

Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 3 2013

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

- Струтинський Р.Б., Нагібін В.С., Струтинська Н.А., Янчій О.Р., Мойбенко О.О.*
Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії–реоксигенації
ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів 3
- Малишева С.В., Будаш Г.В., Білько Н.М., Хешлер Ю.* Диференціювання
у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових
клітин миші 10
- Баскаков М.Б., Желудева А.С., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Алейник А.Н., Янчук
П.И., Медведев М.А., Орлов С.Н.* Ионные механизмы действия монооксида
углерода на сократительные свойства гладких мышц артериальных сосудов 18
- Москалюк А.О., Войтенко С.В., Федулова С.А., Веселовський М.С.* Особливості
динаміки кальцієвого сигналу, викликаного довготривалою високочастотною
стимуляцією культивованих нейронів гіпокампа 25
- Долга О.В., Погорела Н.Х., Богорад-Кобельська О.С., Жолобак Н.М.,
Заноза С.О., Ляхов С.А., Магура І.С.* Вплив похідних дифенілу
на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів селезінки миші 31
- Пузиренко А.М., Чекман І.С., Куфтирева Т.П., Горчакова Н.О.*
Вплив амлодипіну та біспрололу на ультраструктуру міокарда щурів
зі спонтанною артеріальною гіпертензією 39
- Харчук І.В., Андрухова О., Рибальченко В.К., Андрухов О.* Механізми
нефротоксичності нової протипухлинної сполуки – похідного малеїміду MI-1 50
- Колеснікова Є.Е., Носар В.І., Братусь Л.В.* Корекція експериментальної
мітохондріальної дисфункції нейронів стовбура мозку фармакологічними
препаратами ритмокор і мілдронат 58
- Янко Р.В.* Морфологічно-функціональні зміни щитоподібної залози молодих щурів
за умов нормобаричної гіпоксії 65

<i>Березнякова А.І., Жемела О.Д.</i> Здатність до деформації мембран еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії	72
<i>Гороховський Є.Ю., Єщенко Є.Ю., Бовт В.Д., Єщенко В.А.</i> Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату	78
<i>Коробейнікова Л.Г., Макарчук М.Ю.</i> Сприйняття та переробка зорової інформації і стресостійкість до психоемоційних навантажень у спортсменів різного віку	89
<i>Яценко А.Г., Вдовиченко О.М.</i> Особливості фазової структури серцевого циклу у дітей молодшого шкільного віку	97
<i>Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Боброва Н.О., Куценко Л.О., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.</i> Протизапальна дія фулерену C ₆₀ при ад'ювантному артриті у щурів	102
<i>Динник О.Б., Березовський В.Я., Кобиляк Н.М., Літовка І.Г., Янко Р.В., Плотнікова Л.М.</i> Вікові зміни жорсткості тканин печінки білих щурів за допомогою методу ультразвукової еластографії	111
<i>Ціпоренко С.Ю.</i> Вплив гепатомаксу на фертильність чоловіків	119
ОГЛЯДИ	
<i>Лісяний М.І.</i> Мезенхімальні стовбурові клітини та їх імунні властивості	126
ІСТОРІЯ НАУК	
<i>Рибальченко Т.В., Дзержинський М.Е., Опанасенко С.М., Рибальченко В.К.</i> Конденсаторна теорія збудження – провісниця мембранології (до 140-річчя Василя Юрійовича Чаговця)	135
РЕЦЕНЗІЯ	
на підручник «Фізіологія» для студентів вищих медичних закладів за редакцією члена-кореспондента НАПН України професора В.Г. Шевчука	142
ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ	
Віктор Григорович Шевчук (до 75-річчя з дня народження)	144
Анатолій Іванович Гоженко (до 65-річчя з дня народження)	145

Р.Б. Струтинський, В.С. Нагібін, Н.А. Струтинська, О.Р. Янчій, О.О. Мойбенко

Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії–реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів

У досліджах на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів вивчали вплив нового кардіопротектора флокаліну на виживання клітин при аноксії–реоксигенації, розвиток некрозу та апоптозу, а також внесок у вищезазначені процеси активації АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) та блокування високопорогових кальцієвих каналів. Флокалін додавали в середовище інкубації в дозі 5 та 20 мкмоль/л за 2 хв до початку аноксії (30 хв) та наступної реоксигенації (60 хв). Вони є близькими до напівмаксимального: перша – відкриття K_{ATP} -каналів, друга – блокування високопорогових кальцієвих каналів та потужної активації перших. Виявлено, що у дозі 5 мкмоль/л флокалін спричиняв зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень. Відкриття K_{ATP} -каналів пригнічувало некроз одвічі та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів. Флокалін пригнічував апоптоз неонатальних кардіоміоцитів настільки, що він був на 36 % меншим, ніж у контрольних експериментах. При додаванні в середовище інкубації дози 20 мкмоль/л ознак кардіопротекції не виявлено. Останнє може бути наслідком як досить сильної активації калієвих каналів, так і наслідком обох факторів – інгібування високопорогових кальцієвих каналів і, відповідно, суттєвого зменшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} та порушення метаболічних процесів ще до аноксії–реоксигенації. Таким чином, помірне відкриття K_{ATP} -каналів флокаліном значно зменшує некроз і повністю запобігає апоптозу, що були індуковані аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Ключові слова: аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, апоптоз, некроз, аноксія–реоксигенація, неонатальні кардіоміоцити, флокалін.

ВСТУП

Флокалін є новим вітчизняним оригінальним кардіопротектором і міотропним спазмолітиком, основною специфічною дією якого є відкриття K_{ATP} -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран клітини [7,24]. Відомо, що одним із механізмів кардіопротекції сполук такого типу є зменшення входу в цитоплазму клітини іонів кальцію через L-тип кальцієвих каналів, до інгібування яких призводить гіперполяризація плазматичної мембрани внаслідок відкриття K_{ATP} -каналів [15]. Однак нещодавно було встановлено, що при збільшенні дози флокаліну він може безпосередньо інгібувати високопорогові каль-

цієві та потенціалзалежні натрієві канали в культурі неонатальних кардіоміоцитів [23]. Зокрема, для напівмаксимального блокування цих каналів дози флокаліну становлять $IC_{50}=23,1$ та $IC_{50}=17,1$ мкмоль/л відповідно.

В експериментах *in vitro* на ізольованому та перфузованому за Лангендорфом серці морських свинок і шурів та *in vivo* на анестезованих собаках було показано потужні антишемічні ефекти флокаліну та зменшення розміру інфаркту міокарда на 40 % [5, 8]. Його кардіопротекторний вплив проявляється в широкому діапазоні застосованих доз від 0,1 при внутрішньовенному до 3,3 мг/кг при пероральному введенні відповідно. Було

© Р.Б. Струтинський, В.С. Нагібін, Н.А. Струтинська, О.Р.Янчій, О.О. Мойбенко

виявлено, що оптимальними дозами для виникнення антиішемічного ефекту є такі, що викликають помірне відкривання $K_{ATФ}$ -каналів [1, 5, 8].

Незважаючи на масштабне дослідження захисних механізмів дії флокаліну, досі залишається невивченим його вплив на розвиток різних типів клітинної загибелі при ішемії–реперфузії міокарда та інших тканин. Зокрема, внесок у вищезазначені процеси активації $K_{ATФ}$ -каналів та блокування високопорогових кальцієвих каналів.

Метою нашої роботи було дослідження впливу флокаліну на виживання клітин при аноксії–реоксигенації культури ізольованих неонатальних кардіоміоцитів, процеси некрозу та апоптозу.

МЕТОДИКА

Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували з міокарда шлуночків дводобових щурів за допомогою ферментного гідролізу [22]. Шлуночки щурів відокремлювали від перикарда та передсердь, механічно подрібнювали ножицями до отримання шматочків тканини розміром 1–2 мм³. Ці шматочки ферментативно розщеплювали у середовищі виділення яке попередньо оксигенували карбогеном, колагеназа II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл), розведені в буфері такого складу (ммоль/л): НЕРЕС – 20,0; КСL – 5,4; NaCL – 116,4; глюкоза – 5,5; Na₂НРО₄ – 0,4; K₂НРО₄ – 0,4 та перемішувалася. Перетравлення відбувалося у три цикли (по 10 хв кожний). Після кожного з циклів шматочкам міокарда давали осісти, надосадове середовище видаляли, а до міокарда додавали свіже середовище виділення. Після третього циклу кардіоміоцити відмивали центрифугуванням у буфері при 3000 g. Кількість живих і загиблих клітин визначали за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього. Принцип зазначеного методу полягає в тому, що останній не здатен проникати крізь непошкоджену мембрану клітин і відповідно

зафарбовує останні лише із зруйнованою мембраною, тобто загиблі.

Для культивування клітини розміщували на скельця, покриті 2%-м розчином желатину, зі щільністю 180000 на 1 см². Культивування проводили протягом однієї доби у живильному середовищі такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na₂CO₃ – 4,2 ммоль/л, НЕРЕС – 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл) при 37°C у газовому середовищі – 5% CO₂ та 95 % атмосферного повітря.

Аноксію моделювали аерацією клітин безкисневою газовою сумішшю (5 % CO₂ та 95 % Ar) упродовж 30 хв з наступною зміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв – реоксигенація.

Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) і йодидом пропідіуму в однаковій концентрації – 8,75 мкмоль/л. Перший з них проникає через непошкоджену мембрану клітини та забарвлює ядерний хроматин, що дає змогу відокремити живі та апоптотичні клітини. При цьому останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра. Йодид пропідіуму не проникає через непошкоджену плазматичну мембрану та забарвлює ядра клітин з пошкодженою плазмолемою, тобто некротичні.

Флокалін розчиняли в диметилацетаміді (5 мг : 0,1 мл) та додавали в середовище інкубації в дозі 5 та 20 мкмоль/л за 2 хв до початку аноксії. Як контроль на дію розчинника в окремій серії експериментів в середовище інкубації додавали диметилацетамід у дозах, що відповідали введеним разом з флокаліном. Після цього проводили звичайне цитологічне дослідження за допомогою барвників біс-бензимідину (Hoechst 33342) і йодиду пропідіуму.

