группы как при окислении α -кетоглутарата, так и сукцината V_4^S , V_3 , и V_4^{ATP} были в 4–7 раз выше контроля. При окислении α -кетоглутарата в печени животных II экспериментальной группы V_4^S , V_3 , и V_4^{ATP} были на 57–126 % выше. В мышцах крыс I экспериментальной группы V_4^S , V_3 , и V_4^{ATP} при добавлении α -кетоглутарата и сукцината были ниже на 41,4–60,9 % относительно контроля. В мышцах животных II экспериментальной группы при добавлении α -кетоглутарата V_3 была выше на 23,7 % контроля. При добавлении сукцината V_4^S и V_4^{ATP} возросли на 31–70 % в семенниках животных обеих групп и в мозгу крыс I экспериментальной группы. Однако в мозгу животных II экспериментальной группы V_4^S была ниже на 38,3 %. Таким образом, установлено дозозависимое и тканеспецифическое влияние длительного введения таурина на интенсивность потребления кислорода митохондриями. Ключевые слова: таурин; интенсивность дыхания митохондрий; печень; головной мозг; семенники; бедренная мышца.

R.D. Ostapiv^{1,2}, V.V. Manko¹

MITOCHONDRIA RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION OF RAT TISSUES AT TAURINE PER ORAL INJECTION

Taurine – sulphur-containing amino acid is a necessary component of mitochondrial matrix, where it maintains pH and is included in mitochondrial transport RNA. But still it is unclear how taurine influences on ATP synthesis and mitochondrial respiration chain components activity. Thus, the aim of the work was to study the effect of long-term per oral taurine injection on mitochondrial respiration intensity in rat tissues: liver, brain, testes and thigh muscle. For this purpose male Wistar rats, that weighted 190–220 g, were divided in three groups, daily during 28 days they were injected drinking water (control group) or taurine solution 40 and 100 mg per kg of body weight (I and II research groups, correspondingly). Respiration intensity was measured polarographically with use of Clark electrode at endogenic substrates oxidation (V_1), with exogenic

α -ketoglutarate (5 mmol/l) or succinate (1 mmol/l; V_4^S) addition, at ADP addition to concentration 200 μ mol/l (V_3), and after ADP depletion (V_4^{ATP}). Phosphorylation time, oxidative phosphorylation efficacy (ADP/O), respiratory controls by Lardy (V_3/V_4^S) and Chance (V_3/V_4^{ATP}) were calculated. It was found that long term taurine injection increased V_1 in animal brain and liver of both research groups, but it decreased in testes and muscles of I research group. In liver of I research group animals, when both α -ketoglutarate and succinate were oxidated, V_4^S , V_3 and V_4^{ATP} were 4–7 times larger than in control. At the same time, Lardy respiratory control increased at succinate oxidation, this may indirectly point on increased coupling between respiration and oxidative phosphorylation. In liver of II research group animals V_4^S , V_3 and V_4^{ATP} when α -ketoglutarate was oxidated were significantly higher than in control. In muscles of I research group V_4^S , V_3 and V_4^{ATP} when α -ketoglutarate and succinate was added were lower than in control. In thigh muscle of II research group animals at α -ketoglutarate oxidation V_3 was higher than in control. When succinate was added V_4^S and V_4^{ATP} increased in testes mitochondria of both research groups and in brain of I research group. But in II research group animals mitochondria V_4^S brain was lower than in control. At the same time, coupling between respiration and oxidative phosphorylation in brain was on control level, in testes of I research group it was lower. In testes of II research group animals at α -ketoglutarate addition increased respiratory controls. Thus, the effect of long term per oral taurine injection on mitochondria respiration intensity is dose-dependent and tissue-specific and, obviously, has different significance and is implemented by different mechanisms.

Key words: taurine; mitochondrial respiration intensity; liver; brain; testes; thigh muscle.

¹Ivan Franko National University of Lviv;

²State Scientific Controlling Institute of Veterinary Medical Products and Feed Additives, Lviv

REFERENCES

1. Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB. Physiological role of taurine – from organism to organelle. *Acta Physiol.* 2015;213:191–212.
2. Hansen S, Birkedal H, Wibrand F. Taurine and regulation of mitochondrial metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2015;883(1):397–405.
3. Palmi M, Youmbia GT, Fusia F. et al. Potentiation of mitochondrial Ca^{2+} sequestration by taurine. *Biochem Pharm.* 1999;58:1123–31.
4. Ozasa H, Gould KG. Protective effect of taurine from osmotic stress on chimpanzee spermatozoa. *Arch Androl.* 1982;9:121–6.
5. Xu S, He M, Zhong M, Wang S. et al. The neuroprotective effects of taurine against nickel by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function in cortical neurons. *Neu Let.* 2015;590:52–57.
6. Chou Ch, Lin H, Hwang L. Taurine resumed neuronal differentiation in arsenite-treated N2a cells through reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction. *Amino Acids.* 2015;47(4):735–44.
7. Jang J, Zong X, Wu G, Lin S. et al. Taurine increases testicular function in aged rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Amino Acids.* 2015;47(8):1549–1558.
8. Zhang X, Shuo T, Wang Y, Xu B. Mechanism of taurine-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2014;46:261–272.
9. Mu W, Zhang T, Jiang B. An overview of biological production of L-theanine. *Biotech Adv.* 2015;33:335–42.
10. Scholz TD, Balaban RS. Mitochondrial $\text{F}_1\text{-ATPase}$ activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994; 266:396 – 403.
11. Kondrashova MN. Transeaminase cycle of substrate oxidation, as a mechanism to hypoxia adaptation. *Pharmacol Corr Hypox Stag.* 1987;1:51–70. [Russian].
12. Della-Morte D, Kunjan RD, DeFazio AR. et al. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a SIRT1 – UCP2 pathway. *Neuroscience.* 2009;159(3): 993–1002.
13. Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1955; 216: 383–393.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fair AL. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
15. Derkach MP, Gumenitskiy RY, Chaban MY. Variation statistics course. Kyiv: High school, 1977. [Ukrainian].
16. Schaffer SW, Azuma J, Mozaffar M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Phys Pharm.* 2009; 87: 91–99.
17. Ribeiro RA, Bonfleur M L, Amaral AG. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25:370–9.

Матеріал надійшов до
редакції 05.05.2015

Вплив обмеження харчування в період розвитку *Drosophila melanogaster* на активність ферментів системи антиоксидантного захисту

О. Г. Забуга, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман

ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ;
e-mail: narelem12@gmail.com

*Раніше ми продемонстрували, що 50%-ве зменшення вмісту харчових компонентів у поживному субстраті порівняно з контролем (100 %) призводить до збільшення на 11 % середньої тривалості життя самців *Drosophila melanogaster*. Для вивчення біохімічних змін, які можуть виникати за таких умов, у представленому дослідженні ми визначили активність ферментів системи антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) та каталази. Застосування обмеження харчування на стадії розвитку викликало вірогідне збільшення активності обох ферментів у самців. Крім того, в особин обох статей, вихованих за умов вмісту 50 % харчових компонентів у поживному середовищі, виявили зниження рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилювання. Результати дослідження дають змогу припустити, що зміни активності СОД і каталази можуть відігравати роль у спричиненому обмеженням харчування на стадії розвитку збільшенні тривалості життя дрозофіл.*
Ключові слова: *Drosophila melanogaster*; обмеження харчування; розвиток; супероксиддисмутаза; каталаза; кінцеві продукти глікозилювання; тривалість життя.

ВСТУП

Відомо, що за допомогою зміни дієтичних умов можна впливати на тривалість життя багатьох видів лабораторних тварин. Незважаючи на широкий спектр досліджень з цього приводу, механізми, які лежать в основі ефектів обмеження харчування, залишаються не з'ясованими [1, 2].

Нещодавно нами було показано, що обмеження харчування на стадії личинки *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) може призводити до збільшення тривалості життя імаго [3]. Важливою особливістю всіх наших досліджень є те, що ми застосовуємо не якісне (скорочення вмісту білка або інших речовин), а кількісне обмеження раціону, тобто пропорційно зменшуємо концентрацію усіх харчових компонентів у поживному середовищі на стадії розвитку плодів мушок. У результаті при вирощуванні личинок дрозофіли у субстраті, який містив білкові

та вуглеводні речовини у концентраціях 50 і 60 % порівняно зі стандартним поживним середовищем, ми виявили суттєве збільшення середньої тривалості життя самців, а максимальної – у всіх особин чоловічої статі, які розвивались за умов будь-якого вмісту харчових компонентів у діапазоні 90-10 % порівняно зі 100%-м контролем. У самиць подібного ефекту зафіксовано не було [3].

Роль окиснення в ефектах, пов'язаних із впливом обмеження харчування на тривалість життя, досі майже не досліджувалась. Як відомо, ендогенні антиоксиданти, зокрема, ферменти супероксиддисмутази (СОД) та каталази розкладають активні форми кисню у серії хімічних реакцій [4]. Система антиоксидантного захисту може відігравати важливу роль у збільшенні тривалості життя організму.

СОД каталізує розклад супероксиду на кисень і перекис водню, який потім розкла-

© О. Г. Забуга, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман

дає другий фермент – каталаза – на воду та кисень. Механізм скоординованої дії обох ферментів забезпечує ефективний захист клітинних структур від окисного руйнування [5].

Було виявлено, що окремі «довгоживучі» штами *Drosophila* мають підвищений вміст антиоксидантних ферментів [6]. Зважаючи на це, деякі дослідження спрямовувалися на спроби збільшення тривалості життя за допомогою штучного підвищення активності антиоксидантних ферментів на генетичному рівні. Так, було показано, що трансгенні *D. melanogaster* із надекспресією Cu/ZnСОД, або СОД1 і каталази мали на 34 % більшу тривалість життя і затримку процесу старіння [7]. Водночас надекспресія СОД1 у рухових нейронах збільшує цей показник на 40 % [8], надекспресія мітохондріальної форми СОД – СОД2, або MnСОД, – лише деякою мірою подовжує життя плодових мушок, проте не уповільнює темп старіння [9].

КПГ утворюються внаслідок глікозилювання, тобто реакції приєднання вільних цукрів до протеїнів. У *D. melanogaster* вміст цих побічних речовин значно підвищується із віком. Так, молоді мушки у віці 10 діб містять на 44 % менше КПГ порівняно із 75-добовими [10]. І хоча було виявлено можливість істотно зменшити вміст побічних продуктів у тканинах «старіючих» дрозофіл додаванням до поживного середовища протягом онтогенезу комах аміногуанідину, це не впливало на їхню тривалість життя [10].

Мета нашої роботи – визначити активність двох антиоксидантних ферментів – СОД і каталази, а також кінцевих продуктів глікозилювання – КПГ (advanced glycation end-products, AGEs) у дорослих дрозофіл, яких на стадії личинки утримували за умов 50%-го обмеження харчування.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на аутбредній популяції *Oregon-R* виду *D. melanogaster*. Популяцію розведення мушок вирощували

у «повноцінному» поживному середовищі, тобто із нормальним співвідношенням усіх компонентів харчування: на 100 мл води – 4 г сахарози, 2,5 г сухих дріжджів, 4 г манної крупи, із додаванням 1 г агар-агару та 1 мл 10%-го спиртового розчину ніпагіну (для пригнічення росту цвілі). Всіх комах утримували за стандартних умов – у термостаті з температурою $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, при стабільній вологості та режимі освітлення 12 год світла / 12 год темряви за добу. Протягом 8 год після вильоту з лялечок, мушок розділяли на самиць і самців та до здійснення експериментальних маніпуляцій утримували окремо для запобігання схрещувань.

Личинок наступного покоління утримували у поживному середовищі, що містило 50 % харчових компонентів порівняно зі стандартним, але із нормальною кількістю агар-агару й ніпагіну. Розвиток комах відбувався у скляних банках об'ємом 200 мл (4 штуки на групу), за щільності популяції 200-250 личинок у кожній. Всіх мушок на стадії імаго переводили на 100%-й поживний субстрат та утримували за стандартних умов.

Визначення активності СОД, каталази та вмісту КПГ здійснювали в імаго у віці 15 і 20 діб. Ферментні екстракти готували гомогенізацією 5 дорослих мушок у 300 мл охолодженого льодом розчину із 0,05 моль/л фосфатного буфера (pH 7,4). Зразки центрифугували 10 хв при 4°C і у супернатанті вимірювали вміст загального білка за методикою Бредфорда [11].

Активність СОД визначали непрямим методом [12] за рівнем інгібування реакції супероксидзалежного окиснення кверцетину за наявності N',N',N',N' -тетраметилетилендіаміну. Екстракт мушок (5 мкл) із концентрацією 200 мкг/мл загального білка вносили у 150 мкл реакційної суміші, що містила 20 ммоль/л калій-фосфатний буфер (pH 10), 0,8 ммоль/л TEMED, 0,8 ммоль/л ЕДТА і 5 мкл вихідного розчину кверцетину (1,5 мг кверцетину у 10 мл диметилсульфоксиду). Розчин інкубували впродовж 20 хв при кім-

натній температурі. Паралельно готували контрольну суміш без додавання екстракту мушок. Концентрацію кверцетину визначали вимірюванням довжини хвилі за значенням 406 нм на початку та у кінці реакції за калібрувальною кривою. Активність СОД визначали як дебіт неокисненого кверцетину між експериментальними та контрольними показниками і нормували з урахуванням часу і вмісту загального білка в екстракті.

Активність каталази в екстрактах мушок визначали колориметричним методом. Екстракт інкубували із перекисом водню (H_2O_2) впродовж 1 хв при 37°C, після чого зупиняли реакцію додаванням розчину молібдату амонію $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$. Інтенсивність забарвлення жовтого комплексу вимірювали при довжині хвилі 405 нм на спектрофотометрі. Концентрацію перекису водню розраховували за калібрувальною кривою, і за рівнем його розкладання визначали активність ферменту, яку виражали в умовних одиницях [13].

Вміст КППГ визначали за методикою, описаною Oudes та співавт. [10]. Заморожених мушок гомогенізували в 1 мл 0,2 моль/л фосфатного буфера (pH 7,4) із додаванням 10 ммоль/л ЕДТА. Очищений супернатант відокремлювали та переварювали 24 год при 37°C у 10 мг/мл трипсину. Потім гомогенат розбавляли до оптичної щільності меншої ніж 0,05 при довжині хвилі 365 нм та вимірювали на флуоресцентному анізотропному спектрометрі, при $\lambda_{зб.} = 365$ нм та $\lambda_{ем.} = 440$ нм. Концентрацію КППГ розраховували

за калібрувальною кривою, побудованою з використанням штучних КППГ та нормували за вмістом загального білка. Застосовані довжини хвиль збурення та емісії демонстрували рівень накопичення КППГ у тканинах організму [10].

Визначення всіх біохімічних параметрів здійснювали у п'яти повторах. Статистичне опрацювання отриманих результатів реалізоване у програмі Statistica 6.0. Рівень статистичної значущості визначали за методом χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі біохімічні параметри визначали у дорослих дрозофіл. У самців, вирощених із вмістом 50 % харчових компонентів у поживному середовищі, виявлено підвищення активності СОД на 15-ту і 20-ту доби життя, а також каталази у 15-добовому віці (табл. 1). У самиць вірогідної різниці в активності обох ферментів не зафіксовано в усіх вікових групах.