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за

допомогою комп'ютерної програми Origin 7.0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При відтворенні експериментальної аноксії–реоксигенації в культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів відбуваються патологічні процеси, які спричиняють активацію некрозу та апоптозу. Відповідно до цього зменшується співвідношення живих клітин до некротичних та апоптотичних (таблиця, рисунок). Так, кількість живих кардіоміоцитів порівняно з контролем зменшувалася на $15,88 \pm 1,83$ % ($n=9$, $P < 0,05$), а некротичних та апоптотичних збільшувалась у 2,83 раза ($n=9$, $P < 0,05$) та на $55,56 \pm 4,85$ % ($n=9$, $P < 0,05$) відповідно.

Вивчаючи антиішемічні ефекти нового вітчизняного фторвмісного кардіопротектора флокаліну ми досліджували дію двох доз: 5 та 20 мкмоль/л, які є близькими до середньо-ефективних доз: перша – активації K_{ATP} -каналів та, друга – напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів і сильної активації K_{ATP} -каналів [23, 24].

Виявлено, що додавання в середовище інкубації флокаліну в меншій дозі призводило до зсуву співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень (див. таблицю) та був вищим на $19,0 \pm 1,82$ % ($n=9$, $P < 0,05$) щодо експериментів з відтворенням аноксії–реоксигенації

без введення флокаліну. Таким чином, використання дози флокаліну, що є середньо-ефективною для активації K_{ATP} -каналів та практично не має безпосереднього впливу на високопорогові кальцієві та потенціалзалежні натрієві канали неонатальних кардіоміоцитів [23, 24], запобігає збільшенню загальної смертності клітин під час аноксії–реоксигенації. Водночас спостерігається деяка зміна у механізмах загибелі клітин.

Додавання флокаліну в дозі 5 мкмоль/л за 2 хв до аноксії–реоксигенації зменшувало некроз та апоптоз у 2,06 та 2,43 раза ($n=9$, $P < 0,05$) відповідно. Проте, якщо при активуванні K_{ATP} -каналів створення аноксії–реоксигенації все ж таки посилювало процеси некрозу порівняно з контролем (у 1,37 раза), то апоптоз флокалін пригнічував настільки, що кількість апоптотичних кардіоміоцитів була на $36,07 \pm 4,02$ % ($n=9$, $P < 0,05$) нижчою, ніж у контрольних експериментах. Тобто він повністю запобігав розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів (див. рисунок).

Ці результати збігаються з ефектами іншого фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів – діазоФм в аналогічних експериментах [2, 9], який зменшував кількість некротичних та апоптотичних клітин на 44,8 % та у 2,61 раза відповідно. При цьому число живих клітин збільшувалося на 16 %. Слід зауважити, що активація K_{ATP} -каналів за допомогою діазоФм та діазоксиду перед ішемією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів, як і в нашому випадку з флокаліном, практично

Вплив активації K_{ATP} -каналів флокаліном на співвідношення (%) живих, некротичних та апоптотичних клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії–реоксигенації

Умови експерименту	Живі клітини	Некротичні клітини	Апоптотичні клітини
Контроль ($n=8$)	$88,04 \pm 0,96$	$5,75 \pm 0,81$	$6,21 \pm 0,48$
Аноксія–реоксигенація ($n=9$)	$74,06 \pm 1,97$ *	$16,27 \pm 1,43$ *	$9,66 \pm 1,35$ *
Аноксія–реоксигенація і введення флокаліну в дозі			
5 мкмоль/л ($n=9$)	$88,13 \pm 0,99$ **	$7,90 \pm 0,81$ **	$3,97 \pm 0,43$ ***
20 мкмоль/л ($n=5$)	$75,26 \pm 3,58$ *	$17,06 \pm 3,34$ *	$7,68 \pm 2,28$

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з аноксією–реоксигенацією.

повністю запобігала розвитку апоптозу, що був нею індукований [2,9].

Відомо, що механізмами, які призводять до пригнічення апоптотичних процесів при активації $K_{ATФ}$ -каналів є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій іонами кальцію та пригнічення утворення вільних радикалів, попередження відкриття мітохондріальної пори та інгібування звільнення цитохрому с, активація білка BCL₂ та інгібування білка Вах, що індукує апоптоз [3, 6, 9, 10, 18]. Цілком вірогідно, що у випадку з флокаліном можуть існувати ще і інші механізми, що пригнічують загибель клітин:

- зниження деградації пуринових нуклеотидів – АТФ, ГТФ і вмісту неорганічного фосфату (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 4, 11, 16, 19];

- підвищення конститутивного та пригнічення індукційного синтезу оксиду азоту (зменшення апоптозу та некрозу) [1, 3, 9, 14, 20, 21];

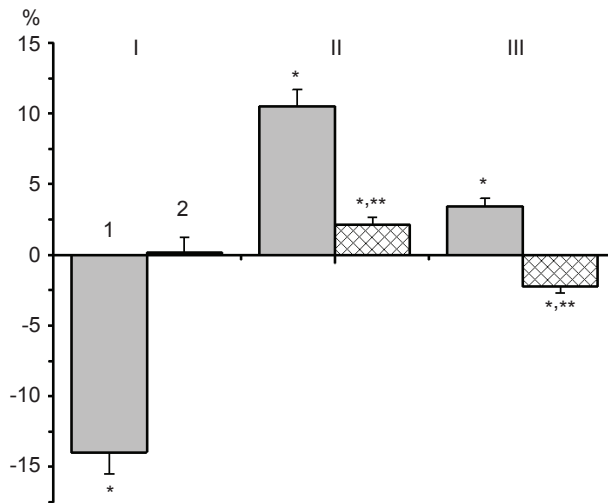
- обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 6, 9, 17];

- зменшення активності фосфоліпази А₂, запобігання руйнування клітинної мембрани та збереження структури внутрішньоклітинних органел (зменшення некрозу) [3, 7, 9, 25];

- зменшення активності ліпоксигенази (зменшення некрозу) та ксантинооксидази (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 9, 17];

- збільшення активності гемоксигенази та утворення СО, дія якого на апоптоз подібна до впливу оксиду азоту (зменшення апоптозу) [3, 9, 12, 13].

При використанні флокаліну у більшій дозі – 20 мкмоль/л, що призводить не лише до активації $K_{ATФ}$ -каналів, але і до напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів, захисту кардіоміоцитів від аноксії–реоксигенації не відбувалося (див. таблицю). Кількість живих клітин практично не відрізнялася від експериментів з аноксією–реоксигенацією без флокаліну та була зменшеною порівняно з контролем на $14,52 \pm 2,06$ % (n=5, P<0,05); при аноксії–реоксигенації без флокаліну – 15,88 %. Відсоток некротичних клітин порівняно з контролем зростав у 2,97 рази (n=5, P<0,05), що достовірно не відрізнялося від експериментів з аноксією без флокаліну. Водночас навіть без ознак кардіопротекції (за співвідношенням живих клітин), у разі дози флокаліну 20 мкмоль/л також спостерігається певна тенденція до зменшення апоптотичних процесів за аноксії–реоксигенації в культурі



Залежність змін кількості живих (I), некротичних (II) та апоптотичних (III) клітин у культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії–реоксигенації від дії флокаліну (5 мкмоль/л): 1 – аноксія–реоксигенація, 2 – введення флокаліну та наступна аноксія–реоксигенація. *P<0,05 порівняно з контролем; **P<0,05 порівняно з аноксією–реоксигенацією

неонатальних кардіоміоцитів. Незважаючи на те, що відсоток апоптотичних клітин порівняно з контролем зростав на $23,67 \pm 12,06$ %, проте він був менший, ніж в експериментах з аноксією–реоксигенацією без флокаліну на $20,50 \pm 3,97$ % ($n=5$, $P<0,05$). Виходячи зі співвідношення живі–некротичні–апоптотичні клітини, можна зробити висновок, що це відбувається внаслідок деякого збільшення живих і некротичних клітин (див. таблицю). Відсутність кардіопротекторних ефектів флокаліну в дозі 20 мкмоль/л підтверджує наші попередні висновки, отримані *in vitro* та *in vivo* про обережний підхід до дозування активаторів K_{ATP} -каналів при використанні в терапевтичних цілях. Останнє може бути наслідком як досить сильної активації калієвих каналів, та відповідно, пригнічення збудливості кардіоміоцитів і метаболічних процесів, так і відкривання перших та інгібування високопорогових кальцієвих каналів і, відповідно, суттєвого зменшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} та порушення метаболізму ще до аноксії–реоксигенації.

Розчинник флокаліну диметилацетамід у використаних в експериментах дозах не мав впливу на культуру неонатальних кардіоміоцитів.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що в дозі 5 мкмоль/л флокалін змінював співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин в бік перших, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень.

2. Активування K_{ATP} -каналів зменшувало процеси некрозу у два рази та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

3. У дозі 20 мкмоль/л, яка призводить не лише до активації K_{ATP} -каналів, але і до напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів, ознак кардіопротекції при аноксії–реоксигенації кардіоміоцитів не виявило.