Варто зазначити, що окремі дослідження свідчать про відсутність позитивного впливу на темп старіння від підвищення активності ендогенних антиоксидантних систем. Так, було показано, що надекспресія СОД2 і каталази зменшувала рівень мітохондріального вивільнення активних форм кисню, підвищуючи таким чином стійкість до окисного стресу у дрозофіл, але їхня тривалість життя при цьому зменшувалася [5]. Продемонстровано, що збільшення цього показника, викликане низькокалорійним харчуванням, не залежить

Таблиця 1. Активність супероксиддисмутази (мкмоль/хв*мг) і каталази (мкмоль/хв*мг) у дрозофіл різного віку після розвитку у поживному середовищі із вмістом 50 % харчових компонентів ($M \pm m$)

Показник	Самці		Самиці	
	100%	50%	100%	50%
Супероксиддисмутаза				
15 діб	0,105±0,012	0,140±0,006*	0,097±0,012	0,075±0,005
20 діб	0,090±0,010	0,146±0,014*	0,120±0,009	0,286±0,148
Каталаза				
15 діб	0,574±0,037	0,773±0,068*	0,508±0,040	0,369±0,040
20 діб	1,127±0,195	0,797±0,072	0,688±0,167	0,568±0,083

Примітка. Тут і у табл. 2: * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таблиця 2. Вміст кінцевих продуктів глікозилювання (мг/мл) у *D. melanogaster* після розвитку у поживному середовищі із 50 % харчових компонентів (M±m)

Показник	Самці		Самиці	
	100%	50%	100%	50%
Кінцеві продукти глікозилювання				
15 діб	63,24±5,11	68,95±9,79	15,86±1,85	10,82±2,07
20 діб	100,45±13,66	58,14±9,18*	22,89±2,69	12,79±1,42*

від зниження вмісту СОД1. Разом із тим виявлено, що вона необхідна для подовження життя за умов обмеження концентрації білка у харчуванні, при якому наявна підвищена кількість цукру [4].

Окрім каталази та СОД ми досліджували рівень накопичення КППГ в імаго плодових мушок, вирощених із вмістом 50 % харчових компонентів у поживному середовищі. Вірогідне зменшення значення показника виявили у дрозоділ обох статей віком 20 діб, яких утримували в умовах обмеження харчування на стадії розвитку (табл. 2).

Важливо зазначити, що Jacobson зі співавт. [14] запропонували використовувати рівень накопичення КППГ як біомаркер старіння у *Drosophila*. Показано, що штучне додавання цих речовин до поживного середовища плодових мушок провокує у них зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, яке, у свою чергу, супроводжується прискоренням старіння [15].

Можна припустити, що виявлені у цій роботі зміни на біохімічному рівні (збільшення активності СОД і каталази та зменшення рівня накопичення КППГ у *D. melanogaster*, які розвивались за умов обмеження харчування) можуть відігравати роль у продемонстрованому нами раніше збільшенні тривалості життя. Оскільки ферменти системи антиоксидантного захисту є досить нестійкими сполуками, то після вилуплення з лялечок мушки у віці 15-20 діб не можуть мати молекули цих ферментів, які синтезуються впродовж преімагінального розвитку. Зважаючи на це, ми припускаємо, що такі зміни на біохімічному рівні пояснюються обмеженням харчування на стадії розвитку довгостроко-

вими епігенетичними модифікаціями (тобто, змінами активності генів, не пов'язаних зі змінами структури ДНК). Можливість подібних перебудов, викликаних стресами на етапі розвитку, продемонстрована у наших попередніх працях [16]. Надалі ми плануємо більш детальне вивчення механізмів, що опосередковують збільшення тривалості життя внаслідок обмеження харчування на стадії розвитку.

**О. Г. Забуга, А. К. Коляда, В. М. Кухарський,
А. І. Бажинова, А. М. Вайсерман**

ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ПИТАНИЯ В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER* НА АКТИВНОСТЬ ФЕР- МЕНТОВ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

Ранее мы показали, что 50%-е уменьшение содержания пищевых компонентов в питательном субстрате по сравнению с контролем (100 %) способствует увеличению на 11 % средней продолжительности жизни самцов *Drosophila melanogaster*. Для изучения биохимических изменений, которые могут возникать в таких условиях, в данном исследовании мы определили активность ферментов системы антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Ограничение питания на стадии развития привело к достоверному увеличению активности обоих ферментов у самцов. Кроме того, у представителей обоих полов, выращенных в условиях 50%-го содержания пищевых компонентов в питательной среде, выявили снижение уровня накопления конечных продуктов гликозилирования. Результаты исследования позволяют предположить, что изменения активности СОД и каталазы могут играть роль в вызванном ограничением питания на стадии развития увеличении продолжительности жизни дрозодил. Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; ограничение питания; развитие; супероксиддисмутаза; каталаза; конечные продукты гликозилирования; продолжительность жизни.

**O. G. Zabuga, A. K. Koliada, V. M. Kukharskyy,
A. I. Bazhynova, A. M. Vaiserman**

THE EFFECT OF DIETARY RESTRICTION DURING DEVELOPMENT OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* ON THE ACTIVITY OF AN- TIOXIDANT SYSTEM ENZYMES

In the previous study we demonstrated that dietary restriction only at the development stage of *Drosophila melanogaster* may impact the life span of adult flies. It was important that we didn't use qualitative (restriction of proteins or other macro- or microelements) and not a calorie restriction as well, but quantitative dietary restriction that was the proportional reduction of all food components in the larval medium. In the situations when the larvae were reared in the medium types, that contained protein and carbohydrate components in concentrations of 90-10% of food components compared to the standard one (100%), the males were characterised with the significant increase in the maximum life span. The average life span was also increased, but only in those male individuals that developed in the medium types, that contained 50% and 60% of food components compared to controls. Such an effect we haven't detected in the female flies.

To study the biochemical changes associated with the physiological effects we have determined the activity of the antioxidant enzymes – superoxide dismutase (SOD) and catalase. In the male flies the 50% dietary restriction implemented during the development has led to the significant increase in a SOD and catalase activity. Also the flies of both sexes reared in the medium with the 50% of food components have been characterised with the reduction in the accumulation of glycation end products. According to these results, we suggest that the changes in the activity of antioxidant enzymes may play a role in the increase of the flies life span caused by the dietary restriction during the development.

Key words: *Drosophila melanogaster*; dietary restriction; development; superoxide dismutase; catalase; advanced glycation end products; life span.

*State Institution "D.F. Chebotarev Institute of Gerontology
NAMS of Ukraine", Kyiv;*

REFERENCES

1. Ja WW, Carvalho GB, Zid BM, Mak EM, Brummel T, Benzer S. Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:18633-7.
2. Tatar M. The plate half-full: status of research on the mechanisms of dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*. 2011;46:363-8.
3. Vaiserman AM, Fedorenko EA, Koshel NM, Miehova LV, Pisaruk AV, Bazhynova AI, Koliada AK, Zabuga OG, Voytenko VP. The effect of components' restriction in

- diet during development stage on the life span of *Drosophila melanogaster*. *Problemy starenija i dolgoletija*. 2011;20(4):361-70. [In Russian]
4. Sun X, Komatsu T, Lim J, Laslo M, Yolitz J, Wang C, Poirier L, Alberico T, Zou S. Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*. 2012;11(5):783-93.
5. Bayne AC, Mockett RJ, Orr WC, Sohal RS. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila*. *Biochem J*. 2005;391(2):277-84.
6. Hari R, Burde V, Arking R. Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-lived strain of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*. 1998;33(3):227-37.
7. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1994;263(5150):1128-30.
8. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat Genet*. 1998;19(2):171-4.
9. Fleming JE, Reveillaud I, Niedzwiecki A. Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. *Mutat Res*. 1992;275(3-6):267-79.
10. Oudes AJ, Herr CM, Olsen Y, Fleming JE. Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1998;100:221-9.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int*. 1989;19(5):1117-24.
13. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991;196(2-3):143-51.
14. Jacobson J, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Magwere T, Miwa S, Drieger Y, Brand MD, Partridge L. Biomarkers of aging in *Drosophila*. *Aging Cell*. 2010;9(4):466-77.
15. Tsakiri EN, Iliaki KK, Höhn A, Grimm S, Papassideri IS, Grune T, Trougakos IP. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1155-63.
16. Vaiserman AM, Koshel NM, Litoshenko AY, Mozhukhina TG, Voitenko VP. Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*. 2003;4:9-14.

*Матеріал надійшов до
редакції 15.05.2015.*

Вплив гіпоксії на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus в умовах кокультури

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

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

Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; e-mail: Dooannya@gmail.com

Проведено серію експериментів для виявлення ефектів та механізмів гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus (SC). Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої потенціації (ДТП) НМДА-опосередкованої синаптичної передачі. Аналіз впливу дефіциту кисню на спонтанні та мініатюрні постсинаптичні струми (сПСС та мПСС відповідно) виявив збільшення частоти їх виникнення та появу другого піка в гістограмі розподілу мПСС. Оцінка квантових та біноміальних параметрів відображає комплекс пре- та постсинаптичних змін при потенціації, незалежних від ймовірності вивільнення нейромедіатора. ДТП може зумовлюватися збільшенням загальної кількості активних синапсів. Глутаматергічна синаптична передача, опосередкована активацією неНМДА-рецепторканалних комплексів, у відповідь на аплікацію безкисневого розчину реагувала короткотривалою депресією, яка є результатом пресинаптичної дисфункції і асоціюється зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул та кількості активних зон. ГАМК-ергічна синаптична передача, опосередкована активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів реагувала на гіпоксичну дію довготривалою депресією (ДТД). Аналіз сПСС та мПСС показав суттєве зменшення частоти виникнення цих струмів та зменшення величини кванта ($P=0,05$) протягом дефіциту кисню. Загалом в основі ефекту гіпоксіїндукованої ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін пресинаптичних (незалежних від ймовірності вивільнення) та постсинаптичних (зменшення чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани) механізмів.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки; нейрони superior colliculus; синаптична передача; гіпоксія; довготривала депресія та потенціація.

ВСТУП

Дослідження механізмів впливу гіпоксії на високоспеціалізовані системи ЦНС, які відповідальні за сприймання, обробку та передачу інформації є актуальною проблемою фізіології та медицини. Гіпоксія – провідний фактор у патогенезі багатьох захворювань, включаючи мозкові травми, дистрофії, інсульти. Втрата зору як наслідок мозкової травми та дистрофій різної етіології – одна з головних причин зорових порушень сьогодення [1, 2]. Пошкодження можуть відбуватися у будь-якому елементі зорової системи: структурі ока, зорових нервах, підкіркових © Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С.Веселовський

зорових центрах, зоровій корі. Найчастіше саме порушення на рівні передачі зорового сигналу від сітківки в первинні підкіркові зорові центри призводить до часткової або повної втрати зору [3,4]. Superior colliculus (SC) – рефлекторний підкірковий центр зорового аналізатора. Саме тут відбувається перемикання первинних аферентних сигналів від сітківки, їх обробка, модуляція та формування рефлекторних реакцій. Ключові моменти гіпоксичного ураження проєкцій гангліозних клітин сітківки (ГКС) до SC досліджені досить детально на рівні структурних порушень та судинних реакцій за допомогою методів магнітнорезонансної томографії [5, 6]. Разом

з тим ефекти та механізми гіпоксичного пошкодження цієї синаптичної передачі дотепер не були досліджені.

Метою нашої роботи було охарактеризувати ефект та виявити механізми гіпоксичного впливу на синаптичну передачу між ГКС та нейронами SC в умовах кокультури.

МЕТОДИКА

Кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів SC проводили згідно з розробленою нами методикою, яка була описана раніше [7]. В експеримент відбирали пари синаптичнозв'язаних гангліозних клітин (ГКС) і нейронів SC, які візуально ідентифікували за морфологічними особливостями цих популяцій нейронів. Покривне скельце з кокультивованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10; pH 7,4. Всі реактиви фірми “Sigma”, (США).

Patch-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовлені з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин мав такий склад (ммоль/л): калій глюконат – 155, EGTA – 0,5, MgCl₂ – 1, HEPES – 20; pH 7,4. Всі реактиви фірми “Sigma”, (США), Заповнені таким розчином patch-піпетки мали опір 5–7 МОм. Відводили трансмембранні струми та потенціали у парах ГКС і нейронів SC методом patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму та напруги одночасно на пре- та постсинаптичній клітині відповідно. Контроль якості фіксації потенціалу протягом експерименту здійснювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витоку ($I_{\text{вит}}$) та сталої часу ємнісного струму ($\tau_{\text{емн}}$) у відповідь на короткий (10 мс) прямокутний стимул невеликої амплітуди (-10 мВ). Отримані результати аналізували лише в

тому разі, якщо варіації значень $\tau_{\text{емн}}$ та $I_{\text{вит}}$ не перевищували 20 %. В усіх експериментах концентрації іонів хлору для зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів становили 151–144 та 2 ммоль/л відповідно. За таких концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні постсинаптичні струми через канали ГАМК_A-рецепторів мали вихідний напрямок і гіперполяризували мембрану нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів – вхідний і де поляризували. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим візуально розрізняти збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми, що значно полегшувало аналіз експериментальних результатів. Мініатюрні постсинаптичні струми (мПСС) реєстрували в нейронах SC у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині з додаванням 1 мкмоль/л тетродотоксину, за наявності відповідних блокаторів.

Аплікацію розчинів на синаптичнозв'язану пару ГКС та нейрона SC проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії зі швидкостями, достатніми для дослідження лігандкерованих іонних каналів [8]. Піпетки для суперфузії діаметром 20–40 мкм розміщали на відстані 250–300 мкм вище синаптичнозв'язаної пари нейронів. Вплив гіпоксії на викликані, спонтанні та мініатюрні ПСС вивчали за наступним протоколом: на досліджувану пару аплікували робочий зовнішньоклітинний розчин протягом 5 хв, цей період вважався “контрольним”, після цього йшла швидка заміна на відповідний аноксичний розчин (близько 5 хв) – період гіпоксії, з наступною повторною подачею робочого зовнішньо клітинного розчину – реоксигенація. Короткочасну (до 5 хв) аплікацію аноксичного розчину використовували як загальноприйняту модель гіпоксії *in vitro*. Слід зазначити, що амплітудні та кінетичні характеристики викликаного потенціалу дії (ПД) пресинаптичних ГКС залишалися незмінними протягом всього експерименту.

Гіпоксичні розчини отримували барботуванням робочого зовнішньоклітинного

розчину азотом протягом 20 хв. Концентрацію вимірювали полярографічним методом за допомогою платиногового мікроелектрода. Полярографічний аналіз оснований на можливості електрохімічного відновлення або окиснення іонів чи нейтральних молекул на поверхні електрода. Кожен вид іонів чи нейтральних молекул відновлюється або окиснюється при своєму визначеному потенціалі. Полярографічні індикаторні мікроелектроди виготовляли з заготовок для patch-піпеток у кінчики яких був впаяний платиновий дріт діаметром близько 20 мкм і довжиною відкритої ділянки 30–40 мкм. До індикаторного електрода прикладали від'ємний потенціал -60 мВ і вимірювали граничний струм дифузії. Перед використанням електрод калібрували за двома точками, вимірюючи граничний струм дифузії в розчинах з відомою концентрацією. Для отримання нульової точки використовували насичений розчин сульфату натрію (8 ммоль/л). За другу точку приймали граничний струм дифузії, виміряний у розчині, що знаходився в рівновазі з повітрям (об'ємний вміст кисню в повітрі – 21%).