**Р.Б. Струтинский, В.С. Нагибин,
Н.А. Струтинская, О.Р. Янчий, А.А. Мойбенко**

ВЛИЯНИЕ ФЛОКАЛИНА НА РАЗВИТИЕ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА ПРИ АНОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

В опытах на культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов исследовали влияние нового кардиопротектора флокалина на выживание клеток при аноксии–реоксигенации, развитие некроза и апоптоза, а также участие в вышеупомянутых процессах активации ATP -зависимых калієвих (K_{ATP}) и ингибирования высокопороговых кальциевых каналов. Флокалин вводили в среду инкубации в дозе 5 и 20 мкмоль/л за 2 мин до аноксии (30 мин) и следующей реоксигенации (60 мин). Эти дозы являются близкими к полумаксимальным: первая – активации K_{ATP} -каналов, вторая – полумаксимального блокирования высокопороговых кальциевых каналов и сильной активации первых. Показано, что в дозе 5 мкмоль/л он вызывает смещение соотношения живых, некротических и апоптотических клеток в сторону живых, процент которых практически не отличался от контрольных экспериментов без аноксии–реоксигенации. Активация K_{ATP} -каналов уменьшала процессы некроза в два раза и полностью предотвращала развитие апоптоза, индуцируемого аноксией–реоксигенацией неонатальных кардиомиоцитов. Флокалин подавлял апоптоз неонатальных кардиомиоцитов настолько, что он был на 36 % меньше, чем в контроле. При добавлении в среду инкубации флокалина в дозе 20 мкмоль/л эффекта кардиопротекции не обнаружено. Последнее может быть следствием как достаточно сильной активации калієвих, так и следствием обоих факторов – активации калієвих и ингибирования высокопороговых кальциевых каналов. И, соответственно, существенного уменьшения содержания внутриклеточного Ca^{2+} и нарушения метаболіческих процессов еще до моделирования аноксии–реоксигенации. Таким образом, умеренная активация K_{ATP} -каналов флокалином значительно уменьшает процессы некроза и полностью предотвращает апоптоз у неонатальных кардиомиоцитов, индуцируемых аноксией–реоксигенацией. Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, апоптоз, некроз, аноксия–реоксигенация, неонатальные кардиомиоциты, флокалин

**R.B. Strutyński, V.S. Nagibin, N.A. Strutyńska,
O.R. Ianchii, A.A. Moibenko**

INFLUENCE OF FLOCALIN ON DEVELOPMENT OF APOPTOSIS AND NECROSIS AT ANOXIA-REOXYGENATION OF CULTURE RATS NEONATAL CARDIOMYOCYTES

The influence of the new cardioprotector flocalin was investigated on the culture of rat's neonatal cardiomyocytes

during anoxia-reoxygenation modelling. The mechanisms of apoptosis and necrosis were investigated under influence of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels activation and in conditions of blocking of the L-type calcium (VGCCs) channels. Flocalin was added in the culture medium in the dose 5 and 20 μM at 2 minutes before anoxia (30 minutes) and following reoxygenation (60 minutes). These doses are near to: the first dose means the opening of K_{ATP} channels and the second one means the IC_{50} block of VGCCs. It is discovered that in dose 5 μM of flocalin drew the change of correlation of living, necrotizing and apoptizing cells drew side-shifting living. The number of live cells was almost the same like in control (experiments without anoxia-reoxygenation modelling). The opening of K_{ATP} channels decreases necrosis in two times and fully prevented development of apoptosis which was induced anoxia-reoxygenation modelling. Flocalin depressed the apoptosis of neonatal cardiomyocytes so that he was on to 36% less than in control group (without anoxia-reoxygenation). But in the high dose (20 μM) that provokes not only K_{ATP} channels opening but also IC_{50} block of VGCCs cardioprotection was not detected after modelling of anoxia-reoxygenation. The last can be investigation both enough strong activating of the potassium channels and by investigation of both factors are opening of potassium and inhibition of VGCCs channels and, accordingly, substantial diminishing of level of intracellular Ca^{2+} and violation of metabolic processes yet to anoxia-reoxygenation. Thus, small doses of flocalin, that induce moderate opening of K_{ATP} channels significantly decrease the number of necrotic and apoptotic cells in culture of rat neonatal cardiomyocytes induced by anoxia-reoxygenation.

Key words: ATP-sensitive potassium channels, apoptosis, necrosis, anoxia-reoxygenation, rat neonatal cardiomyocytes, flocalin.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламає А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін - нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. – 2009. – 5, №1. – С.80–84.
2. Нагібін В.С., Досенко В.Є., Пивовар С.М., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Фторований аналог діазоксиду попереджає апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №3. – С.3–8.
3. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нешерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Там само. – 2012. – 58, №1. – С.13–26.
4. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нешерет О.П., Шиш А.М., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти активації аденозинтрифосфатзалеж-

них калієвих каналів в експериментах *in vivo*: вплив на біохімічні параметри крові за умов ішемії-реперфузії міокарда // Там само. – 2009. – 55, №6. – С.12–19.

5. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Чебанов В. А., Горобець М. Ю. Моделювання промислового процесу виробництва препарату “Флокалін” та визначення його оптимально-ефективної дози для лікування захворювань серця // Наука та інновації. – 2013. – 9, №1. – С.55–63.
6. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісн. фармакології та фармацевції. – 2010. – №3. – С.44–56.
7. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
8. Струтинський Р.Б., Французова С.Б., Ровенець Р.А., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Патологія. – 2008. – 5, №3. – С.22.
9. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // Под редакцией Мойбенко А.А. – К.: Наук. думка, 2008. – 518 с.
10. Alizadeh A.M., Faghihi M., Khori V., Sohanaki H., Pourkhalili K., Mohammadghasemi F., Mohsenikia M. Oxytocin protects cardiomyocytes from apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat heart: role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel and permeability transition pore // Peptides. – 2012. – 36, №1. – P.71–77.
11. Bourguin A., Beck L., Khoshniat S., Wauquier F., Oliver L., Hue E., Alliot-Licht B., Weiss P., Guicheux J., Wittrant Y. Inorganic phosphate stimulates apoptosis in murine MO6-G3 odontoblast-like cells // Arch Oral Biol. – 2011. – 56, №10. – P.977–983.
12. Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E., Seldon M.P., Bach F.H., Soares M.P. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis // J. Biol. Chem. – 2002. – 277, № 20. – P.17950–17961.
13. Coito A.J., Buelow R., Shen X.D., Amersi F., Moore C., Volk H.D., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury // Transplantation. – 2002. – 74, №1. – P.96–102.
14. Das A., Xi L., Kukreja R.C. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling // J. Biol. Chem. – 2005. – 280, №13. – P.12944–12955.
15. Flagg T.P., Nichols C.G. Sarcolemmal K_{ATP} channels: what do we really know? // J. Mol. and Cell Cardiol. – 2005. – 39. – P.61–70.
16. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial

- permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // *Cardiovascular Res.* – 2004. – **61**, №3. – P.372–385.
17. Li P.F., Dietz R., von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells // *Circulation.* – 1997. – **96**, №10. – P.3602–3609.
 18. Liu D., Lu C., Wan R., Auyeung W.W., Mattson M.P. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2002. – **22**, № 4. – P.431–443.
 19. Mansfield K., Pucci B., Adams C.S., Shapiro I.M. Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent // *Calcif Tissue Int.* – 2003. – **73**, №2. – P.161–172.
 20. Patten R.D., Denofrio D., El-Zaru M., Kakkar R., Saunders J., Celestin F., Warner K., Rastegar H., Khabbaz K.R., Udelson J.E., Konstam M.A., Karas R.H. Ventricular assist device therapy normalizes inducible nitric oxide synthase expression and reduces cardiomyocyte apoptosis in the failing human heart // *J. Amer Coll Cardiol.* – 2005. – **45**, № 9. – P.1419–1424.
 21. Ramasamy R., Hwang Y.C., Liu Y., Son N.H., Ma N., Parkinson J., Sciacca R., Albala A., Edwards N., Szabolcs M.J., Cannon P.J. Metabolic and functional protection by selective inhibition of nitric oxide synthase 2 during ischemia-reperfusion in isolated perfused hearts // *Circulation.* – 2004. – **109**, № 13. – P.1668–1673.
 22. Reinecke H., Zhang M., Bartosek., Charles E.M. Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation.* – 1999. – **100**, №2. – P.193–202.
 23. Voitychuk O.I., Strutynskyi R.B., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels // *NSAP.* – 2012. – **385**, №11. – P.1095–1102.
 24. Voitychuk O.I., Strutynskyi R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // *Brit. J. Pharmacol.* – 2011. – **162**, №3. – P.701–711.
 25. Yagami T., Yamamoto Y., Kohma H., Nakamura T., Takasu N., Okamura N. L-type voltage-dependent calcium channel is involved in the snake venom group IA secretory phospholipase A2-induced neuronal apoptosis // *Neurotoxicology.* – 2013. – **35**. – P.146–153.

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

Матеріал надійшов до редакції 18.03.2013

С.В. Малишева, Г.В. Будащ, Н.М. Білько, Ю. Хешлер

Диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші

Оцінювали ефективність диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші. Останні отримані у попередніх дослідженнях внаслідок репрограмування мишиних ембріональних фібробластів системою плазмід Sleeping beauty, заснованою на транспозонах. Диференціювання здійснювали у суспензійній культурі та при прикріпленні ембріодних тілець до культуральних планшет. Як індуктор використовували аскорбінову кислоту. Згідно з отриманими результатами, диференціювання при прикріпленні ембріодних тілець відбувається на порядок ефективніше. Аскорбінова кислота стимулює отримання кардіоміоцитів.

Ключові слова: індукованні плюрипотентні стовбурові клітини, ефективність диференціювання, кардіоміоцити.

ВСТУП

Серцево-судинні захворювання посідають провідне місце за смертністю серед населення [20]. Для їх корекції інтенсивно розробляються методи клітинної терапії [11]. Джерелом матеріалу для такої терапії можуть бути отримані із біопсії серця клітини. Однак доступ до такого клітинного матеріалу обмежений. Тому активно розвиваються альтернативні методи одержання кардіоміоцитів – від новонароджених близькоспоріднених видів тварин чи створення генетично-модифікованих клітин, що надекспресують бажані протеїни [16]. Усі ці методи мають недоліки та обмеження, що заключаються у фізіологічних відмінностях кардіоміоцитів людини, ресурсній затратності та етичних міркуваннях.

Потенційним джерелом отримання кардіоміоцитів можуть бути: фетальні кардіоміоцити, зрілі клітини-попередники, скелетні міобласти, стовбурові клітини кісткового мозку, жирової тканини, кордової крові та плюрипотентні стовбурові клітини (ПСК) [7].

Потенціал до диференціювання у кардіоміоцити мультипотентних фетальних і зрілих стовбурових клітин суттєво обмежується їх пластичністю [4, 18]. Єдиними клітинами дорослого організму, що мають потенціал до диференціювання у кардіоміоцити, є кардіоміоцитарні клітини-попередники [5], однак їх ресурс є вкрай обмеженим.