Раніше нами було показано, що в синапсах між кокультивованими ГКС і нейронами SC ймовірність вивільнення медіатора досить висока, тому для вивчення природи ефектів короткотривалої пластичності ми проводили квантовий аналіз, використовуючи біноміальну статистику [9]. Основними параметрами базової квантової теорії вивільнення нейромедіатора є: q – величина кванта - амплітуда постсинаптичного струму, яка опосередкована вивільненням нейромедіатора з однієї синаптичної везикули і є пре- та постсинаптичним фактором; m – середній квантовий вміст (середня кількість вивільнених синаптичних везикул) $m = n \cdot p$, де n та p – біноміальні параметри: n – середня кількість сайтів вивільнення, а p – середня ймовірність вивільнення однієї везикули з одного сайту вивільнення, обидва є пресинаптичними факторами [18]. Середня амплітуда вПСС серії реєстрацій визначається $E = m \cdot q$

.Відповідно до базової біноміальної моделі ймовірність вивільнення нейромедіатора в досліджуваних синапсах розраховується за таким рівнянням:

$$p = 1 - \frac{E \cdot CV^2}{q \cdot (1 + CV_q^2)},$$

де CV та CV_q – коефіцієнт варіації амплітуд вПСС та одиничних квантових подій (q) відповідно.

Наступний метод базується на порівнянні амплітуд та коефіцієнтів варіації вПСС в контролі та при дії гіпоксії чи реоксигенації [11]. Візуалізацію результатів зображали на

графіку залежності $\pi = \left(\frac{CV_{дия}}{CV_{контр}} \right)^{-2}$ від $r = \left(\frac{A_{дия}}{A_{контр}} \right) \cdot (CV)^{-2}$ є функцією параметрів

n і p , тоді як амплітуда вПСС зумовлюється як пре- так і постсинаптичними факторами. Враховуючи припущення описаної раніше моделі та формули базового та повного квантового аналізу, діагональ на цьому графіку розділяє ефекти, пов'язані зі зміною квантового вмісту, від ефектів, зумовлених зміною як квантового вмісту так і величини кванта.

Таким чином, у разі потенціації $\left(\frac{A_2}{A_1} > 1 \right)$

ефекти, пов'язані зі зміною пресинаптичних факторів, відображаються графічно над діагоналлю, тоді як ефекти, пов'язані зі зміною як пре- так і постсинаптичних факторів – під

діагоналлю. При депресії $\left(\frac{A_2}{A_1} < 1 \right)$ – навпаки.

Обробку та візуалізацію результатів проводили за допомогою програмних пакетів Clamfit 9.0 ("Axon Instruments", США), Excel 2007 ("Microsoft Corporation", США) та Origin 8.5 Pro ("OriginLab Corporation", США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було досліджено 88 синаптичнозв'язаних пар ГКС та нейронів SC від 10 до 28

діб кокультування. Аплікація гіпоксичного розчину призводила до довготривалої потенціації (ДТП) вхідних повільних вПСС (18 пар клітин, рис. 1, I). Амплітуди повільного вПСС були збільшені відносно контролю до $161,4 \pm 7,2\%$ протягом періоду гіпоксії та до $140,9 \pm 12,4\%$ протягом періоду реоксигенації ($P=0,05$). Описаний ефект було зареєстровано у безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині без додавання блокатора неНМДА-рецепторканалних комплексів DNQX (10 мкмоль/л). Такі кінетичні характеристики струму, як час наростання та стала часу спаду вПСС були $3,57 \pm 0,32$ та $37,23 \pm 5,36$ мс відповідно. Цей струм повністю блокувався за наявності 10 мкмоль/л D_L -APV. Тобто

описана синаптична передача опосередковувалась виключно НМДА-рецепторканалним комплексом.

Ми дослідили гіпоксичний вплив на НМДА-опосередковану синаптичну передачу у стандартному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 10 мкмоль/л DNQX (6 пар клітин). Наявність Mg^{2+} не давала можливості зареєструвати ці струми при підтримуваному потенціалі -70 мВ у контролі. Постсинаптичний нейрон SC деполаризували до -40 — -30 мВ для підтвердження наявності функціонального синапсу у візуально ідентифікованій парі ГКС та нейрона SC. Потім нейрон утримували за нормальних фізіологічних умов (при -70 мВ). Локальна

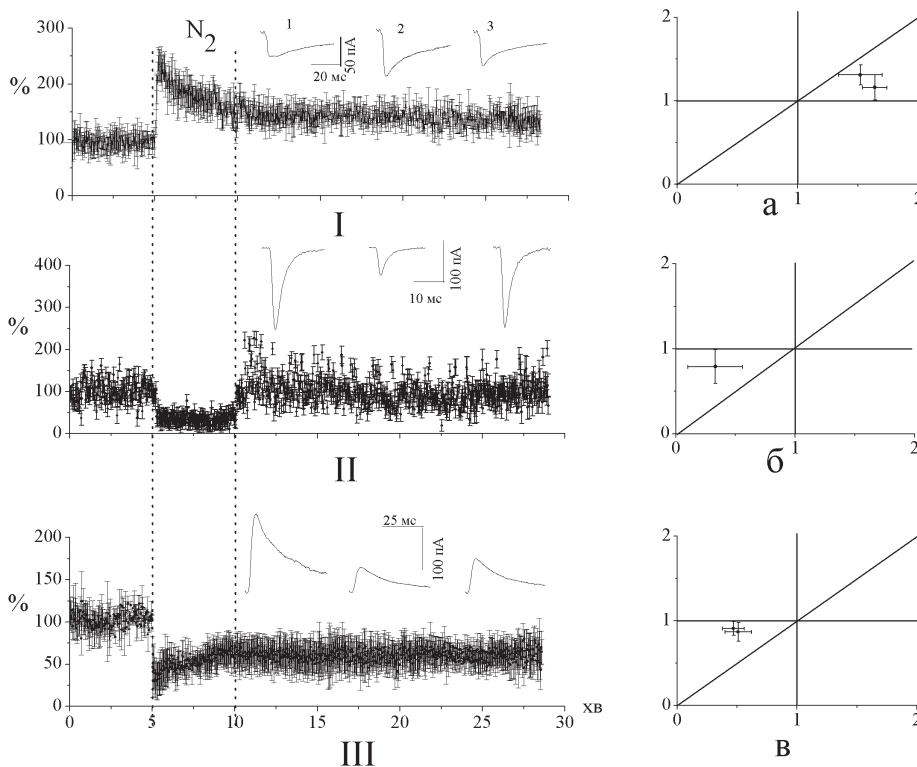


Рис.1. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на синаптичну передачу між гангліозними клітинами сітківки та нейронами superior colliculus та графічні результати методу коефіцієнта варіації. I, II, III - часовий перебіг амплітуд НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) до, під час та після відповідно аплікації гіпоксичного розчину. На верхніх лівих фрагментах I, II та III – усереднені записи вПСС в контролі (1), під час

гіпоксії (2) та протягом реоксигенації (3). а, б, в - усереднені графіки залежності $r = \left(\frac{CV_{\text{дия}}}{CV_{\text{контр}}} \right)^{-2}$ від $\pi = \left(\frac{A_{\text{дия}}}{A_{\text{контр}}} \right)$ для вПСС, опосередкованих активацією виключно НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-рецепторканалних комплексів відповідно при гіпоксії та реоксигенації

аплікація безкисневого розчину призводила до можливості реєстрації НМДА-опосередкованого ВПСС від нейрона SC, струм знову зникав у період реоксигенації (рис 2, а). Можливість реєстрації НМДА-опосередкованих ВПСС під час гіпоксії, ймовірно, відбувалася внаслідок ослаблення потенціалзалежного магнієвого блоку НМДА-рецепторканального комплексу на мембрані постсинаптичного нейрона, який за фізіологічних умов є одним з безпосередніх механізмів нейропротекторної дії. Цей ефект при дефіциті кисню за нормальних електрофізіологічних умов дотепер не має конкретно описаного механізму та є предметом багатьох актуальних досліджень [12, 13]. Тривале підвищення активності НМДА-рецепторканальних комплексів на постсинаптичній мембрані нейрона SC за обох зовнішньоклітинних розчинів призводила до підвищення концентрації кальцію в

цитозолі і, як наслідок, відстроченої загибелі нейрона. Явище гіпоксіїіндукованої ДТП, опосередковане активацією НМДА-рецепторканальних комплексів, має назву патологічної пластичності. Ми проаналізували мініатюрні та спонтанні НМДА-опосередковані постсинаптичні струми (мПСС та сПСС відповідно) в контрольних умовах та при дефіциті кисню. Як видно з рис. 3, А, гіпоксія індукує збільшення частоти виникнення НМДА-опосередкованих сПСС, яка залишається підвищеною протягом періоду реоксигенації (n=4). Кількісний аналіз частотних змін зображений на графіку кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними подіями (див. рис. 3, а). Аналогічне збільшення частоти відносно контролю спостерігалось при реєстрації мПСС протягом гіпоксії, відповідні графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між мініатюрними подіями зображено на рис. 4,

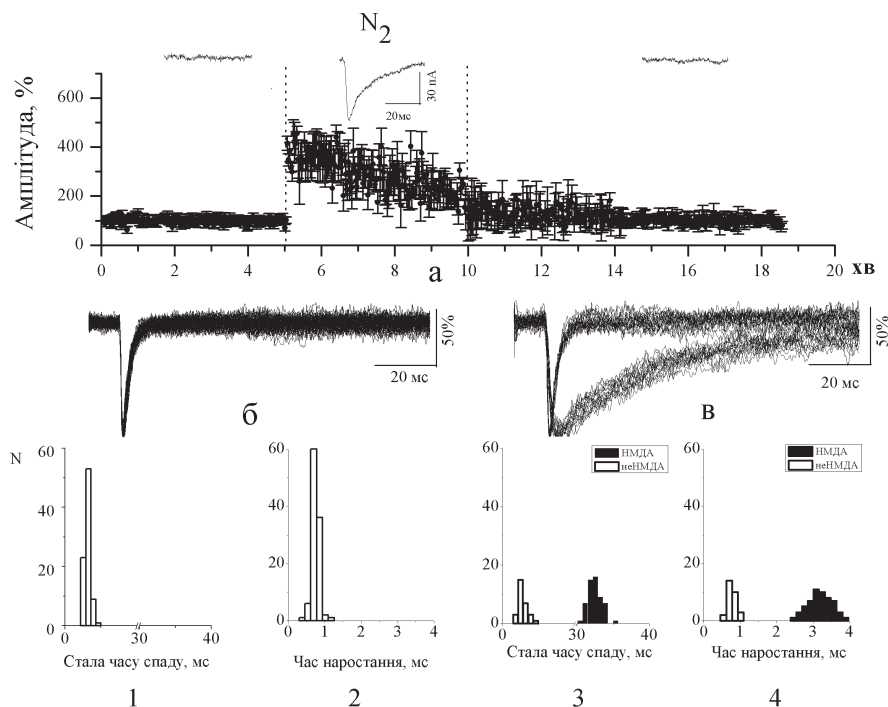


Рис.2. Вплив гіпоксії на НМДА- та неНМДА-опосередковані викликані та спонтанні постсинаптичні струми (ВПСС та сПСС відповідно) зареєстровані з використанням стандартного зовнішньоклітинного розчину, без додавання блокторів. а - часовий перебіг амплітуд НМДА-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (ВПСС) до, під час та після аплікації гіпоксичного розчину. На верхньому фрагменті а – усереднені записи ВПСС у відповідному періоді. б, в – нормовані записи реєстрацій глутаматергічних сПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. 1, 2 – гістограми розподілу сталої часу спаду та часу наростання сПСС представлених в б. 3, 4 – гістограми розподілу сталої часу спаду та часу наростання сПСС, представлених у в

а. Порівняльний аналіз амплітуд НМДА-рецепторопосередкованих мПСС ($n=4$) виявив вірогідну появу другого піка в гістограмі розподілу амплітуд в гіпоксичних умовах (див. рис. 4, А, 1, 2). Тобто за умов низької ймовірності вивільнення нейромедіатора протягом періоду гіпоксії спостерігалися як одно- так і двоквантове вивільнення синаптичних везикул.

Для виявлення локусу гіпоксіїіндукованих змін ми оцінили біноміальні параметри та коефіцієнт варіації НМДА-опосередкованих вПСС у контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. Контрольні параметри, оцінені для кожної окремої синаптично зв'язаної пари, в сукупності не відрізнялися при $P=0,05$. Ми аналізували середні відсоткові зміни параметрів n , p , m та CV відносно контролю. Для НМДА-опосередкованої синаптичної

передачі ефект ДТП спостерігався разом зі збільшенням квантового вмісту (m) і відповідно достовірним збільшенням ($P=0,05$) біноміального параметра n порівнянно з контролем на 61,4 та 52,2 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно. Значущих змін у значеннях p та CV при гіпоксії та реоксигенації щодо контролю не виявлялося. Тобто в реалізацію ДТП залучаються пресинаптичні механізми, незалежні від ймовірності вивільнення нейромедіатора. Використовуючи метод коефіцієнта варіації було виявлено, що

всі точки на графіку $\left(\frac{CV_2}{CV_1}\right)^{-2}$ від $\left(\frac{A_2}{A_1}\right)$ для

НМДА-опосередкованих вПСС були локалізовані в зоні, яка відображає комплекс змін пре- та постсинаптичних параметрів при потенціації (див. рис. 1, а). Наразі ДТП може

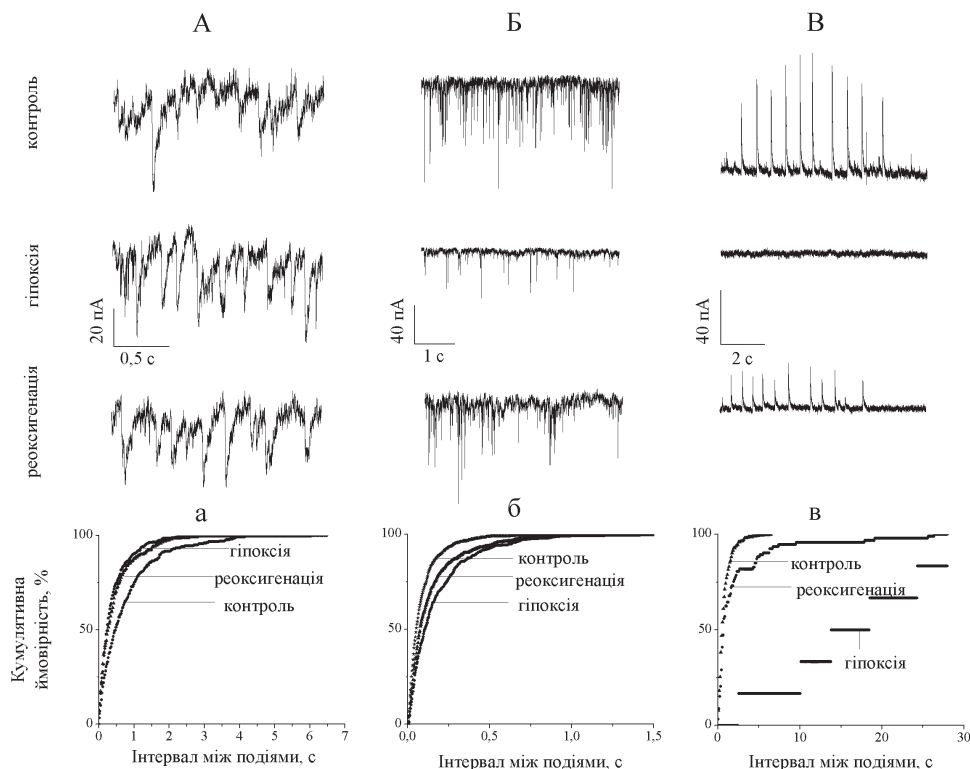


Рис.3. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на спонтанні постсинаптичні струми (сПСС). А, Б, В - записи реєстрацій НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованих сПСС відповідно, в контролі, при гіпоксії та протягом реоксигенації. а, б, в – графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованими подіями відповідно в контролі при гіпоксії та протягом реоксигенації

зумовлюватися збільшенням загальної кількості активних синапсів. Існує серія робіт в яких було досліджено структурні модифікації синапсів протягом та через певний час після гіпоксичного ушкодження [14, 15].

Глутаматергічна синаптична передача, опосередкована активацією неНМДА-рецепторканалних комплексів (16 пар клітин) у відповідь на гіпоксичну дію, реагувала короткотривалою депресією (див. рис. 1, П). Амплітуди цього вПСС зменшились на $62,4 \pm 6,2\%$ ($P=0,05$) від значень контролю лише протягом гіпоксії. Дослідження впливу дефіциту кисню на неНМДА-опосередковані сПСС виявили зворотне зменшення частоти їх виникнення ($n=5$, див. рис. 3, Б, б). Аналіз амплітуд та частот реєстрації вПСС ($n=3$) не виявив достовірних змін протягом безкисневого періоду (див. рис. 4, Б, 3, 4, б). Ці експерименти проводили у відповідному зовнішньоклітинному розчині з додаванням 10 мкмоль/л D_L -APV.

Серію експериментів з дослідження впливу гіпоксії на неНМДА-опосередковані сПСС проводили у стандартному зовнішньоклітинному розчині без додавання блокатора НМДА-опосередкованої передачі ($n=6$). Аналіз часу наростання та кінетики спаду сПСС у контролі показав наявність лише неНМДА-опосередкованих струмів (див. рис. 2, б). Однорідність популяції за параметрами часового ходу та кінетики спаду струмів відображено на рис. 2, 1, 2. Водночас при гіпоксії з'являлися одно- та двоквантові НМДА-опосередковані сПСС. Нормовані сПСС на рис. 2, в та гістограми розподілу кінетичних характеристик чітко розрізняють два типи глутаматергічних сПСС (див. рис. 2, 3, 4). Збільшення частоти реєстрації сПСС у період гіпоксії пояснюється появою НМДА-опосередкованих сПСС.

Для оцінки внеску можливих пре- та постсинаптичних механізмів, що лежать в основі гіпоксіїндукованої короткотривалої депресії

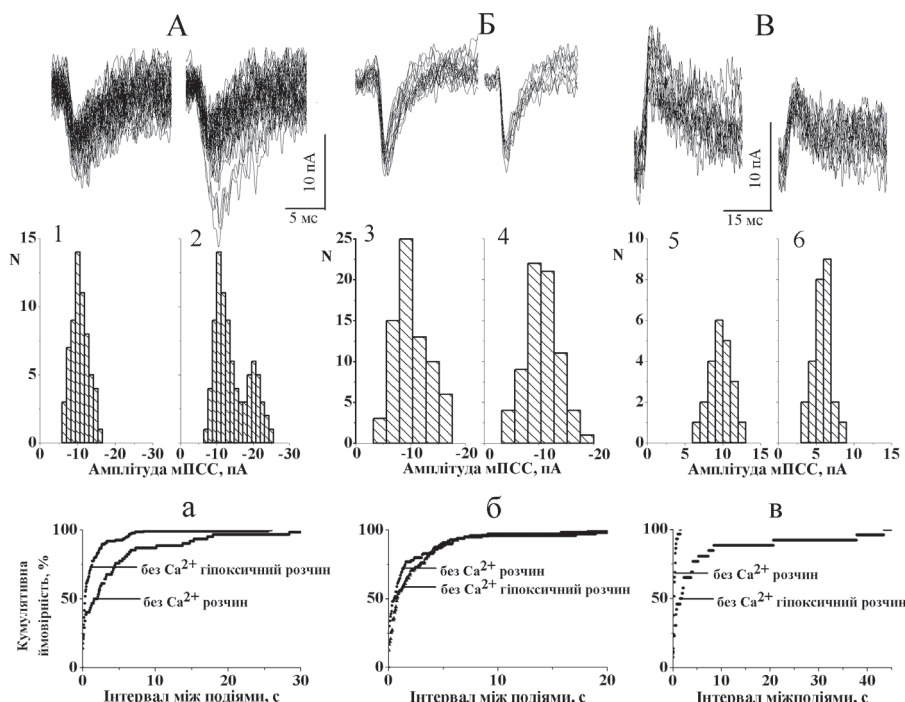


Рис. 4. Вплив аплікації гіпоксичного розчину на мініатюрні постсинаптичні струми (мПСС). А, Б, В - записи реєстрацій НМДА-, не НМДА- та ГАМК_A-опосередкованих мПСС відповідно, в контролі та протягом гіпоксії. 1, 2; 3, 4; 5, 6 – гістограми розподілу амплітуд НМДА-, неНМДА-, ГАМК_A-опосередкованих мПСС в контролі та при гіпоксії відповідно. а, б, в – графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між спонтанними НМДА-, неНМДА- та ГАМК_A-опосередкованими подіями відповідно в контролі та при гіпоксії

неНМДА-опосередкованої синаптичної передачі між ГКС та нейронами SC ми оцінили відсоткові зміни біноміальних параметрів і коефіцієнта варіації відносно контролю та використали метод коефіцієнта варіації. Цей ефект збігався зі змінами ($P=0,05$) таких параметрів: зменшенням CV на 47,3 % протягом гіпоксії та його ж збільшенням на 86,7 % протягом реоксигенації; зі зменшенням p на 23,9 та 12,6 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно; та зі зменшенням n на 54,73 % протягом гіпоксії. Але, як зазначалося раніше, гіпоксііндукована депресія була короткочасною та зворотною, тобто вірогідних змін амплітуд вПСС у період реоксигенації порівнянню з контролем не спостерігалось. На графіку методу коефіцієнта варіації точка при гіпоксії локалізована в зоні змін пресинаптичних параметрів при депресії (див. рис. 1, б). Отже, незалежні методи оцінки вказують на залучення пресинаптичних механізмів у реалізації короткотривалої депресії неНМДА-опосередкованої синаптичної передачі. Більшість досліджень підтверджують припущення, що ефект ослаблення ефективності синаптичної передачі при короткотривалій гіпоксії є результатом пресинаптичної дисфункції і асоційовано зі зменшенням ймовірності вивільнення синаптичних везикул та кількості активних зон [16, 17].

Аплікація гіпоксичного розчину призводила до ефекту довготривалої депресії (ДТД) ГАМК-ергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією ГАМК_A-рецепторканалних комплексів (16 пар; див.рис. 1, III). Зменшення амплітуди ГАМК_A-опосередкованих вПСС на $47,2 \pm 9,3\%$ та на $39,4 \pm 5,7\%$ ($P=0,05$) спостерігалось протягом періоду гіпоксії та реоксигенації відповідно. Дія гіпоксичного розчину на ГАМК_A-опосередковані сПСС призводила до майже повного припинення спонтанної активності (див. рис. 3, В, в). Аналіз гістограм розподілу амплітуд мПСС показав зменшення величини кванта протягом дефіциту кисню ($10,1 \pm 1,3$ та $6,1 \pm 1,2$ пА в контролі та при гіпоксії відпо-

відно при $P=0,05$) (рис. 4, В, 5, 6) та частоти реєстрації мПСС (рис. 4, в). Ймовірніше за все, зменшення величини кванта опосередковане зниженням чутливості рецепторів постсинаптичної мембрани. Оскільки досить сумнівно, що за робочих тривалостей періоду гіпоксії при реєстрації мПСС можливі такі зміни розміру везикули чи концентрації нейротрансмітера в кожній везикулі. До того ж числені мікрофотографії свідчать, що в терміналі одного аксона ГКС на нейроні SC може бути до 8 синаптичних контактів і в кожному з яких близько 20 готових до негайного вивільнення везикул та близько сотні синаптичних везикул у терміналі [18, 19]. Оцінка відсоткових змін параметрів відносно контролю виявила достовірне зменшення квантового вмісту і відповідно зменшення ($P=0,05$) n порівнянню з контролем на 51,3 та 47,2 % при гіпоксії та реоксигенації відповідно. Значущих змін параметрів p та CV при гіпоксії та реоксигенації порівнянню з контролем виявлено не було. За графіком методу коефіцієнта варіації було виявлено, що всі точки для ГАМК_A-опосередкованих вПСС були локалізовані в зоні, яка відображає комплекс змін пре- та постсинаптичних параметрів при депресії (див. рис. 1, в). Загалом в основі ефекту гіпоксііндукованої ДТД ГАМК-ергічної синаптичної передачі лежить комплекс змін пресинаптичних механізмів, незалежних від ймовірності вивільнення, та постсинаптичних – зменшення чутливості постсинаптичної мембрани.

Цінність та інформативність отриманих результатів має велике практичне значення для розуміння проблематики гіпоксичних ушкоджень зорової системи на рівні аферентних входів в підкорковий зоровий центр та розробки відповідних терапевтичних заходів.

Автори статті висловлюють подяку д-ру мед. наук проф. В. Я. Березовському за консультації під час виконання цієї роботи.

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

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ МЕЖДУ ГАНГЛИОЗНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕТЧАТКИ И НЕЙРОНАМИ SUPERIOR COLLICULUS В УСЛОВИЯХ КОКУЛЬТУРЫ

Провели серию экспериментов для определения эффектов и механизмов гипоксического воздействия на синаптическую передачу между ганглиозными клетками сетчатки и нейронами superior colliculus (SC). Аппликация гипоксического раствора приводила к долгодлящей потенциации (ДДП) НМДА-опосредованной синаптической передачи. Анализ влияния дефицита кислорода на спонтанные и миниатюрные постсинаптические токи (сПСТ и мПСТ соответственно) выявил увеличение частоты их возникновения и появление второго пика в гистограмме распределения мПСТ. Оценка квантовых и биномиальных параметров отображает комплекс пре- и постсинаптических изменений при потенциации, независимых от вероятности выброса нейромедиатора. ДДП может быть вызвана увеличением общего числа активных синапсов. Глутаматэргическая синаптическая передача, опосредованная активацией неНМДА-рецепторканальных комплексов, в ответ на аппликацию безкислородного раствора реагировала кратковременной депрессией, которая является результатом пресинаптической дисфункции и ассоциируется с уменьшением вероятности выброса синаптических везикул и количества активных зон. ГАМК-эргическая синаптическая передача, опосредованная активацией ГАМК_A-рецепторканальных комплексов, реагировала на гипоксическое действие долгодлящей депрессией (ДДД). Анализ сПСТ и мПСТ показал существенное уменьшение частоты возникновения данных токов и достоверное уменьшение величины кванта на протяжении периода дефицита кислорода. В целом в основе эффекта гипоксиндуцированной ДДД ГАМК-эргической синаптической передачи лежит комплекс изменений пресинаптических (независимых от вероятности выброса нейромедиатора) и постсинаптических (уменьшение чувствительности рецепторов постсинаптической мембраны) механизмов. Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки; нейроны superior colliculus; синаптическая передача; долговременная потенциация и депрессия.

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

EFFECT OF HYPOXIA ON SYNAPTIC TRANSMISSION BETWEEN RETINAL GANGLION CELLS AND SUPERIOR COLLICULUS NEURONS IN COCULTURE

In this study we conducted a series of experiments to characterize the effect and define the mechanisms of hypoxia on synaptic transmission between retinal ganglion cells and superior col-

liculus (SC) neurons. Application of hypoxic solution leads to a long lasting potentiation (LTP) NMDA-mediated synaptic transmission. Analysis of the oxygen deficiency effect on the spontaneous and miniature postsynaptic currents (sPSC and mPSC respectively) revealed an increase in the frequency of their occurrence and the appearance of the second peak in the mPSC histogram distribution. The assessment of quantum and binomial parameters reflects the complex pre- and postsynaptic changes during the potentiation, independent of the release probability. Most likely this LTP can be caused by an increase in the total number of active synapses. Glutamatergic synaptic transmission mediated by non-NMDA activation receptor-channel complexes, responded to application of deoxygenated solution by the brief depression, which is the result of presynaptic dysfunction and associates with decrease in release probability and number of active zones. GABAergic synaptic transmission mediated by activation GABA_A-receptor-channel complexes, responded to hypoxic action by long term depression (LTD). Analysis of sPSC and mPSC showed a significant decrease in the frequency of their occurrence and significant ($P = 0,05$) decrease in the quantum over a period of oxygen deficiency. In general, the effect of hypoxia-induced LTD of GABAergic synaptic transmission is based on complex changes of presynaptic (independent on the release probability) and postsynaptic (reduction sensitivity of receptors in postsynaptic membrane) mechanisms. Key words: retinal ganglion cells; superior colliculus neurons; synaptic transmission; hypoxia; long-term potentiation and depression.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center for molecular Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.*

REFERENCES

1. Pike MG, Holmstrom G, de Vries LS. Patterns of visual impairment associated with lesions of the preterm infant brain. *Dev Med Child Neurol.* 1994;36: 849–862.
2. Huo R, Burden S, Hoyt CS, Good WV. Chronic cortical visual impairment in children: etiology, prognosis, and associated neurological deficits. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:670–675.
3. Hoyt CS. Visual function in the brain-damaged child. *Eye.* 2003; 17: 369–384.
4. Dutton GN, McKillop ECA, Saidkasimova A. Visual problems as a result of brain damage in children. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 932–933.
5. Zhou IY, Wu EX, Cheung MM, Chan KC, Xing KK. Functional MRI of postnatal visual development in normal and hypoxic-ischemic-injured superior colliculi. *Neuroimage.* 2010;49(3):2013–2020.
6. Chan KC, Kancherla S, Fan S-J, Wu EX. Long-term effects of neonatal hypoxia-ischemia on structural and physiological integrity of the eye and visual pathway by multimodal MRI. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1-9.