Нині показано, що лише ПСК можуть диференціюватися у клітини серця, що спонтанно скорочуються [10, 23]. ПСК мають практично необмежану здатність до самооновлення *in vitro* та потенціал для формування трьох зародкових шарів, утворюючи таким чином усі клітинні типи організму [3]. Показано, що нещодавно відкриті індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) можуть диференціюватися у кардіоміоцити [21], що не поступаються за ключовими характеристиками кардіоміоцитам, отриманим із ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) [8, 25]. Розроблено різноманітні методики одержання кардіоміоцитів із плюрипотентних клітин [13]: спонтанне диференціювання ембріодних тілець (ЕТ) у суспензійній культурі

та при їх прикріпленні, кокультивування з ентодермальними клітинами миші (END-2 cells) чи через напрямлене диференціювання за допомогою визначених факторів як у суспензії, так і у моношарі [19]. Отримані *in vitro* диференційовані кардіоміоцити використовують для дослідження кардіогенезу, тестування терапевтичних засобів та у токсикологічних дослідженнях.

При диференціюванні плюрипотентних клітин у кардіоміоцити важливим аспектом є пошук хімічних сполук, що сприяють одержанню бажаного типу клітин та можуть бути застосовані для активації ендogenous кардіоспецифічних стовбурових клітин. Зокрема показано, що аскорбінова кислота сприяє диференціюванню ПСК у кардіоміоцити [6], активно розробляються протоколи із залученням регуляторів таких ключових сигнальних шляхів, як Wnt-шлях [24].

Перші іПСК репрограмовано за допомогою вірусних векторів, проте їх клінічне застосування пов'язане з певним ризиком. Серед існуючих альтернативних способів отримання іПСК [17] найбільш перспективними є репрограмуючі системи на основі транспозонів, зокрема *Sleeping beauty* [15]. Оскільки генеровані із використанням різних векторів лінії іПСК можуть відрізнятися за спектром експресії генів, диференційним потенціалом тощо [14], дослідження функціональних характеристик перспективних для клінічного застосування ПСК та їх похідних надзвичайно актуальні.

У попередній роботі ми отримали при репрограмуванні ембріональних фібробластів миші за допомогою системи плазмід *Sleeping beauty* різні клони потенційної лінії іПСК. При спонтанному диференціюванні виявлено гетерогенність серед клонів за експресією кардіоспецифічного гена α МНС [1]. Тому метою цієї роботи було дослідити потенціал до направленої диференціювання у кардіоміоцити різних клонів потенційної лінії іПСК при індукції аскорбіновою кислотою.

МЕТОДИКА

Використані клітинні лінії та клони. α PIG44 – генетично модифікована лінія ЕСК миші, що експресує пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під кардіоспецифічним α -МНС промотором, створена Е. Kolosov (Інститут Нейрофізіології, Кельнський університет, Німеччина) для вивчення диференціювання у кардіоміоцити ПСК миші.

Окремі клони потенційних іПСК миші одержано внаслідок індивідуального відбору активно проліферуючих ЕСК-подібних колоній. іПСК отримували репрограмуванням мишиних ембріональних фібробластів (МЕФ) системою плазмід *Sleeping beauty*, люб'язну надано її розробниками – Zoltan Ivics та Szuzanna Izsvac (Макс-Дельбрук центр молекулярної медицини, Берлін, Німеччина). Вона складається із пари плазмід: на першій закодовано транспозазу SB100x, що забезпечує стабільну інтеграцію репрограмуючих генів у геном; друга містить репрограмуючу касету із генами Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc або Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc та Lin28. Для репрограмування використовували МЕФ тварин лінії c57Bl6N 13,5-ї доби гестації. Трансфекцію здійснювали за допомогою системи для трансфекції «Neon» («Invitrogen», США). На 2-гу добу після трансфекції клітини поміщали в умови культивування ПСК. Досліджували ефективність диференціювання отриманих нами клонів 6, 7 та 9 [1], лінія α PIG44 була контролем.

ПСК миші культивували у середовищі DMEM із додаваннями 20%-ї фетальної телячої сироватки, 0,1 ммоль/л NEAA, 50 мкмоль/л β -меркаптоетанолу («Invitrogen», США), LIF 1000 од/мл на фідерному шарі мітотично інактивованих МЕФ. Перед диференціюванням іПСК дисоціювали за допомогою 0,05%-го трипсину та поміщали у середовище IMDM із 20%-ю фетальною телячою сироваткою 0,1 ммоль/л NEAA по $1 \cdot 10^6$ клітин у суспензійну культуру на орбітальний шейкер. На 2-гу добу культивування підраховували кількість утворених ЕТ та розсаджували

їх по 2000 од. у 100 мм неадгезивні чашки Петрі для подальшого культивування (середовище IMDM із 20%-ю фетальною телячою сироваткою, 0,1 ммоль/л NEAA, 50 мкмоль/л β -меркаптоетанолу («Invitrogen», США). Для диференціювання у адгезивній культурі ЕТ розсаджували на 6-лункові культуральні планшети по 60 од. Склад культурального середовища однаковий для суспензійної та адгезивної культури. Для покращення диференціювання у кардіоміоцити досліджено різні варіанти: 1) аскорбінова кислота, 100 мкмоль/л («Waco», Німеччина); 2) контрольний варіант – без додавання жодних малих молекул. Аскорбінову кислоту застосовували від початку до 9-ї доби диференціювання.

Починаючи з 8-ї доби культивування,

досліджували інтактні та прикріплені ЕТ на наявність скорочень. Ефективність диференціювання визначали за співвідношенням кількості структур, що спонтанно скорочувались, до загальної кількості ЕТ.

Результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами за допомогою пакетів стандартних прикладних програм Microsoft Office Excel для персонального комп'ютера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Окремі клони репрограмованих за допомогою системи Sleeping beauty МЕФ та контрольна лінія ЕСК миші α PIG44 у недиференційованому стані мали однакову типову морфологію ПСК (рис. 1).

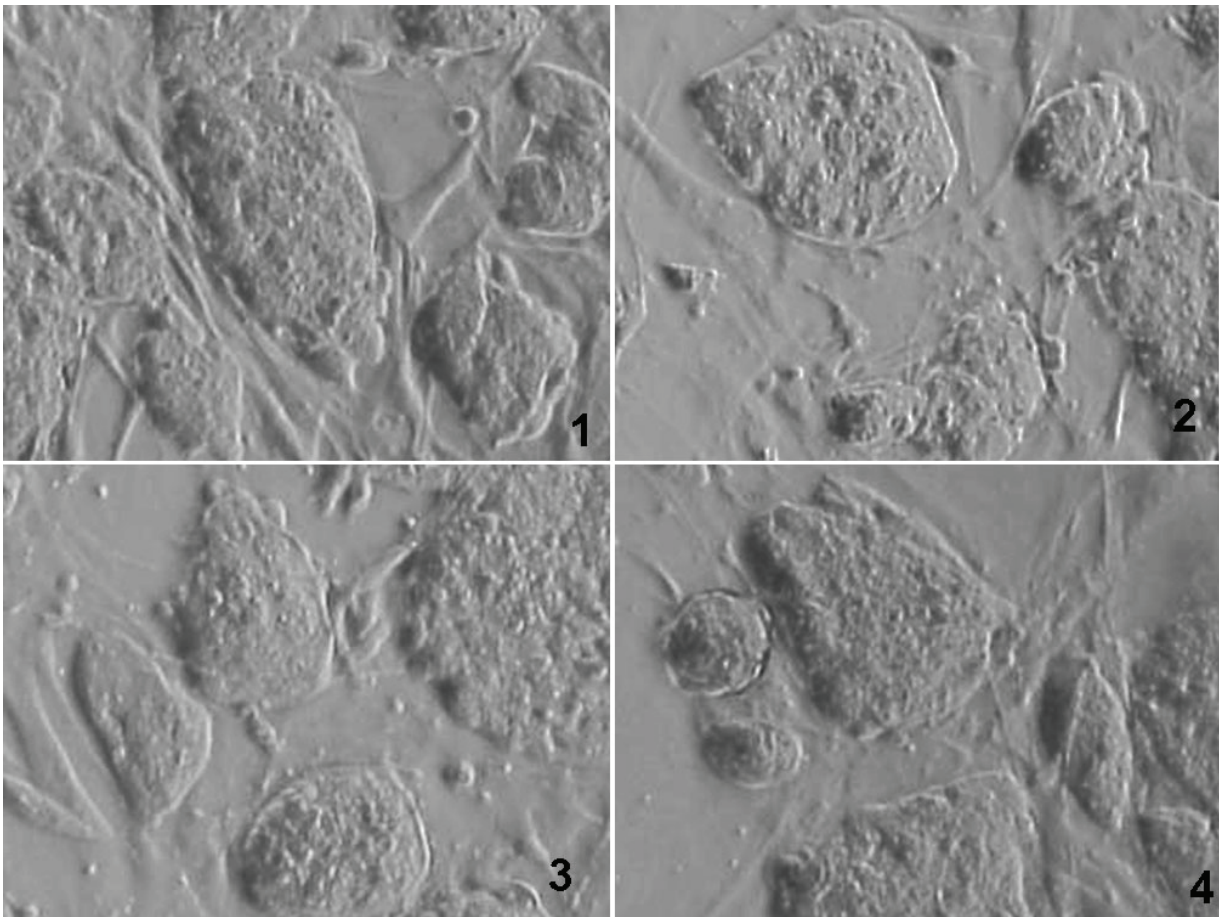


Рис. 1. Морфологія досліджуваних плюрипотентних стовбурових клітин перед початком диференціювання: 1 – клон 6, 2 – клон 7, 3 – клон 9, 4 – α PIG44 (x 10)

Дисоційовані за допомогою трипсину клітини досліджуваних клонів і клітиної лінії α PIG44 без фактора, що підтримує їх у недиференційованому стані (LIF) у суспензійній культурі при постійному перемішуванні на орбітальному шейкері формували ЕТ правильної сферичної форми. Отримані за допомогою системи Sleeping beauty репрограмовані клони МЕФ формували ЕТ, такі самі за розміром і кількістю, як ЕТ, що сформовані контрольною клітинною лінією (рис. 2).

Таким чином, за морфологічними показниками досліджувані клони не відрізнялися від контрольної клітинної лінії ЕСК як у недиференційованому стані, так і при диференціюванні.