7. Dumanska GV, Kosheleva SO, Veselovsky MS. Chemical transmission between cocultivated ratinal ganglion cells and superior colliculus neurons. *Neurophysiol.* 2011;43(4):369-371.
8. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pflugers Arch.* 1996; 432(2):351-4.
9. Dumanska HV, Rykhalskyi OV, Veselovskyi MS. Characteristics of quantal release of glutamate and GABA in synapses between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in coculture. *Fiziol Zh.* 2014;60(1):3-10.
10. Sola E, Prestori F, Rossi P. et. al. Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum. *J. Physiol.* 2004;557:843-861.
11. Faber BC and Korn H. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *J Biophys.* 1991;60:1288-1294.
12. Hori N, Carpenter DO. Functional and morphological changes induced by transient in vivo ischemia. *Exp Neurol.* 1994;129:279–289.
13. Hsu KS, Huang CC. Protein kinase C inhibitors block generation of anoxia-induced long-term potentiation. *Neuroreport.* 1998;9:3525–3529.
14. Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci.* 2002;22:3108–3116.
15. Piccini A, Malinow R. Transient oxygen-glucose deprivation induces rapid morphological changes in rat hippocampal dendrites. *Neuropharmacol.* 2001;41:724–729.
16. Choi S, Lovinger DM. Decrease probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1997;94:2665-2670.
17. Geiman S. Heterogeneous release probability and activity-dependent short-term synaptic depression. *Commun Integr Biol.* 2011;4(5):603-605.
18. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee ATL. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *PNAS.* 2011;108(32):440-449.
19. Vidal-Sanz M, Bray GM and Aguayo AJ. Regeneration synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocyt.* 1991;20:940-952.

Матеріал надійшов до редакції 25.10.2015.

ОГЛЯДИ

Фізіологічні та фармакологічні властивості нанорозмірних структур

I.C.Чекман

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: chekman_ivan@yahoo.co.uk

Узагальнені дані літератури та результати досліджень автора з теоретичних і практичних основ нанонауки. Останнім часом у світі велику увагу приділяють вивченню фізичних, хімічних, біологічних, лікувальних, фармакологічних, токсикологічних властивостей наноматеріалів для їх ширшого застосування у практичній діяльності людини. Особливо важливим є відкриття нових квантово-хвильових властивостей наночастинок. Автор статті висловлює ідею: зі зменшенням розмірів речовин дедалі більшу роль відіграють хвильові ефекти наноматеріалів. Переважання хвильових властивостей у наноструктурах над корпускулярними зумовлює значну зміну їх фізико-хімічних показників і підвищення фізичної, механічної, біологічної, фармакологічної і токсикологічної активності. Ця гіпотеза потребує для підтвердження теоретичних та експериментальних досліджень. Потрібне об'єднання зусиль учених різних напрямків, що матиме важливе значення для фізіології, медицини та фармакології, сприятиме впровадженню в клінічну практику нових ефективних медикаментів. Тільки на стику різних наук можна отримати нові фундаментальні відкриття.
Ключові слова: нанонаука; наноматеріали; хвильові властивості; квантова фізика; квантова механіка; нанофармакологія.

ВСТУП

Упродовж останніх років у лабораторіях багатьох країн світу тривають інтенсивні дослідження з проблем нанонауки. Вони сконцентровані за такими напрямками, як нанофізика, наноелектроніка, нанотермодинаміка, нанохімія, нанобіологія, нанобіотехнології, наномедицина, нанофармакологія, нанотоксикологія тощо. Об'єктами досліджень учених є нанопрепарати, наночастинки, наноструктурні матеріали, нанокластери, нанокристали, нанотрубки, наносистеми, нанокомпозити, нанопористі матеріали, нанопорошки, наносуспензії, наноемульсії тощо [1–4].

Для біологів, фізіологів, медиків, фармакологів, токсикологів, провізорів надзвичайно важливо з'ясувати взаємозв'язок фізіологічних, біохімічних, імунологічних, генетичних процесів в організмі людини і

впливу нанорозмірних речовин. Доцільно і так поставити питання: чи існують природні наномеханізми в діяльності живих клітин організму? Під наномеханізмами слід вважати такі процеси, які здійснюються швидко із залученням метаболітів організму без негативної дії на його діяльність і довкілля. Якщо обмінні процеси в живих клітинах розглядати як синтез у своєрідному природному нанореакторі (обмеженому просторі), де на біохімічну (ферментні реакції) або хімічну (нейтралізація хлористоводневої кислоти в шлунку) активність впливають багато факторів (мембрана клітини, стінка судини чи слизова шлунка, різні речовини, що взаємодіють у реакції тощо, а також значна кількість реагентів), то встановити первинність реагуючих компонентів поки що неможливо.

Фізіологічно активні речовини (амінокислоти, вітаміни, медіатори, РНК, ДНК, альбу-

мін), мембрани клітин, стінки капілярів, іонні канали мають нанорозміри. Можна стверджувати, що природні наноявища задіяні у фізіологічних, біохімічних, імунологічних, генетичних процесах організму. Вивчення цих унікальних характеристик природних наночастинок дасть змогу розробити нові нанобіотехнології для використання у техніці, біології, медицині, фізіології, лікознавстві, сільському господарстві та в інших сферах діяльності людини [5–7].

Фізіологічно активні речовини – нанорозмірні структури

Біологічні структури організму є нанорозмірними. Зокрема, це рибосоми, білки, антитіла, гемоглобін, фібриноген, інсулін, фруктоза, амінокислоти, медіатори (ацетилхолін, адреналін, норадреналін, гістамін тощо), вітаміни, макроергічні сполуки (АТФ, АДФ, АМФ), ДНК, РНК. До нанорозмірних структур належать віруси поліомієліту, ящура, лихоманки Ебола, хлорофіл, а також біомембрана, товщина якої в середньому становить 5 нм. Вона містить нанорозмірні структури – ліпідні рафти, можливою функцією яких є перетворення сигналів зовнішнього середовища у внутрішньоклітинну відповідь, а також участь у процесах екзо- та ендцитозу, клітинної адгезії та мембранного транспорту [8–10].

Іонні канали – це нанорозмірні структури, що визначає їхню високу селективність (проходять лише певні типи іонів) і продуктивність [11]. Біомембрана містить аквапорини – нанорозмірні канали для проходження тільки молекул води. Ці пори – високоселективні, вони забезпечують плин води потоком завширшки в одну молекулу, внаслідок чого вода набуває унікальних властивостей [12].

У клітинах організму людини існують молекулярні наномотори. Це поступальні кінезини, міозини та динеїни, які забезпечують рух органел і м'язове скорочення, а також роторний мотор АТФаза, що відіграє ключову роль в енергетичному живленні клітини [13].

У мозку та деяких інших органах існують наночастинки заліза (магнетит), значення яких у фізіологічних і біохімічних процесах в організмі досі ще не з'ясовано. В організмі людини залізо транспортується феритином – білком, у глобулі якого відбувається унікальний процес перетворення розчинних солей заліза в нерозчинну форму – біомінералізація. У результаті утворюються наночастинки феригідриту [14,15]. Кістки та зуби людини мають ієрархічну структуру, в якій існують, зокрема, нанорозмірні елементи, що надає цим тканинам своєрідні біологічні та механічні властивості – функціональну активність, надзвичайну міцність і твердість [16,17].

Взаємозв'язок розмірів наночастинок з їх фізіологічною та фармакологічною активністю

Важливу роль у характері взаємодії наноструктур з біомембраною відіграє розмір наночастинок (НЧ). Roiter та співав. [18] досліджували дію на ліпідний бішар полярних НЧ кремнію різних розмірів. Згідно з отриманими результатами, частинки розміром менше 1,2 нм не впливали на структуру мембрани, а діаметром 1,2–22 нм – утворювали пори у бішарі. Дослідники пояснювали цей факт тим, що наявність гідрофільних НЧ у біомембрані є термодинамічно невигідною. Щоб ізолювати гідрофобний компонент від полярної частинки, бішар вимушений утворювати пори. Також з'ясувалося, що вплив НЧ на мембрану залежить від кривизни поверхні нанооб'єктів. Існує критичний розмір частинок, (22 нм для мембрани завтовшки 5 нм), у разі перевищення якого співвідношення енергії адгезії та пружної деформації ліпідного бішару зумовлює «обгортання» НЧ мембраною.

Біологічна активність наноструктур залежить від їхніх розмірів, що підтверджено у багатьох дослідженнях. Так, Azam та співав. [19] вивчали протимікробну активність НЧ оксиду (II) міді, отриманих золь-

гель-методом, і залежність останньої від розміру наноструктур. Антибактеріальну дію визначали методом серійних розведень у бульйоні. Засівна доза мікроорганізмів становила 10^6 КУО/мл. Результати показали, що зі зменшенням розмірів НЧ підвищувалася їхня протимікробна активність: це засвідчило зниження мінімальної бактерицидної концентрації. Із зменшенням розміру НЧ міді з 27 до 20 нм мінімальна інгібувальна та бактерицидна концентрації знижуються стосовно *Staphylococcus aureus* з 75 / 100 до 25 / 32 мкг/мл, що свідчить про значне підвищення протимікробної активності цього металу. Така сама спрямованість антибактеріальної дії зазначених розмірів НЧ CuO характерна і для *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus subtilis*.

Розмір НЧ впливає на їхню фармакокінетику. Дослідники Hirn та співавт. [20] вивчали особливості розподілу частинок золота різного діаметра після внутрішньовенного введення щурам лінії Вістар. Розміри НЧ становили 1,4, 5, 18, 80 і 200 нм. Більшість нанозолота накопичувалася у печінці – 50 % частинок розміром 1,4 нм і > 90 % – для частинок інших розмірів. Отже, зі збільшенням розміру підвищувався ступінь депонування нанозолота у печінці. Половина введеної дози НЧ розміром 1,4 нм накопичувалася в інших тканинах або підлягала швидкій екскреції. Порівняння НЧ діаметром 1,4 і 5 нм підтвердило, що накопичення в крові було більш виражене для менших частинок. Більшість НЧ розміром 18 нм у крові пов'язана з еритроцитами, тоді як нанозолото діаметром 5, 80 та 200 нм наявне як у сироватці, так і на поверхні червоних кров'яних тілець. Для НЧ розміром 1,4 нм співвідношення сироватка/еритроцити становило 3/1. Для всіх органів і тканин, крім печінки, для НЧ золота розміром 18, 80 та 200 нм не спостерігалася значних відмінностей щодо ступеня розподілу. У менших структурах (1,4 і 5 нм) виявили тенденцію до посилення депонування частинок зі зменшенням розміру. Печінковий

кліренс був найбільшим для НЧ розміром 1,4 нм, значно відрізнявся від цього показника для всіх інших частинок. Для нанозолота діаметром 5 нм і більше зафіксована обернено пропорційна залежність між розміром і печінковим кліренсом.

Відомо, що розмір НЧ впливає на їхній токсикологічний потенціал. Ivask та співавт. [21] досліджували дію НЧ срібла розміром 10, 20, 40, 60 і 80 нм на різні мікроорганізми та культури клітин *in vitro*: бактерій, дріжджів, водоростей, ракоподібних і ссавців. Загалом токсичність наносрібла підвищувалася зі зменшенням розміру НЧ. Так, різниця у значеннях EC_{50} для НЧ розміром 10 нм та 80 нм щодо *Daphnia magna* була 20-разовою. Аналіз показав, що токсичність наносрібла діаметром 20–80 нм можна пояснити вивільненням іонів срібла у середовище, тоді як НЧ 10 нм виявилися токсичнішими, ніж прогнозувалося. Наносрібло розміром 10 нм проявляло більшу біодоступність для *E. coli*, ніж відповідна доза $AgNO_3$. Це може пояснюватися кращим контактом НЧ саме цього розміру з бактеріальною клітиною порівняно з більшими частинками. Отже, існує механізм токсичного впливу, що зумовлюється не вивільненням іонів, а саме унікальними властивостями НЧ. Для наносрібла, яке застосовувалося в цьому досліді, поява унікальних властивостей спостерігалася при розмірах < 20 нм, а не < 100 нм, як раніше вважалося для наноматеріалів. Дослідники з'ясували, що механізм токсичної дії не пов'язаний із продукцією активних форм кисню. Нині точно не встановлено механізм набуття НЧ зазначеної біодоступності. Або вони прямо проникають усередину клітин, або розчиняються екстрацелюлярно безпосередньо близько до поверхні клітини перед надходженням до неї.

Корпускулярно-хвильові властивості нанорозмірних структур

Французький фізик Луї де Бройль ще в 1924 р. дійшов висновку, що крім корпускулярних

властивостей речовини (заряд, маса), для неї характерні ще й хвильові властивості, тобто за певних умов речовина поводить себе як хвиля. Її ідея полягала в тому, що співвідношення корпускулярних і хвильових властивостей має універсальний характер, притаманний будь-яким речовинам [22, 23]. Відкриття Луї де Бройля зумовило інтенсивний розвиток квантової механіки – фундаментальної фізичної теорії, яка характеризує та описує закономірності руху мікрочастинок, НЧ, елементарних частинок, ядер атомів, молекул і систем, що з них складаються, розширює, поєднує й уточнює закони класичної механіки та класичної електродинаміки.

Стівен Хокінг [24] стверджує, що «на квантовій механіці базуються сучасна хімія і біологія». Тому слід об'єднати зусилля учених різних спеціальностей для проведення ґрунтовних досліджень щодо визначення взаємозв'язку законів квантової механіки з біологічними, фізіологічними та біохімічними процесами у живих системах, а також дією лікарських засобів.

Наноматеріали органічного та неорганічного походження є об'єктом постійно зростаючого інтересу дослідників технічного, фізичного, хімічного, біологічного, медичного напрямів діяльності. Зі зменшенням їхніх розмірів до нанорівня такі структури набувають нових, незвичайних ознак, що можуть зумовлюватися їх різними властивостями, зокрема й корпускулярно-хвильовими. Переходом до нанорозмірів, композит CdSe може змінювати колір від червоного до фіолетового, що пов'язано зі зміною відстані між енергетичними рівнями речовини. Золото набуває не тільки нових оптичних характеристик, а й демонструє каталітичні функції, якщо частинки менші за 3 нм [25].

Квантово-розмірні ефекти в наноматеріалах визначаються поведінкою електронів, відбиттям електронних хвиль від меж поділу таких ділянок, а також їх інтерференцією або проходженням крізь потенціальні

бар'єри, квантуванням енергії електронів, просторово обмежених у своїх переміщеннях, проходженням електронів крізь нанометрові діелектричні прошарки, квантуванням електроопору квантових ниток (проводів). У більшості полікристалічних матеріалів зростає твердість межі пружності з одночасним зменшенням середнього розміру кристала (закон Холла – Петча), зі зміною міжатомних відстаней, перебудовою кристалічної ґратки, здійсненням хімічних реакцій, яких немає у об'ємних станах тощо [26, 27].

У нанорозмірних матеріалах виразніше проявляються: квантове, просторове обмеження, тунелювання, балістичний транспорт і квантова інтерференція, електронні, магнітні явища, хвильові функції, оптичні, електричні, магнітні властивості, зниження температури з одночасним збільшенням поверхневої енергії. У частинках розміром менше 10 нм електрони виявляють квантові об'єкти, а ефекти, які спостерігають у таких матеріалах, називають квантово-розмірними [28, 29].

Квантове обмеження виникає тоді, коли рух електронів хоча б в одному напрямку обмежується потенціальними бар'єрами, зумовленими наноструктурою. Воно впливає на спектр дозволених станів електронів і визначає їхній рух у наноматеріалах, який може змінюватися як у перпендикулярному, так і в паралельному напрямках до бар'єрів. Перенесення заряду перпендикулярно до бар'єрів можливе переважно завдяки ефекту тунелювання, який забезпечує перехід носіїв заряду з однієї ділянки наноелектронного приладу до іншої. Під час руху носіїв заряду вздовж потенціальних бар'єрів уможливорюються квантова інтерференція і балістичний транспорт електронів. Напрями квантової механіки за останні 50–60 років значно розширилися, з'явилися такі її відгалуження, як квантова фізика, квантова електроніка, квантова хімія, квантова теорія поля, квантова електродинаміка, квантова біохімія, квантова фармакологія [21, 22, 30, 31].

Нині вже встановлено характеристики НЧ, які можуть підтвердити значну роль хвильових ознак наноматеріалів у підвищенні їхніх механічних, термодинамічних, електронних, магнітних, каталітичних властивостей, а також біологічної, фармакологічної, токсикологічної активності. Як приклад можна навести вивчення якості спіну – хвильової характеристики наноматеріалів.

Спін (від англ. spin – веретено, обертання) – момент імпульсу елементарних частинок, що має квантову природу і не пов'язаний із переміщенням частинки як цілого. Це – фундаментальна характеристика частинки (наприклад, атомного ядра або елементарної частинки), яка в певному сенсі аналогічна «власному моменту імпульсу частинки». Спін є квантовою властивістю частинок і не має аналогів у класичній фізиці. Це кутовий і магнітний момент електрона, суто квантова його характеристика така ж невід'ємна, як і маса та заряд [32–34].

Фізіологічні та біохімічні процеси у живих системах, а також первинна фармакологічна реакція реалізуються за допомогою перенесення електронів і протонів з однієї молекули на іншу. Лікувальний ефект медикаменту – це фізико-хімічний і квантово-хімічний процеси, що відбуваються завдяки взаємодії лікарського засобу з тканинами організму: рецепторами, ферментами (цитохромоксидаза, холінестераза), білками, ліпідами, вуглеводами, АТФ, коферментами. При цьому утворюється лабільний чи стабільний комплекс. Під впливом лікарського засобу змінюється конформаційний стан біомолекул організму, що відновлює їх порушене хворобою функціонування. Про роль природних наноструктур в утворенні комплексу «гість – господар» поки що мало відомо. Подальші дослідження мають зосереджуватися на теоретичному аналізі такої взаємодії за допомогою методів квантових: фізики, хімії, механіки, електродинаміки, біохімії, а також молекулярної механіки, молекулярної динаміки та квантової фармакології. Отже,

постає питання: як виявлені цими науками властивості різних матеріалів, речовин, хімічних сполук, лікарських засобів впливають на організм, проявляючи лікувальну чи токсичну дію? Особливо це стосується нанопрепаратів. Нанокристалічна структура нових матеріалів з біоміметичною морфологією, яка відповідає фізико-хімічним, механічним, біологічним характеристикам живої тканини, може полегшити роботу лікарям-травматологам унаслідок покращення регенерації кісток [35, 36].

Біоматеріали відіграють ключову роль у пошуку тканин відновлення. Для застосування в тканинній інженерії сьогодні синтезують нанобіоматеріали. Штучні біоміметичні матеріали мають якісно відтворювати процеси набору клітин, адгезії, проліферації, диференціювання та неогенезису тканин. Багатогранність способів формування наноматеріалів із перспективними властивостями дає змогу уникати негативних економічних питань, нівелювати токсичність, поліпшувати стан навколишнього середовища. Синтетичні біоміметичні наноматеріали, розроблені на основі властивостей природних молекул органічного та неорганічного походження, інтенсивно досліджуються в багатьох країнах світу. Поліпшення інтеграції біоміметичних наноматеріалів в організмі людини є підставою для подальших наукових розробок у галузі біології, хімії, медицини для їх впровадження в наномедицину та нанофармакологію [17].

Властивості наноструктур

Нанорозмірні структури органічного та неорганічного походження – це матеріали, що об'єднують великий клас численних речовин, один із розмірів яких не більше 100 нм. Для них характерні такі загальні властивості.

Атоми на поверхні мають менше сусідніх атомів, ніж в об'ємі. Через мале координаційне число та наявність вільних зв'язків поверхневі атоми менш стабілізовані, ніж атоми в об'ємі. Чим менша частинка, тим більшою

є частка поверхневих атомів та вищою – середній енергії зв'язування. Співвідношення кількості поверхневих атомів до атомів в об'ємі обернено пропорційно залежить від розміру частинки, такий самий залежності підпорядковуються різні властивості матеріалів. Квантово-розмірний ефект спостерігається за умов малого розміру частинки, що порівнянний із довжиною хвилі електрона. У цьому сенсі під «обмеженням» слід розуміти обмеження вільного руху електрона у певних енергетичних рівнях. З наближенням розмірності структури до довжини хвилі електрона з'являється квантово-розмірний ефект, що призводить до зміни електромагнітних та оптичних властивостей [37, 38].

Важливою властивістю наноматеріалів є залежність поверхневої енергії та поверхневої морфології від розміру частинок – зі зменшенням розміру реакційна здатність поверхневих атомів зростає. На хімічні властивості наноматеріалів істотно впливає велика площа поверхні частинок. Так, у НЧ заліза розміром 3 нм 50% атомів містяться на поверхні, розміром 10 нм – 20%, розміром 30 нм – лише 5% [39]. Велика питома площа поверхні, значно прискорює взаємодію наноматеріалів і середовища, а також мембрани клітини [40].

Речовина в наноматеріалі знаходиться в особливому, “нанорозмірному” стані, в якому виражено проявляються квантово-механічні ефекти за домінуючої ролі поверхні поділу. Таким чином, основними причинами відмінностей у властивостях наноматеріалів і масивних об'єктів аналогічного хімічного складу є існування певних поверхневих і квантово-розмірних ознак [41].

Нанорозміри таких матеріалів дають змогу легко проникати через мембрану всередину клітини, спричинюючи зміни в її функціонуванні та морфологічній структурі. Значна мініатюризація зумовлює можливість розміщення великої кількості не тільки функціональних груп, а й пристроїв. Це важливо для сфер медицини, наноелектроніки, нанокомпозитних покриттів [42].

У наноматеріалах немає структурних дефектів, що надзвичайно важливо для розробки нових імплантатів, покриттів суглобів. Значна поверхня наноструктур уможливорює фіксування на них лікарських засобів та інших фізіологічно активних речовин, створюючи своєрідні композити. Такі нанокомпозити можуть накопичуватися у патологічному процесі, істотно підвищуючи дозу та лікувальну ефективність препарату [43].

Зі зменшенням розмірів наноструктур змінюються механічні, фізичні, хімічні, біологічні, фізіологічні та фармакологічні властивості. Доцільно зіставити фізичні властивості (кристалічну модифікацію, температуру плавлення, поверхневий натяг, теплопровідність, магнітні, оптичні та інші характеристики) наноматеріалів з медико-біологічними (вплив на органи та функціональні системи організму, життєдіяльність мікроорганізмів, токсичність). Слід зазначити, що багато фізичних, хімічних, фізико-хімічних, біологічних властивостей не зберігаються за умов переходу від об'ємного стану до наноматеріалу. Але пояснити ці зміни в нанорозмірних структурах збільшенням тільки питомої поверхні атомів, а також значним зростанням у таких наноматеріалах числа поверхневих атомів без урахування їх квантоворозмірних ефектів і корпускулярно-хвильових властивостей неможливо.

Нанорозмірним структурам притаманна самоорганізація – спільна взаємодія атомів з утворенням впорядкованої системи. Принцип самоорганізації полягає в тому, що молекули намагаються зайняти найнижчий із доступних для цих структур рівень енергії, поєднуючись з іншими молекулами. Сили, які задіяні в самоорганізації, слабкіші за ті, що утримують молекули разом у матеріалі. Вони відповідають слабшим силам кулонівської взаємодії і доволі часто спостерігаються у природі. Самоорганізація є одним із важливих принципів функціонування живих організмів.

Упродовж останніх п'ятнадцяти років на кафедрі фармакології Національного ме-

дичного університету ім. О.О. Богомольця (Київ, Україна) досліджують фармакологічні і токсикологічні властивості нанодисперсного кремнезему, наносрібла, наноміді, нанозаліза, нановуглецю, а також їхніх композитів [44, 45]. Отримані результати дають автору статті підстави висловити нову ідею: з позицій квантової механіки та квантової фізики підвищення фізіологічної, біохімічної та фармакологічної активності нанорозмірних структур зумовлене переважанням у них хвильових властивостей над корпускулярними [46]. Не виключено, що для нанорозмірних речовин характерні інші особливості, які наукою ще не відкриті.

Практичні аспекти нанонауки

На основі досліджень з нанонауки і в Україні, і в світі вже розроблені лікарські засоби, наприклад мазь із наносріблом, капсули, які містять НЧ заліза, ліпосоми, фулерени і дендримери для діагностики захворювань і цільової доставки лікарських засобів. Слід підкреслити, що українським ученим академіком О.О. Чуйком уперше в світі розроблено синтез, вивчено фармакологічні властивості та впроваджено в медичну практику нанопрепарат – силікс нанодисперсного кремнезему [47]. Важливим здобутком є використання методик генної інженерії, регенеративної медицини та наномедицини, побудованих на досягненнях нанобіотехнологій, причому чинником максимального успіху може стати їх поєднання з діагностикою захворювань за допомогою квантових міток, фулеренів, нанотрубок, дендримерів, нанобіосенсорів. Дослідження з біонанотехнологій проводяться для поєднання біологічних молекул зі створеними людиною природними та синтетичними наноструктурами.

У 2008 р. організовано спільну лабораторію “Електронно-променеві нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини” Інституту електрозварювання ім. Є.О. Патона (керівник – академік НАН України Б.О. Мовчан) і кафедри фармакології (керівник – член

кореспондент НАН України І.С. Чекман) Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця. Науковці лабораторії разом із викладачами кафедри фармакології медичних вишів, співробітниками установ НАН України та НАМН України розробили технологію отримання НЧ срібла, міді, їхніх композитів із нанодисперсним кремнеземом або полівінілпіролідом, а також нанозаліза як субстанції для ліків. Встановлено, що субстанції НЧ цих металів виявляють більш виражену протимікробну чи протианемічну дію. Розроблено технологію одержання лікарських форм: мазь, гель, емульсія, капсули наночастинок срібла, міді, їхніх композитів, а також заліза. Отримані препарати в майбутньому можна застосовувати для лікування ран, виразок, анемії, інфекційних і вірусних захворювань.

Висновки

Амінокислоти, вітаміни, медіатори, РНК, ДНК, альбумін та інші фізіологічно активні речовини живих організмів, мембрани клітин, стінка капілярів, іонні канали організму мають нанорозмірні параметри. Зі зменшенням розміру об'єкта дедалі більшу роль відіграють квантово-хвильові ефекти наноматеріалів. Переважання хвильових властивостей у наноматеріалах над корпускулярними зумовлює значну зміну їхніх фізико-хімічних характеристик і підвищення біологічної, біохімічної та фармакологічної активності. Не всі зазначені в статті положення експериментально підтверджені, деякі потребують додаткових досліджень фахівців різних спеціальностей. Міждисциплінарні розробки у подальшому сприятимуть встановленню нових властивостей наноматеріалів. Не менш важливим з погляду перспективи є той факт, що перехід від традиційних макро- та мікротехнологій до нанотехнологій не тільки допоможе з'ясувати механізми багатьох фізіологічних і молекулярних процесів, а й розробити нанопродукти, наносистеми та нанопрепарати.

Це забезпечить значну економію сировини, енергії, фінансів, відкриє шлях до ефективнішого розв'язання соціальних, матеріальних, екологічних і медичних проблем людства.

Вилովлюю щирю подяку академіку НАН України А.Г. Наумовцю, член-кор. НАН України М.П. Кулішу, член-кор. НАН України А.В. Рагулі, професорам В.М. Гунько, В.В. Лобанову, Н.В. Стучинській, Я.В. Цехмістеру, кандидатам наук О.П. Дмитренко та О.О. Казаковій, аспіранту П.В. Сімонову за допомогу й цінні рекомендації при підготовці статті до друку.

И.С. Чекман

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОРОЗМЕРНЫХ СТРУКТУР

Обобщены данные литературы и результаты исследования автора по теоретическим и практическим основам нанонауки. В последние годы ученые активно изучают физические, химические, биологические, физиологические, фармакологические, токсикологические свойства наноматериалов с целью более широкого применения их в медицинской практике. Особенно важными являются открытия новых квантово-волновых свойств наночастиц. Автор статьи обосновывает идею: по мере уменьшения размера наноструктур всё большую роль играют волновые свойства наноматериалов. Превалирование квантово-волновых свойств в наноструктурах над корпускулярными обуславливает значительные изменения их физико-химических параметров, повышение физической, механической, биологической, физиологической, фармакологической, токсикологической активности. Сформулированная в статье гипотеза требует подтверждения теоретическими и экспериментальными исследованиями, объединения усилий ученых различных научных направлений. Подтверждение конкретными результатами выдвинутой идеи будет иметь важное значение для физиологии, медицины, фармакологии, способствуя внедрению в клиническую практику новых эффективных медикаментов. Только на стыке наук можно совершать новые фундаментальные открытия. Ключевые слова: нанонаука; наноматериалы; волновые свойства; квантовая физика; квантовая механика; нанофармакология.

I.S. Chekman

PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF NANOMATERIALS

Literature data and results of our department studies on theoretical and practical basics of nanoscience were

summarized in the article. Much attention is paid to research in the field of physical, chemical, biological, medical, physiological, pharmacological, and toxicological properties of nanomaterials with the aim of their wider implementation into practice lately. The discovery of new quantum/wave properties of nanoparticles is of particular importance. The author of the article advances an idea: wave properties of nanomaterials play greater role with a decrease in particle size. The preponderance of wave properties compared with corpuscular ones in nanostructures determines a great change in their physical-chemical properties and an increase in physical, mechanical, biological, physiological, pharmacological, and toxicological activity. The idea advanced in the article hasn't been verified by theoretical or experimental studies for now. Joined efforts of scientists of different scientific fields are needed. A confirmation of hypothesis by specific findings will be of great importance for physiology, medicine, pharmacology and promote an implementation of new efficacious preparations into clinical practice. New fundamental discoveries could be made only by multidisciplinary approach.

Key words: nanoscience; nanomaterials; wave properties; quantum physics; quantum mechanics; nanopharmacology.