Оскільки при спонтанному диференціюванні отриманих клонів у попередніх працях

[1] спостерігали гетерогенність в експресії кардіоспецифічного маркера α МНС, ми вирішили окремо дослідити потенціал до направленого диференціювання у кардіоміоцити клонів репрограмованих ембріональних фібробластів. Для стимулювання диференціювання використовували аскорбінову кислоту [22]. Ефективність диференціювання у кардіоміоцити оцінювали за відношенням кількості ЕТ, що скорочуються, до загальної кількості ЕТ [2]. Результати дослідження ефективності диференціювання ПСК миші у суспензійній культурі зображено на рис. 3.

При диференціюванні у суспензійній культурі в усіх досліджуваних клонах і контрольній клітинній лінії ЕСК α PIG44 спонтанне скорочення ЕТ виявляли, починаючи з 9-ї доби.

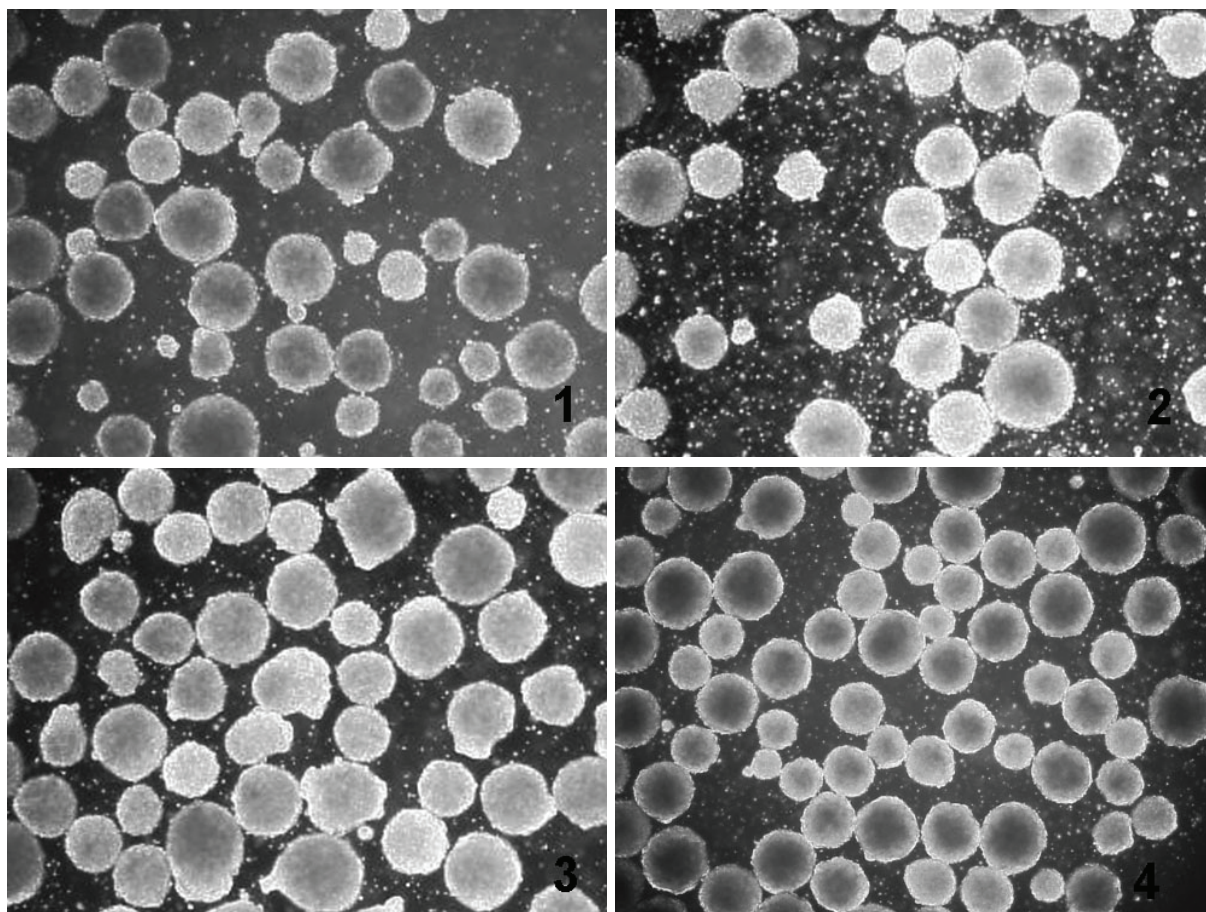


Рис. 2. Ембріодні тільця, що утворилися внаслідок диференціювання у суспензійній культурі різними клонами та клітинною лінією: 1 – клон 9; 2 – клон 7; 3 – клон 6; 4 – α PIG44 (x 2,5)

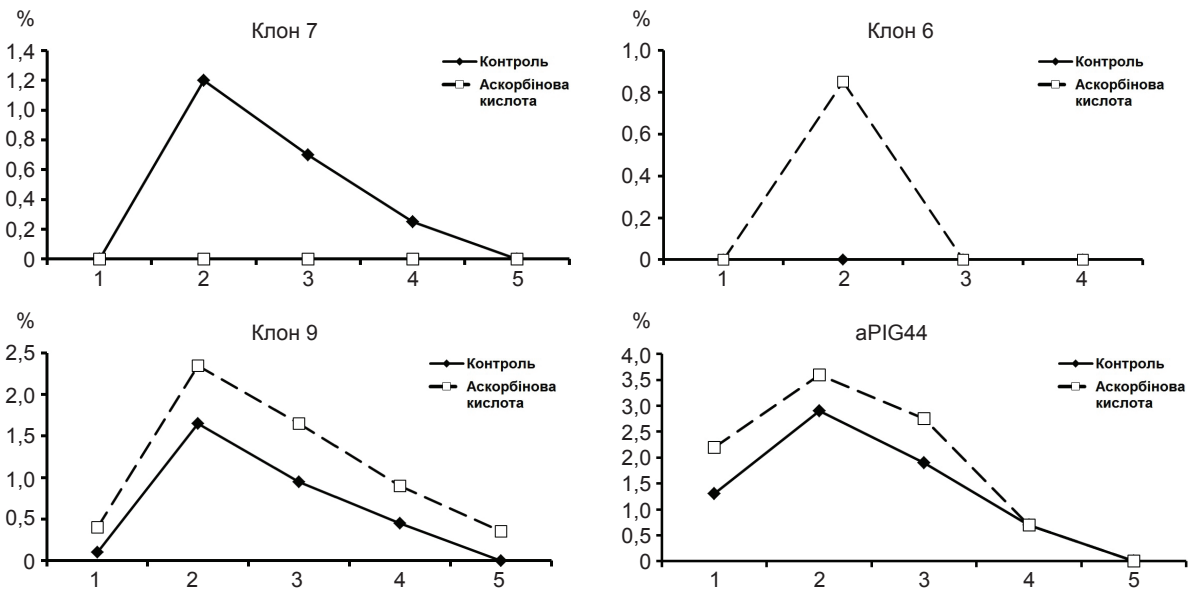


Рис. 3. Ефективність диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші у кардіоміоцити в суспензійній культурі: 1 – 9-та доба; 2 – 11-та доба; 3 – 13-та доба; 4 – 15-та доба; 5 – 17-та доба диференціювання

ЕТ, що скорочуються, спостерігали ще понад тиждень, до 17-ї доби диференціювання у клоні 7, 9 та лінії α PIG44. Найбільша кількість ЕТ, що скорочуються, була на 11-ту добу. Максимальну ефективність диференціювання в суспензійній культурі спостерігали у лінії α PIG44 при стимуляції аскорбіновою кислотою – близько 3,5 %. Серед досліджуваних клонів найвищий потенціал до диференціювання у кардіоміоцити спостерігали у клона 9 також із застосуванням аскорбінової кислоти, однак цей показник становив лише 2,5 % і був на 1 % нижчий у порівнянні із контрольною клітинною лінією. Найслабша здатність до диференціювання була у клона 6: не виявлено жодного ЕТ, що скорочується у контрольному варіанті, а при стимулюванні за допомогою аскорбінової кислоти ефективність диференціювання не сягала навіть 1 %.

Згідно з отриманими результатами, загальна ефективність диференціювання є достатньо низькою, що збігається з даними літератури [9]. Краще воно відбувається при застосуванні аскорбінової кислоти. Однак відповідь на стимулятор цього процесу та його результативність є неоднорідною в окремих досліджуваних клонах.

Часто при виборі методу отримання кардіоміоцитів виходять із особливостей вихідних клітинних ліній, що визначають ефективність диференціювання [12]. З огляду на отримані низькі значення показників у суспензійній культурі, досліджено здатність до диференціювання отриманих клонів при прикріпленні ЕТ (рис. 4).

За цим протоколом скорочення ЕТ помічали починаючи із 11-ї доби культивування, що на 3 доби пізніше, ніж у суспензійній культурі. Найбільшу кількість ЕТ, що скорочувалися, виявлено на 13-ту добу у контрольній клітинній лінії та на 15-ту добу в отриманих клонах. Максимальна ефективність диференціювання становила 12, 18, 25 та 30 % для клонів 6, 7, 9 та контрольної клітинної лінії відповідно. Спонтанне скорочення ЕТ спостерігали протягом 11 діб від початку його реєстрації. Аскорбінова кислота є індуктором диференціювання досліджуваних клонів при прикріпленні ЕТ, підвищує частоту спонтанних скорочень і пролонгує її.