Bogomolets National Medical University, Kyiv

REFERENCES

1. Horbyk, P. P., Horobets, S. V., Turelyk, M. P., Chekhun, V. F., & Shpak, A. P. Biofunktionalizatsia nanomaterialiv i nanokompozytiv [The biofunctionalization of nanomaterials and nanocomposites]. 2011, Kyiv: Naukova Dumka.
2. Rahulia, A. V., & Skorokhod, V. V. Konsolidirovannye nanostrukturnye materialy [Consolidated nanostructured materials]. 2007, Kyiv: Naukova Dumka.
3. Di Ventra, M., Evoy, S., & Heflin, R. Introduction to nanoscale science and technology. (2004). New York: Springer.
4. Shaefer, H. E.. Nanoscience. The science of the small in physics, engineering, chemistry, biology and medicine. 2010, Berlin, Heidelberg: Springer.
5. Chekman, I. S., & Simonov, P. V. Pryrodni nanostrukturny ta nanomekhanizmy [Natural nanostructures and nanomechanisms]. 2011, Kyiv: Zadruga.
6. Chekman, I. S. & Simonov, P. V. Structure and function of biological membranes: the impact of nanoparticles. 2012, International Physiology and Pathophysiology, 3(2), 187-208.
7. Chekman, I. S., Tarasova K. V., Shevchuk V. H. Physiological properties and possible correction of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel function. 2008, Fiziol Zh., 54(1), 94-107.
8. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. Molecular biology of the cell (5th ed.). 2008, New York: Garland Publishing.
9. Helms, J. B., & Zurzolo, C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. 2004, Traffic,

- 5(4), 247-54.
10. Simons, K., & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2010. 11(10), 688-99.
11. Krishnamurthy, V., Monfared, S., & Cornell, B. Ion channel biosensors – part I: construction, operation, and clinical studies. 2010. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 9(3), 313-22.
12. Bocquet, L., & Charlaix, E. Nanofluidics, from bulk to interfaces. 2010. *Chemical Society Reviews*, 39(3), 1073-95.
13. Schliwa, M., & Woehlke, G. Molecular motors. 2003. *Nature*, 422(6933), 759-65.
14. Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F., & Stefanini, S. Iron and proteins for iron storage and detoxification. 2004. *Biometals*, 17(3), 197-202.
15. Strbak, O., Kopcansky, P., & Frollo, I. Biogenic magnetite in humans and new magnetic resonance hazard questions. 2011. *Measurement Science Review*, 11(3), 85-91.
16. Tesch, W., Eidelman, N., Roschger, P., Goldenberg, F., Klaushofer, K., & Fratzl, P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. 2001. *Calcified Tissue International*, 69(3), 147-57.
17. Vallet-Regi, M., & Ruiz-Hernandez E. Biomimetics: nanoceramics from bone regeneration to cancer nanomedicine. 2008. *Adv. Mater.* 23(44), 5177-218.
18. Roiter, Y., Ornatska, M., Rammohan, A. R., Balakrishnan, J. Heine, D. R., & Minko S. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. 2009. *Langmuir*, 25(11), 6287-99.
19. Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., & Memic, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. 2012. *Internat. Nanomedicine*, 7, 3527-35.
20. Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Schleh, C., Wenk, A., Lipka, J., Schäffler, M., Takenaka, S., Möller, W., Schmid, G., Simon, U., & Kreyling, W. G. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. 2011. *Eur J Pharmacol and Biopharmaceut.* 77(2), 407-16.
21. Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., & Kahru, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. 2014. *PLoS One*, 9(7), e102108.
22. Vakarchuk, I. O. 2012. *Kvantova mekhanika [Quantum mechanics]*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv.
23. Landau, L. D., & Lifshyts, E. M. *Kvantovaia mekhanika. Nerelativisticheskaya teoriya. Teoreticheskaya fizika [Quantum mechanics. Non-relativistic theory. Theoretical physics]*. 2008. Moskva: Fizmatlit.
24. Hoking, S. *Kratkaia istoria vselennoi [A brief history of time] (translated from English)*. 2010. Saint Petersburg: Amfora.
25. Thompson, D. Michael Faraday's recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology. His 1857 lecture to the royal society in London. *Gold Bulletin*. 2007. 40(4), 267-69.
26. Poplavko, Yu. M., Borysov, O. V., & Yakymenko, O. I. *Nanofizyka, nanomaterialy, nanoelektronika [Nanophysics, nanomaterials, Nanoelectronics]*. 2012. Kyiv: NTUU KPI.
27. Shirinian, A. S., & Makara, V. A. Current problems of nanomaterials and nanotechnology. *Nanosystemy, Nanomaterialy, Nanotekhnologii*, 2010. 8(2), 223-69.
28. Demikhovski, V. Ya., & Vugalter, G. A. *Fizika kvantovykh nizkorozmernikh struktur [The physics of quantum low-dimensional structures]*. 2000. Moscow: Lotos.
29. Yekimov, A. I., & Onushchenko, A. A. A quantum-dimensional effect in three-dimensional semiconductor microcrystals. *Pisma v ZETF*, 1981. 34, 363-66.
30. Liulman, B., & Liulman, A. *Kvantovaia biokhimiya [Quantum biochemistry]*. 1965). Moscow: Mir.
31. Chekman, I. S. *Kvantova farmakologia [Quantum pharmacology]*. 2012). Kyiv: Naukova Dumka.
32. Minaev, B. P. On electron mechanisms of molecular oxygen activation, *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 2009. 81(3), 3-28.
33. Chekman, I. S., Minaev, B. P., & Nebesna, T. Yu. A synthesis of a new type of silver and gold nanoparticles with the use of synthetic humic compounds (a literature and personal study review). *Zhurnal NAMN Ukrainy*, 2013. 18(4), 451-60.
34. Ziese, M., & Thornton, M. J. *Spin electronics; lecture notes in physics*. 2001. Berlin: Springer.
35. Uvarova, I. V., Horbik, P. P., Horobets, S. V., Ivashchenko, O. A., & Ulianchych, N. V. *Nanomaterialy medychnoho pryznachnna [Nanomaterials for medical application]*. 2014. Kyiv: Naukova Dumka.
36. Chekman, I. S., Ulberh, Z. R., Malanchuk, V. O., Horchakova, N. O., & Zupanets, I. A. *Nanonauka, nanobiologia, nanofarmatsia [Nanoscience, nanobiology, nanopharmacy]*. 2012. Kyiv: Poligraf Plus.
37. Abramov, N. V., Bagatskaia, A. N., & Beliakova, L. A. *Nanomaterialy i nanokompozity v meditsyne, biologii, ekologii [Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology]*. 2011. Kyiv: Naukova Dumka.
38. Chandra Sekhar, M., Rao, M. N., Prasad, B. V. K., & Suryanarayana, S. V. Vitality of physics in nanoscience and nanotechnology. *IOSR J. App. Physics*, 2015. 7(1), 1-5.
39. Klabunde, K. J. *Nanoscale materials in chemistry*. 2001. New York: John Wiley & Sons.
40. Qu, L., Dai, L., Stone, M., Xia, Z., & Wang, Z. L. Carbon nanotube arrays with strong shear binding-on and easy normal lifting-off. *Science*, 2008. 322(5899), 238-42.
41. Roduner, E. *Nanoscope materials: size-dependent phenomena*. 2006. Cambridge: RSC Publishing.
42. Pohrebniak, A. D., Shpak, A. P., Azarenkov, N. A., & Beresnev, V. M. The structure and properties of hard and

- superhard nanocomposite coatings. Uspekhi Fizicheskikh Nauk, 2009. 179(1), 35-64.
43. Oleinikov, V. A. Quantum dots – nanosized sensors for medicine and biology. Priroda, 2010. (3), 22-28.
44. Paton, B. E., Moskalenko, V. F., Movchan, B. O., & Chekman, I. S. Nanoscience and nanotechnology: technical, medical and social aspects. Visnyk NAN Ukrainy, 2009 (6), 18-26.
45. Chekman, I. S. Nanofarmakologia [Nanopharmacology]. 2011. Kyiv: Zadruha.
46. Chekman, I. S. Wave properties of nanoparticles: the view of a problem. Likarska Sprava, 2013. 7, 3-8.
47. Chuiko, A. A., Pohorelyi, V. K., & Pentiuk, A. A. Maditsinskaia khimia i klinicheskoe primenienie dioksida kremnia [Medical chemistry and clinical application of silica dioxide]. 2003. Kyiv: Naukova Dumka.

*Матеріал надійшов до
редакції 24.03.2015*

Рецензія на монографію П.І. Янчука «Нейрогуморальна регуляція кровообігу і тканинного дихання печінки» (Київ: «Вік принт», 2014. – 304 с.)

Одне із найбільш важливих і невирішених у проблемі нейро-гуморального контролю гомеостазу організму – це питання участі різних відділів ЦНС, головним серед яких у координації вісцеральних функцій є гіпоталамус, та ендокринної системи, що тісно з ним пов'язана, у регуляції кровообігу та кисневого балансу печінки. Остання – це життєво важливий орган з високою метаболічною активністю у зв'язку з виконанням таких функцій, як жовчосекреторна, обміну речовин, синтетична, депонувальна, дезінтоксикаційна, терморегуляції тощо, для реалізації яких необхідне адекватне постачання з кров'ю кисню та пластичного матеріалу до її функціональних елементів. Такі особливості печінки, як подвійне кровопостачання та високий рівень метаболізму зумовлюють дещо відмінні від інших регіонів механізми регуляції її гемодинаміки і кисневого гомеостазу.

У монографії П.І. Янчука проаналізовано світові наукові досягнення та багаторічні експериментальні дослідження, проведені власне автором. У першому розділі подана характеристика судинного русла та тканинного дихання печінки, детально розглядається будова внутрішньопечінкової кровоносної системи, особливості печінкової гемодинаміки, саморегуляція кровотоку в залозі, а також зв'язок тканинного дихання в ній з процесами, що супроводжуються споживанням O_2 гепатоцитами.

Окремий розділ монографії присвячений експериментальним методам дослідження впливу нейрогуморальних факторів на кровообіг і тканинне дихання печінки. Автором описуються умови проведення гострих та

хронічних дослідів на тваринах, стереотаксичне введення електродів і подразнення досліджуваних структур головного мозку, параметри їх електричного подразнення, електростимуляція периферичних нервів, реєстрація показників кровообігу печінки і черевних органів, вимірювання напруження кисню в залозі та визначення швидкості споживання нею O_2 , хірургічне виключення іннервації печінки та функціонування залоз внутрішньої секреції. Представлені різні варіанти відпрацювання експериментальних моделей портальної гіпертензії у дослідних тварин. Слід відзначити, що частина описаних методів досліджень розроблена власне П.І. Янчуком і захищена авторськими свідоцтвами на винахід та патентми або опублікована у фахових виданнях. На мій погляд, детальний опис цих методів може бути корисним науковцям-фізіологам.

У наступному розділі «Участь різних рівнів центральної нервової системи у регуляції кровообігу та тканинного дихання печінки» автор спочатку аналізує відомості світової наукової літератури щодо нервового контролю діяльності серцево-судинної системи. Зокрема висвітлені питання ролі гіпоталамуса, довгастого мозку, симпатичного і парасимпатичного відділів автономної нервової системи у цьому процесі. Далі представлений великий експериментальний матеріал, отриманий автором. Подаються нові цікаві з наукової точки зору дані щодо участі різних рівнів ЦНС у регуляції кровообігу і тканинного дихання печінки. Встановлено, що структури гіпоталамуса диференційовано впливають на постачання кров'ю кисню до печінки та на споживання

нею O_2 : електростимуляція медіальних ядер середнього і заднього гіпоталамуса активує дихання гепатоцитів поряд із зменшенням постачання кисню до печінки та зниженням у ній pO_2 ; симпатогальмівної зони – пригнічує окиснювальний метаболізм у гепатоцитах, зменшуючи одночасно надходження O_2 до органа та майже не змінюючи в ньому pO_2 ; супраоптичного і латерального гіпоталамічного ядер – не впливає на дихання печінки, але зміщує рівень pO_2 в ній внаслідок змін кровопостачання.

Ядра довгастого мозку поряд із диференційованим впливом на системний артеріальний тиск значно менше порівняно з гіпоталамусом діють на кровопостачання печінки та споживання нею кисню. При подразненні ядра солітарного тракту і латерального ретикулярного ядра дихання гепатоцитів зростає, вентрального ретикулярного ядра – пригнічується, а гігантоклітинного ретикулярного ядра – не змінюється. Напруження кисню в печінці при цьому вірогідно не змінюється. На підставі отриманих результатів П.І. Янчук робить висновок, що гіпоталамус зумовлює специфічний і диференційований вплив на кровопостачання і дихання печінки у тісному зв'язку з регуляцією діяльності органів травлення та інших систем організму під час реалізації здійснюваних ним гомеостатичних реакцій. Довгастий мозок діє на кровообіг і дихання печінки настільки наскільки це необхідно для реалізації реакцій по стабілізації системної гемодинаміки і кисневого гомеостазу організму.

Подразнення симпатичних нервів печінки зумовлює зменшення споживання нею кисню і лише в третині випадків – його зростання; напрямок реакцій pO_2 в залозі протилежний до змін споживання O_2 . Постачання O_2 до печінки при цьому тільки зменшується внаслідок звуження її судин. Подразнення парасимпатичних нервів печінки не впливає на тонус її судин, проте агоніст холінорецепторів ацетилхолін звужує внутрішньопечінкові ворітні судини поряд із

розширенням артеріальних судин організму. Різниця в метаболічних ефектах центральної та периферичної стимуляції симпатичної нервової системи, на думку автора монографії, пов'язана з активацією всіх волокон симпатичного нерва у останньому випадку, які мають різні функції. При цьому виникає складна реакція-артефакт, що не відповідає жодному фізіологічному стану печінки. Показано, що в судинах печінки щільність і активність α -адренорецепторів переважає над такими β -адренорецепторів, тоді як у гепатоцитах навпаки – щільність та активність β -адренорецепторів істотно перевищує такі α -адренорецепторів.

У розділі «Зміни кровообігу і дихання печінки під впливом гуморальних факторів» автор детально розглядає участь гормонів гіпофіза, катехоламінів, ацетилхоліну, аденозину, гормонів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у регуляції гемодинаміки і кисневого гомеостазу. На підставі отриманих результатів П.І. Янчук робить висновок про те, що гормони гіпофіза чинять специфічний і диференційований вплив на функціонування досліджуваного органа. Тривала дія гормонів гіпофіза кортикотропіну і тиреотропіну призводить до розширення судин брижі і печінки та збільшення її кровотоку. Активність дихання залози при цьому змінюється залежно від його вихідного рівня. Здійснюються ці зміни із залученням посередників та за допомогою каскадної взаємодії гормонів. На думку автора, запуск гіпоталамусом таких тривалих гуморальних впливів на функціонування печінки є фізіологічно доцільним, тому що він спрямований на оптимальне забезпечення органа киснем і поживними речовинами під час генералізованих реакцій організму, пов'язаних із тривалим зростанням обмінних процесів в органі. Наприклад, під час активації гіпоталамусом процесів травлення, харчової поведінки тощо.

У роботі представлені зміни кровообігу та кисневого балансу печінки впродовж три-

валої дії пептидних гормонів ШКТ. Автором припускається участь саморегуляторних і рефлекторних механізмів у реакціях печінкової гемодинаміки на введення цих гормонів. Показана можливість різних шляхів корекції постачання функціональних елементів залози киснем при зміні його споживання під впливом пептидів ШКТ.

Автор монографії вказує на те, що центральні нервові структури і насамперед гіпоталамус, активуючи ренін-ангіотензинову систему, також впливають на діяльність різних органів і систем, у тому числі й печінки. Головна діюча складова ренін-ангіотензинової системи ангіотензин-II поруч із звуженням судин брижі, артеріальних та ворітних судин залози, що призводить до зменшення постачання її киснем, одночасно пригнічує тканинне дихання в органі. Така дія гормону є щадною відносно гепатоцитів.