Загалом, ефективність диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів досліджуваних нами ПСК миші та контрольної клітинної

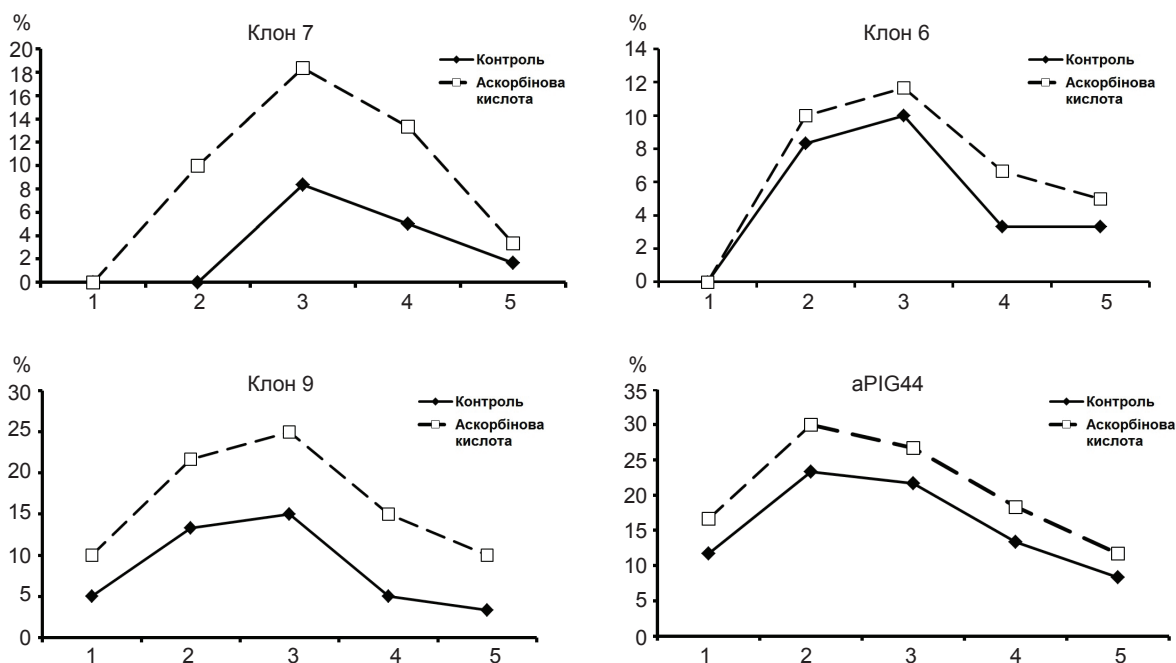


Рис. 4. Ефективність диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші у кардіоміоцити при прикріпленні ембріодних тілець: 1 – 11-та; 2 – 13-та; 3 – 15-та; 4 – 17-та; 5 – 22-га доба

лінії на порядок вища при прикріпленні ЕТ, ніж у суспензійній культурі. Це може бути пов'язане із цілісністю ЕТ, що не пошкоджуються на орбітальному шейкері, більш природними умовами формування кардіоміоцитів, а також лінієспецифічними особливостями отриманих клонів. Також підрахунок ЕТ і частоти їх скорочень у статичній культурі є більш точним і відтворювальним.

Таким чином, отримані внаслідок репрограмування ембріональних фібробластів за допомогою системи *Sleeping beauty* транспозоніндуковані ПСК миші здатні до диференціювання у кардіоміоцити в культурі *in vitro*. При прикріпленні ембріодних тілець ефективність диференціювання на порядок вища, ніж у суспензійній культурі. Однак пік спонтанного скорочення у суспензійній культурі спостерігали на 2 доби раніше. Також виявлено гетерогенність в ефективності диференціювання та відповіді на стимулятор серед окремих клонів ПСК миші, однак це явище потребує подальшого дослідження.

Автори статті висловлюють особливу подяку доктору Томо Сарічу за наукове керівництво у виконанні експериментальної роботи в Інституті Нейрофізіології Кельнського університету (Німеччина).

С.В. Малишева, Г.В. Будащ, Н.М. Білько, Ю. Хешлер

ДИФФЕРЕНЦІРОВАНИЕ В КАРДИОМИОЦИТЫ ОТДЕЛЬНЫХ КЛОНОВ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Оценивали эффективность дифференцирования в кардиомиоциты отдельных клонов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши. Последние получены в предыдущей работе вследствие репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши с помощью системы плазмид *Sleeping beauty*, основанной на транспозонах. Дифференцирование осуществляли в суспензионной культуре и при прикреплении эмбриодных телец к культуральным планшетам. В качестве индуктора использовали аскорбиновую кислоту. Согласно полученным данным, дифференцирование при прикреплении эмбриодных телец на порядок эффективнее. Аскорбиновая кислота осуществляют стимулирующее действие на получение кардиомиоцитов. Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эффективность дифференцирования, кардиомиоциты.

S.V. Malysheva, G.V. Budash, N.M. Bilko,
J. Hescheller

CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION OF INDIVIDUAL CLONES MURINE INDUCTED PLURIPOTENT STEM CELLS

Cardiomyocyte differentiation of certain clones of murine induced pluripotent stem cells (iPS) was estimated. iPS were obtained due to reprogramming of murine embryonic fibroblasts with transposon-based *Sleeping beauty* plasmids as gene delivery systems. Differentiation was performed in suspension culture and in attached to tissue-culture plates embryoid bodies (EBs). Ascorbic acid was applied as inductor. According to the obtained results, the differentiation was tenfold more effective in attached EBs. Ascorbic acid stimulated the generation of cardiomyocytes.

Key words: induced pluripotent stem cells, efficiency of differentiation, cardiomyocytes.

Institute of Neurophysiology, University of Cologne (Germany);

National University of Kyiv-Mohyla academy (Ukraine)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Малишева С.В., Білько Н.М., Білько Д.І., Сарич Т. Диференційний потенціал отриманих за допомогою системи транспозонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші // Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. – 2012. – 4, № 112. – С. 37–46.
2. Ada A., Williams C.H., Hao J., Hong C.C. Modified mouse embryonic stem cell based assay for quantifying cardiogenic induction efficiency // *J. Vis. Exp.* – 2011. – 50. – e2656.
3. Ameen C., R. Strehl, Bjorquist P., Lindahl A., Hyllner J., Sartipy P. Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial applications // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2008. – 65, № 1. – P. 54–80.
4. Anversa P., Leri A., Rota M., Hosoda T., Bearzi C., Urbanek K., Kajstura J., Bolli R. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts // *Stem Cells.* – 2007. – 25, № 3. – P. 589–601.
5. Blin G., Nury D., Stefanovic S., Neri T., Guillevic O., Brinon B., Bellamy V., Rücker-Martin C., Barbry P., Bel A., Bruneval P., Cowan C., Pouly J., Mitalipov S., Gouadon E., Binder P., Hagège A., Desnos M., Renaud J.F., Menasché P., Pucéat M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates // *J. Clin. Invest.* – 2010. – 120, № 4. – P. 1125–1139.
6. Cao N., Liu Z., Chen Z., Wang J., Chen T., Zhao X., Ma Y., Qin L., Kang J., Wei B., Wang L., Jin Y., Yang H.T. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells // *Cell Res.* – 2012. – 22, № 1. – P. 219–236.

7. Dimmeler S., Burchfield J., Zeiher A.M. Cell-based therapy of myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – 28, № 2. – P. 208–216.
8. Fuegemann C.J., Samraj A.K., Walsh S., Fleischmann B.K., Jovine S., Breitbach M. Differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes via the hanging-drop and mass culture methods // *Curr. Protoc. Stem. Cell. Biol.* – 2010. – 1, № 1F.11.
9. Hao J., Sawyer D.B., Hatzopoulos A.K., Hong C.C. Recent progress on chemical biology of pluripotent stem cell self-renewal, reprogramming and cardiomyogenesis // *Rec. Pat. Regen. Med.* – 2011. – 1, № 3. – P. 263–274.
10. He J. Q., Ma Y., Lee Y., Thomson J. A., Kamp T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization // *Circ. Res.* – 2003. – 93, № 1. – P. 32–39.
11. Huu A.L., Prakash S., Shum-Tim D. Cellular cardiomyoplasty: current state of the field // *Regen. Med.* – 2012. – 7, № 4. – P. 571–582.
12. Kaichi S., Hasegawa K., Takaya T., Yokoo N., Mima T., Kawamura T., Morimoto T., Ono K., Baba S., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T. Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – 88, № 2. – P. 314–323.
13. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine // *Genes Dev.* – 2005. – 19, № 10. – P. 1129–1155.
14. Kuijk E.W., Chuva de Sousa Lopes S.M., Geijsen N., Macklon N., Roelen B.A. The different shades of mammalian pluripotent stem cells // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – 17, № 2. – P. 254–271.
15. Malysheva S., Saric T., Hescheler J., Budash G., Bilko D., Bilko N. Expression of SSEA-1 in different clones of reprogrammed murine embryonic fibroblasts // *Наук. записки НАУКМА: Біологія та екологія.* – 2011. – № 119. – С. 21–25.
16. Meyer T., Sartipy P., F. Blind, Leisgen C., Guenther E. New cell models and assays in cardiac safety profiling // *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* – 2007. – 3, № 4. – P. 507–517.
17. Mochiduki Y., Okita K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications // *Biotechnol. J.* – 2012. – 7, № 6. – P. 789–797.
18. Murry C.E., Field L.J., Menasch P. Cell-based cardiac repair reflections at the 10-year point // *Circulation.* – 2005. – 112, № 20. – P. 3174–3183.
19. Ni T.T., Rellinger E.J., Mukherjee A., Xie S., Stephens L., Thorne C.A., Kim K., Hu J., Lee E., Marnett L., Hatzopoulos A.K., Zhong T.P. Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling // *Chem. Biol.* – 2011. – 18, № 12. – P. 1658–1668.
20. Schwappach D.L.B., Boluarte T.A., Suhcke M. The economics of primary prevention of cardiovascular diseases – a systematic review of economic evaluations // *Cost. Eff. Resour. Alloc.* – 2007. – 5. – P. 1–12.

21. So K.H., Han Y.J., Park H.Y., Kim J.G., Sung D.J., Bae Y.M., Yang B.C., Park S.B., Chang S.K., Kim E.Y., Park S.P. Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – **153**, № 3. – P. 277–285.
22. Takahashi T., Lord B., Schulze P.C., Fryer R.M., Sarang S.S., Gullans S.R., Lee R.T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes // *Circulation.* – 2003. – **107**, № 14. – P. 1912–1916.
23. Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells // *Circ. Res.* – 2002. – **91**, № 6. – P. 501–508.
24. Zhang Q., Major M.B., Takanashi S., Camp N.D., Nishiya N., Peters E.C., Ginsberg M.H., Jian X., Randazzo P.A., Schultz P.G., Moon R.T., Ding S. Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**, № 18. – P. 7444–7448.
25. Zwi-Dantsis L., Gepstein L. Induced pluripotent stem cells for cardiac repair // *Cell Mol. Life Sci.* – 2012. – **69**, № 19. – P. 3285–3299.

*Ин-т Нейрофізіології Кельн. ун-ту (Німеччина);
Нац. ун-т «Києво-Могилянська академія» (Україна)
E-mail: smalysheva@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 17.12.2012*

М.Б. Баскаков, А.С. Желудева, С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, А.Н. Алейник,
П.И. Янчук, М.А. Медведев, С.Н. Орлов

Ионные механизмы действия монооксида углерода на сократительные свойства гладких мышц артериальных сосудов

Монооксид углерода (СО) является одним из представителей семейства газотрансмиттеров. В статье представлены результаты механографических исследований механизмов действия СО на сегменты грудного отдела аорты крысы. Установлено, что релаксирующее сосудистые гладкие мышцы действие донора СО CORM-2 опосредовано преимущественно открыванием потенциалзависимых калиевых каналов мембраны гладкомышечных клеток (ГМК): их блокирование 4-аминопиридином практически полностью устраняло СО-индуцированную релаксацию сосудистых сегментов, предсокращенных деполяризацией мембраны ГМК в гиперкалиевом (30 ммоль/л KCl) растворе Кребса или 10 мкмоль/л фенилэфрина. Впервые показано, что CORM-2 уменьшает никардипинчувствительный вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в изолированные ГМК аорты. Имеются основания полагать, что потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа мембраны сосудистых ГМК являются еще одной мишенью действия СО, через которую реализуется расслабляющее действие данного газотрансмиттера. Дополнительные исследования необходимы для определения вклада влияния комплексов рутения (Ru(II)) на феноменологию эффектов монооксида углерода.

Ключевые слова: монооксид углерода, гладкие мышцы сосудов, калиевые каналы, кальциевые каналы L-типа.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые феномен вазорелаксации, обусловленной монооксидом углерода (СО), был описан в 1984 г. McGrath и Smith [1], которые обнаружили расслабление коронарных сосудов крысы в ответ на действие экзогенного СО. В настоящее время расслабляющее влияние монооксида углерода на сосуды различных регионов убедительно показано во многих лабораториях и не вызывает сомнений [2, 3]. Дискуссионными остаются вопросы о молекулярных мишенях газотрансмиттера, реализующих его эффект. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что расслабление сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК), вызванное СО, опосредовано активирующим влиянием протеинкиназы G на кальцийзависимые

калиевые каналы большой проводимости (BK(Ca)) [19]. Согласно другой точке зрения, более вероятной представляется гипотеза о возможности прямой активации монооксидом углерода этих каналов [4]. BK(Ca)-каналы активируются локальными транзиторными повышениями концентрации кальция, при этом считается, что сопряжение кальциевых всплеск с BK(Ca)-каналом является ключевым звеном в обеспечении расслабляющего действия СО [5, 12]. Помимо прямого влияния СО на калиевые каналы, обсуждается возможность его цГМФ-зависимого активирующего эффекта на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменник, которое, приводя к накоплению Ca^{2+} в приобластной области клетки, способствует активации BK(Ca)-каналов [5].

В самом деле, BK(Ca)-каналы – основной мембранный эффектор многих физио-

© М.Б. Баскаков, А.С. Желудева, С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, А.Н. Алейник, П.И. Янчук, М.А. Медведев, С.Н. Орлов

логически активных веществ. Однако из-за концентрации внимания на этой парадигме, вопросы участия других ионных каналов в механизмах СО-индуцированной релаксации не нашли удовлетворительного решения. Ранее нами была показана роль NO и цГМФ в механизмах релаксирующего влияния монооксида углерода на артериальные гладкие мышцы и высказана гипотеза о множественности мишеней для этого газотрансмиттера [8]. Цель настоящей работы – исследование роли изменений калиевой проводимости мембраны СГМК сегментов аорты крысы и вклад потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа в механизмы релаксирующего действия донора монооксида углерода Tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer CORM-2 ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$).

МЕТОДИКА

Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты проводилось с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Деэндотелизированные сосудистые сегменты получали из грудного отдела аорты 11–13-недельных крыс-самцов линии Вистар после эвтаназии под глубоким наркозом (пентобарбитал натрия, 70 мг/кг, внутривенно) в соответствии с гуманными принципами ухода за животными (Страсбург, 1986). Изолированный отдел аорты помещали в раствор Кребса. Соединительную и жировую ткань удаляли ножницами, эндотелий – осторожным вращением деревянного манипулятора внутри просвета сосуда. Сосудистые сегменты предварительно растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков в термостатируемой камере объемом 10 мл. Механическое напряжение гладкомышечных препаратов измеряли в изометрическом режиме.

Растворы для инкубации препаратов готовили на основе дистиллированной воды до-

бавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,2, глюкозы – 5,5, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ – 15 [tris(oxymethyl)-aminometan] (316,4 мсМ); pH 7,35–7,40, температура $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Амплитуду контрольных сократительных ответов сегментов на действие гиперкалиевого раствора Кребса (эквимолярное замещение 30 ммоль/л NaCl на KCl) регистрировали после 40–50 мин выдерживания в нормальном растворе Кребса и принимали за 100 %. В экспериментах с использованием в качестве предсокращающего фактора фенилэфрина амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды фенилэфрининдуцированного сокращения (10 мкмоль/л).

Изучение активности потенциалзависимых кальциевых каналов. Точные измерения объема клеток и входящих потоков ионов в сосудистых сегментах осложняется относительно большим внеклеточным пространством, наличием фибробластов и неоднородных СГМК. С другой стороны, долгосрочное культивирование этих клеток быстро подавляет экспрессию ряда специфических генов, которые определяют их сократительный фенотип в естественных условиях. Имея это в виду, мы использовали свежесыведенные СГМК аорты крысы в 3–8 пассажах («Lonza», США).

Активность потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа оценивали как никардипинчувствительный компонент скорости входа ^{45}Ca [9]. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, промывали два раза с 2 мл аликвоты А (150 ммоль/л NaCl и 10 ммоль/л HEPES-tris, pH 7,4) и 0,25 мл среды С, содержащей (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 1, глюкозы – 5, HEPES-трис – 20 (pH 7,4) и исследуемые соединения в концентрациях, указанных в таблице. В части образцов в состав среды входил никардипин (1 мкмоль/л). Через 10 мин инкубации при 37°C поглощение изотопа было инициировано

добавлением 0,25 мл гиперкалиевой среды D (20 ммоль/л NaCl, 125 ммоль/л KCl), содержащие 3 мкС / мл ^{45}Ca . Через 5 мин поглощение изотопа было прекращено путем добавления 2 мл ледяной среды W, содержащей 100 ммоль/л MgCl_2 и 10 ммоль/л HEPES-tris (pH 7,4). Клетки трижды промывали в этой же среде, и радиоактивность инкубационной среды и клеточного лизата определяли на жидкостном сцинтилляционном анализаторе. Скорость входа ^{45}Ca (V , нмоль / мг белка за 5 мин) была рассчитана как $V = A/am$, где A – радиоактивность образцов (срм), a – специфическая радиоактивность ^{45}Ca в среде (срм/нмоль/л) и m – содержание белка. Активность L-типа кальциевых каналов и систем, обеспечивающих никардипинрезистентный вход Ca^{2+} в отсутствие CORM-2 принимали за 100 %.

В качестве донора монооксида углерода использовали CORM-2 («Sigma», США) [10, 11], а также реактивы: тетраэтиламмония хлорид (ТЭА); («Serva», Германия); $^{45}\text{CaCl}_2$ (Perkin Elmer, США). Остальные химические вещества были получены от фирмы («Sigma», США) и («Serva», Германия). Никардипин растворяли в 70 % этаноле. Этанол до конечной концентрации 0,1 % не влиял на измеряемые показатели.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 фирмы «Statsoft». Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($X \pm m$). Для определения характера распределения полученных результатов использовали критерий нормальности Колмогорова–Смирнова. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали критерий U Манна–Уитни. Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован критерий t Вилкоксона. Достоверность различий определялась при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В концентрациях 1–1000 мкмоль/л CORM-2 не влиял на исходное механическое напряже-

ние сосудистых сегментов, но дозозависимо расслаблял такие предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса (EC_{50} CORM-2 – 100 мкМ) или 10 мкмоль/л фенилэфрином (EC_{50} CORM-2 – 10 мкмоль/л; рис 1).

Для выяснения вклада изменений калиевой проводимости мембраны исследуемых ГМК в механизмы расслабляющего действия CO на сосудистые гладкие мышцы применяли блокаторы потенциалзависимых калиевых каналов ТЭА и 4-аминопиридин (4-АП). Тестировались растворы, содержащие CORM-2 в концентрациях, равных EC_{50} для использованных способов предсокращений сосудистых сегментов.

Добавление 10 ммоль/л ТЭА в раствор Кребса не влияло на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, по сравнению с контролем, но на $16,2 \pm 8,6\%$ ($n=6$, $P < 0,05$) увеличивало механическое напряжение сосудистых сегментов, предсокращенных аппликацией 10 мкмоль/л фенилэфрина. На фоне действия ТЭА релаксирующее влияние CORM-2 на сокращение гладких мышц аорты, индуцированное гиперкалиевым раствором Кребса или фенилэфрина значительно ослаблялось.

Влияние блокаторов калиевых каналов на эффекты CORM 2 в сегментах аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором и фенилэфрином:

KCl (контроль)	100 %
KCl и CORM-2	$58,4 \pm 6,7\%$ *
KCl, 4-АП и CORM-2	$93,5 \pm 4,5\%$ **
KCl, ТЭА и CORM-2	$91,8 \pm 2,5\%$ **
фенилэфрин (контроль)	100 %
фенилэфрин и CORM-2	$59,7 \pm 4,8\%$ *
фенилэфрин, 4-П и CORM-2	$96,4 \pm 1,9\%$ **
фенилэфрин, ТЭА и CORM-2	$93,3 \pm 3,8\%$ **

* $P < 0,05$ в сравнении с контролем; ** $P < 0,05$ в сравнении с действием CORM-2 в отсутствие блокаторов.