Істотні зміни окиснювального метаболізму в печінці викликають катехоламіни. Адреналін підвищує споживання нею кисню на тлі короточасного і різкого зменшення постачання до неї артеріальної і ворітної крові, яке змінюється на більш тривале зростання об'ємної швидкості артеріального кровотоку; напруження кисню в органі при цьому зменшується. Норадреналін пригнічує тканинне дихання в печінці, яке відбувається на фоні аналогічних змін її кровопостачання і рівня pO_2 в ній. П.І. Янчук робить надзвичайно цікаве заключення, що катехоламіни при дії на організм стресорних факторів в умовах великого фізичного і розумового навантаження активно виділяються наднирковими залозами та симпатичною нервовою системою. Дія адреналіну на судини печінки і на гепатоцити аналогічна впливам медіальних структур середнього та заднього гіпоталамуса, в яких розташований центр «захисних реакцій». При цьому звужуються судини брижі і печінки, в результаті чого зменшується печінковий кровотік, а депонована в органі кров активно надходить до кровоносного русла організму. Такі зміни кровотоку в печінці та інших ор-

ганах ШКТ спрямовані на перерозподіл його на користь скелетних м'язів, серця, мозку, активність яких під час стресових реакцій зростає. Поряд з цим активується окиснювальний метаболізм в печінці, що пов'язано із посиленням за цих умов процесів глікогенолізу-глюконеогенезу в органі і спрямовано на підтримання гомеостазу організму.

Завдяки проведеному порівняльному аналізу, автор дійшов висновку, що найбільший вплив із вивчених нейрогуморальних чинників на печінкову гемодинаміку мають медіальні структури середнього і заднього гіпоталамуса, катехоламіни, ангіотензин-II і вазопресин, дія яких спрямована на перерозподіл кровотоку за екстремальних умов на користь органів, що беруть активну участь у емоційно-поведінкових реакціях. Найістотніше змінюють дихання печінки секретин, холецистокінін, субстанція P і кортикотропін, які беруть до того ж участь у гомеостатичних реакціях організму.

Надзвичайно важливий як з теоретичної, так і з практичної точки зору останній розділ монографії, присвячений портальній гіпертензії, – одного з найтяжчих захворювань печінки, що супроводжується високою смертністю, зумовленою головним чином сильними кровотечами в стравоході та інших відділах ШКТ. Пошук підходів до лікування цієї важкої хвороби є актуальним і дуже важливим для клініцистів. П.І. Янчук уперше показав, що хронічне подразнення гіпоталамуса може призводити до розвитку внутрішньопечінкової форми портальної гіпертензії. Крім того, автор у дослідях на щурах вивчив три моделі експериментальної портальної гіпертензії: нітрозоамінову, натрій-йодну і чотирихлорвуглецеву. Він дійшов висновку, що натрій-йодна модель найбільш відповідає деяким ідіопатичним формам портальної гіпертензії у людини. У хронічних дослідях на собаках, використовуючи цю модель, авторові удалося підібрати комбінацію з двох препаратів: нітропрусиду натрію і дібазолу, яка здійснює стійкий позитивний вплив на

перебіг портальної гіпертензії, що полягає в нормалізації показників гемодинаміки, тканинного дихання і морфоструктури печінки. Запропоновану методику корекції спостережуваних порушень можна рекомендувати до клінічних випробувань.

Принциповими особливостями проведеного П.І. Янчуком дослідження є системний підхід, комплексна одночасна реєстрація показників кровообігу та кисневого балансу печінки в експериментах *in vivo*; використання переважної більшості досліджених гуморальних факторів у дозах, що не виходять за межі фізіологічної концентрації цих речовин у крові; проведення хронічних дослідів за умов максимально наближених до нормальних.

Отримані автором та викладені у монографії результати досліджень розширюють і поглиблюють знання про нейрогуморальні механізми регуляції кровообігу і кисневого

гомеостазу печінки. П.І. Янчуком запропонована принципово нова концепція про координувальну і провідну роль гіпоталамуса у нейрогуморальній регуляції кровопостачання та дихання печінки: завдяки диференційованим впливам на функціональні елементи залози він змінює нервовим шляхом (терміново), або ж із залученням гормонів (впродовж тривалого часу) її кисневий баланс і кровопостачання під час реалізації гомеостатичних і поведінкових реакцій організму.

Необхідно відзначити високий методичний рівень та велику трудомісткість проведених автором і представлених на суд читача досліджень. Викладені у монографії результати власних досліджень широко опубліковані П.І. Янчуком як у вітчизняних, так і зарубіжних авторитетних виданнях, про що свідчать посилення літератури. Монографія представляє інтерес для спеціалістів з фізіології людини і тварин, патологічної фізіології та клініцистів.

Член-кореспондент НАН України
В.Ф. Сагач

19- й з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (Львів, 24-26 травня 2015 р.)

Українське фізіологічне товариство є потужною суспільною організацією з великими традиціями, діяльність якої спрямована на об'єднання вчених-фізіологів, створення умов для ефективного наукового співробітництва, підвищення ефективності і авторитету української фізіологічної науки. Товариство нараховує близько 700 членів, його відділення розміщені у всіх регіонах України, практично у всіх обласних центрах.

19-й з'їзд Українського фізіологічного товариства був проведений у важкий для України час. До участі в роботі з'їзду було подано понад 500 заявок практично з всіх регіонів України, а також із Росії, Білорусії, Литви, Нідерландів і США. Складна політична і особливо економічна ситуація в країні завадили частині членів товариства і гостей приїхати у Львів, проте, в роботі з'їзду взяли участь більше ніж 200 делегатів: академіки і члени-кореспонденти НАН України та УААН, професори, доктори та кандидати наук, а також велика кількість наукової молоді.

Засідання проходили у приміщеннях Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Ми дуже вдячні ректору Університету проф. Б.С.Зіменковському, першому проректору, члену-кор. НАМН України М.Р.Гжегоцькому, в.о. завідувача кафедри фізіології Університету О.Г.Мисаковцю, а також проф. Р.С.Федоруку (Інститут біології тварин) за вагомий внесок у організацію і проведення 19-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка з міжнародною

участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка.

На з'їзді були прочитані 4 пленарні лекції, зокрема: “Протонна сигналізація: новий вимір у функціональному рельєфі мозку” (акад.О.О.Кришталь), “Газотрансмітери, мітохондрії та функція серця у старих і тренуваних тварин” (член-кор. В.Ф.Сагач), “Сприйняття інформації мозком жінок і чоловіків” (проф. М.Ю.Макарчук), “Особливості адаптаційних реакцій у системах з різним рівнем резистентності” (М.Р.Гжегоцький, С.М.Ковальчук, О.І.Чупашко, В.Паніна, О.Г.Мисаковець).

Секційні засідання охоплювали найбільш актуальні питання молекулярної і клітинної фізіології, системної нейрофізіології, психофізіології, фізіології ендокринної системи, дихання, серцево-судинної системи, травної і видільної систем, спорту, вікової фізіології, імуніфізіології і фізіології репродуктивної системи, екологічної фізіології та впливу екстремальних факторів на організм, клінічної фізіології і фізіології сільськогосподарських тварин, що свідчить про широкий спектр питань фізіологічної науки, що досліджується в Україні.

У пленарних та секційних доповідях ґрунтовно проаналізовані досягнення сучасної української та світової фізіології, тенденції та перспективи розвитку найбільш актуальних напрямків фундаментальних і прикладних досліджень. На з'їзді сформульовано завдання щодо подальшої інтеграції українських учених в європейську та світову фізіологічну

спільноту, наголошено на необхідності приділяти більшу увагу талановитій студентській і науковій молоді. Активно обговорювали питання про зміцнення міжнародних контактів товариства, участі вчених-фізіологів у міжнародних конференціях, з'їздах, школах і семінарах, які присвячені актуальним проблемам фізіології. Відмічено посилення зв'язків із суміжними дисциплінами: біохімією, біофізикою, молекулярною генетикою та нанотехнологією. У рамках з'їзду проведено засідання завідувачів кафедр фізіології медичних вузів, де обговорювалися найактуальніші питання викладання фізіологічної науки в Україні.

Слід відмітити високий рівень наукових доповідей, зроблених молодими науковцями. Зокрема, на з'їзді були відзначені нагородами 40 молодих науковців, зокрема С.П.Бесчасний (Херсонський державний університет), А. О. Боженко (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Т.В.Болгова (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Бондаренко (Національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ), А.К.Бортнікова (Донецький медичний університет), Т.В.Вовкун (Національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ), Л.І.Галузіна (Дніпропетровський державний аграрний університет), Ю.В.Гошовська (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Є.О.Грушевський (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Т.В. Гуранич (Івано-Франківський національний медичний університет), К.В.Гуржій (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Денисенко (Одеський національний університет, Одеський національний медичний університет), О.П.Долайчук (Інститут біології тварин НААН, Львів), Т.І.Древицька (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Р.І.Добровольська (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Довгань (Вінницький національний медичний університет), Н.О.Дорофєєва (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), К.О.Драчук (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Н.В.Друзь (Націо-

нальний університет біоресурсів та природокористування України, Київ), А.С.Жуковська (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), М.М.Змія (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького), М.Ю.Єдутенко (Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця), І.А.Коломієць (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького), Т.А.Королишин (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Б.С.Коп'як (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), А.М.Котлярова (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Н.І.Купиняк (Львівський національний Університет ім.Івана Франка), О.В.Линчак (Національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ), О.О.Лунько (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Лунько (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Лукаш (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Б.О.Манько (Львівський національний Університет ім. Івана Франка), Д.Ф.Милостива (Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет), О.В.Мельник (Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького), Н.Г.Побігун (Івано-Франківський національний медичний університет), С.О.Собіщанський (Національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ), М.І.Храбко (Інститут біології тварин НААН, Львів), В.П.Черкас (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), Є.Ю.Шеремет (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця), О.В.Шинкарук (Науково-дослідний інститут Національного університету фізичного виховання і спорту України).

Аналіз матеріалів з'їзду дає змогу зробити висновок, що у звітний період фізіологічна наука в Україні досягла певних успіхів. Членами Українського фізіологічного товариства проведено великий обсяг наукових досліджень, значна частина яких є пріоритетними, виконаними на високому методичному рівні.

Делегати з'їзду підтримали ініціативу проф. С.Н. Вадзюка про запровадження

«Дня фізіолога» в останню неділю квітня поточного року, і для обґрунтування його доцільності створена робоча група у складі проф. С.Н.Вадзюка, проф. Р.С. Федорука. і д.б.н. Л.М. Шаповал.

На з'їзді звертали увагу на низку невирішених питань, які потребують систематичної уваги з боку президії товариства та керівників обласних відділень. Зокрема, слід шукати нові, адекватні сучасним умовам форми наукової та науково-організаційної роботи і співпраці, ефективніше залучати до досліджень талановиту молодь, постійно розширювати міжнародні наукові контакти. На всіх рівнях – від президії до наукових і навчальних установ – вкрай важливо поживити діяльність, спрямовану на залучення додаткових коштів від спонсорів, за вітчизняними та міжнародними

науковими проектами та грантами. Це дасть можливість поновити застаріле лабораторне обладнання, поліпшити матеріальне забезпечення вчених.

На з'їзді був затверджений новий склад центральної ради Українського фізіологічного товариства, президентом обрано акад. О.О.Кришталю, віце-президентами – акад. НАМН В.М.Мороза (Вінниця), член-кор. НАМН М.Р.Гжегоцького (Львів), член-кор. НАН України В.Ф.Сагача (Київ) і проф. Р.С.Федорука (Львів), генеральним секретарем – д.б.н. Л.М.Шаповал.

Наступний з'їзд Українського фізіологічного товариства буде проведено у 2019 р. у м. Київ на базі Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України і буде присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка.

Секретар Українського фізіологічного товариства
доктор біологічних наук
Л.М.Шаповал

CONTENTS

K.O. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach. Hydrogen sulfide donor, NAHS, recovers constitutive no synthesis and endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats	3
E.V. Isaeva, O.O. Lunko, A.K. Romanov, D.S. Isaev. Effect of neonatal seizures on the synaptic plasticity of rat somatosensory cortex	11
A.Yu. Budko, N.A. Strutynska, I.Yu. Okhay, O.M. Semenykhina, V.F. Sagach. Ca^{2+} accumulation in isolated rat heart mitochondria under maintenance of mitochondrial potential	17
A.A. Tykhomyrov, D.D. Zhernosekov, Y.M. Roka-Moya, S.I. Diordieva, T.V. Grinenko. The effects of lys-plasminogen on human platelet secretion	26
O.A.Gonchar, V.I.Nosar, L.V.Bratus, I.N.Tymchenko, N.N.Steshenko, I.N.Mankovska. Energetic and antioxidant status of rat liver mitochondria during hypoxia–reoxygenation of different duration	35
Ye.P. Man'kovskaya, A.V. Maznychenko, N.O. Pil'kevych, V.O. Maisky, O.V. Vlasenko, O.V. Dovgan'. NADPH-diaphorase reactivity in the ventral horn of the feline spinal cord during acute muscle inflammation	46
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, A.S. Shalamay. Tissue blood flow in the digestive organs of rats with acute pancreatitis after corvitin administration	53
A.N. Goltsev, N.N. Babenko, Yu.A. Gaevskaya, O.V. Chelombitko, N.A. Bondarovich, T.G. Dubrava, M.V. Ostankov, V.K. Klochkov, N.S. Kavok, Yu.V. Malyukin. Functional activity of Ehrlich carcinoma cells after treatment with hybrid nanocomplexes containing orthovanadates of rare-earth elements, cholesterol and luminescent dye	60
A. Chernozub, Y. Radchenko. Determination of the optimal safe mode of physical activity for the military servants under conditions close to fighting	69
T. Dovbynychuk, L. Zakordonets, A. Putnikov, I. Vareniuk, O. Tiapko, N. Roslova, T. Sergiychuk, O. Lynchak, M. Dzerzhynsky, T. Beregova, G. Tolstanova. Net water transport via rat colon epithelium under the experimental dysbiosis	76
Z.A.Gorenko, O.A.Grinchenko, S.P.Veselsky, V.M.Baban. Composition of gastric juice and bile in rats at the experimental chronic pancreatitis	86
M.Y. Kyznietsova, T.I. Halenova, O.M. Savchuk, V.V. Vereschaka, L.I. Ostapchenko. Carbohydrate metabolism in type 1 diabetic rats under the conditions of the kidney bean pods aqueous extract application	96
R.D. Ostapiv, V.V. Manko. Mitochondria respiration and oxidative phosphorylation of rat tissues at taurine per oral injection	104
O. G. Zabuga, A. K. Koliada, V. M. Kukharsky, A. I. Bazhynova, A. M. Vaiserman. The effect of dietary restriction during development of <i>Drosophila melanogaster</i> on the activity of antioxidant system enzymes	114
G.V. Dumanska, O. V. Rikhalsky, N. S. Veselovsky. Effect of hypoxia on synaptic transmission between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in coculture	119
REVIEWS	
I.S. Chekman. Physiology and pharmacological properties of nanomaterials	129