Блокирование потенциалзависимых калиевых каналов ГМК 4-АП (1 ммоль/л) не

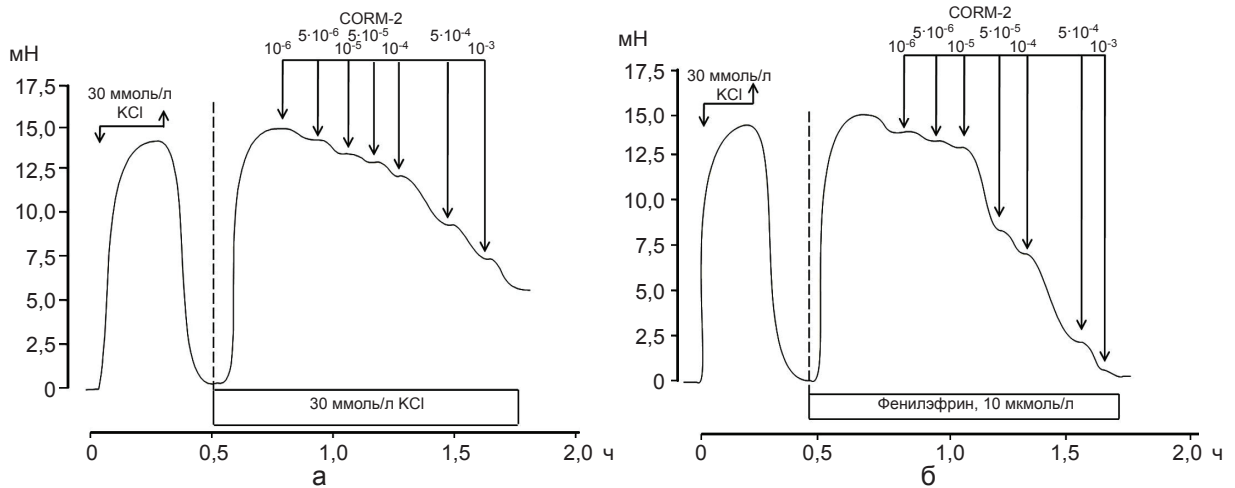


Рис. 1. Влияние донора монооксида углерода CORM-2 ($[Ru(CO)_3Cl_2]$) на механическое напряжение сосудистой гладкой мышцы аорты, предсокращенной гиперкалиевым раствором Кребса (а) и фенилэфрином (б)

изменяло механического напряжения сосудистых сегментов аорты, предсокращенных как гиперкалиевым раствором Кребса, так и с добавлением в него фенилэфрина. Однако предобработка сосудистых сегментов 4-АП достоверно уменьшала расслабляющее действие CORM 2 на гладкие мышцы (см. рис. 2).

В другой серии экспериментов изучали влияние монооксида углерода на потенциалзависимую кальциевую проводимость мембраны исследуемых СГМК. Маркером оперирования потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа служил никардипинчувствительный вход $^{45}Ca^{2+}$ в изолированные СГМК аорты крысы. Показано, что CORM-2 дозозависимо

уменьшал никардипинчувствительный вход $^{45}Ca^{2+}$ в исследуемые ГМК (таблица).

Приведенные результаты дают возможность предположить наличие в ГМК еще одной мишени, используемой СО для реализации своего расслабляющего действия. В самом деле, дозозависимое уменьшение CORM-2 никардипинчувствительного входа Ca^{2+} свидетельствует о возможном участии потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа в расслабляющем действии СО на гладкие мышцы сегментов аорты крысы.

Вместе с тем мы не можем исключить, что уменьшение никардипинчувствительного входа $^{45}Ca^{2+}$ в ГМК аорты крысы связано с блокирующим влиянием комплексов руте-

Дозозависимое действие CORM- 2 ($[Ru(CO)_3Cl_2]$) на вход Ca^{2+} в гладкомышечные клетки аорты крысы ($X \pm m, n = 3$)

Действующие вещества, мкмоль/л	L-тип кальциевых каналов	Никардипинчувствительный вход Ca^{2+}
Контроль	100	100
CORM- 2, 5	92±7	108±5
CORM- 2, 10	103±9	89±12
CORM- 2, 50	85±7	108±10
CORM- 2, 100	72±6*	102±9
CORM- 2, 500	64±5**	97±7

*P<0,05, **P<0,002 в сравнении с контролем.

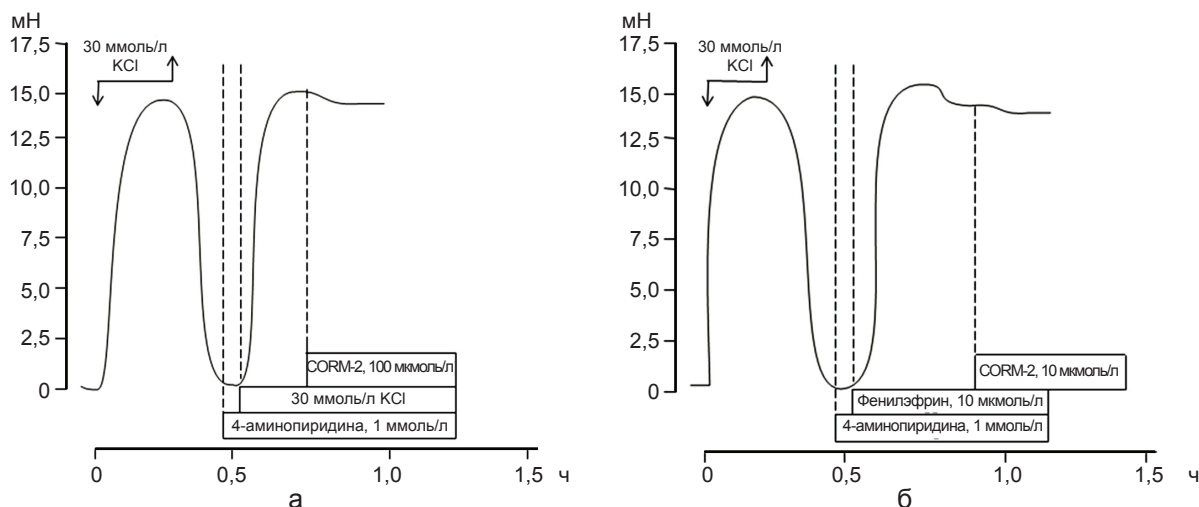


Рис. 2. Влияние донора монооксида углерода CORM-2 ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) на механическое напряжение гладкой мышцы аорты при действии гиперкалиевого раствора Кребса (а) и фенилэфрина (б) в присутствии 4-аминопиридина

ния (Ru (II)) на эти каналы. Уточнение этого вопроса имеет принципиальное значение и необходимо проведение дополнительных экспериментов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом ряде недавних исследований показано, что в расслабляющее действие оксида углерода вовлечены ВК(Ca)-каналы. CO, способствуя открыванию этих каналов, обуславливает гиперполяризацию мембраны сГМК, закрывание потенциалзависимых кальциевых каналов, уменьшение входа Ca^{2+} и расслабление гладкой мышцы. CO активирует эти каналы, взаимодействуя с α -субъединицей или ассоциированными с ней регуляторными элементами [7, 17]. Допускается, что α -субъединица ВК(Ca)-канала содержит гем-связывающий карман, и его присоединение блокирует этот канал. Оксид углерода взаимодействует с канал-связанным железом гема и нарушает ассоциацию последнего с каналом, тем самым приводя к его активации. Гем, связанный с каналом, служит рецептором для CO, а взаимодействие между ними повышает чувствительность канала к кальцию [10].

Хорошо известно, что ТЭА в миллимоляр-

ных концентрациях, кроме ВК(Ca), в равной степени блокирует кальцийактивируемые калиевые каналы промежуточной [1, 14] и малой проводимости [3] и потенциал-зависимые кальциевые каналы [9]. В соответствии с этим, полученные нами результаты могут свидетельствовать о вовлечении и кальцийактивируемых, и потенциалзависимых калиевых каналов в реализацию расслабляющего действия монооксида углерода на исследуемые сосудистые сегменты. Однако селективное блокирование потенциалзависимых калиевых каналов 4-АП ослабляло CO-индуцируемую релаксацию ГМК аорты практически в такой же степени, что и совместное выключение кальцийактивируемых и потенциалзависимых калиевых каналов ТЭА. Следовательно, полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что открывание потенциалзависимых калиевых каналов является ключевым механизмом реализации расслабляющего действия CO на сГМК аорты крысы.

Принципиальное значение имеют данные, если они будут подтверждены, об участии газотансмиттеров, оксида углерода по крайней мере, в регуляции кальциевых каналов L-типа в сГМК. Эти каналы, а точнее обеспе-

чиваемые их оперированием Ca^{2+} входящие токи, играют доминирующую роль в функционировании нейрона как интегративной системы [7], в регуляции сократительных свойств кардиомиоцитов [16, 19], в том числе в защите миокарда при ишемии [12]. В этих клетках кальциевые каналы L-типа метаболически зависимы, управляются цАМФ [8], Ca^{2+} [9], наружными протонами [18] или цАМФ- и кальмодулиннезависимым фосфорилированием, как в случае с ангиотензином II [8]. В ГМК большинство регуляторных путей «замкнуто» на каналы выходящих токов и в первую очередь на ВК(Ca)-каналы. Полученные сведения о том, что кальциевые каналы L-типа в сГМК управляются не только «классическими» вторичными посредниками (Ca^{2+} и цАМФ), но и газовыми посредниками, оперирование которых, как правило, не связано жестко с лигандрецепторным взаимодействием, открывает новые перспективы для разработки средств и способов управления функцией клеток путем модуляции состояния этих каналов. Приоритетными должны явиться исследования роли не только ВК(Ca)-каналов, но потенциалзависимых и кальцийактивируемых калиевых каналов промежуточной и малой проводимости, функциональная значимость которых пока точно не определена, но, как можно предполагать из результатов настоящего исследования, последние также являются полисигнальными эффекторами. Основной поиск должен быть направлен на изыскание путей и способов управления поведением ГМК через модуляцию состояния «новых» и традиционных мишеней газотрансмиттеров через вмешательство в процессы взаимодействия на них сигнальных молекул.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8487 «Гипоксия как фактор регуляции транскриптома и сократительных свойств кровеносных сосудов».

М.Б. Баскаков, А.С. Желудева, С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, А.Н. Алейник, П.И. Янчук, М.А. Медведев, С.Н. Орлов

ИОННИ МЕХАНИЗМИ ДІЇ МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ НА СКОРОТЛИВИ ВЛАСТИВОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ АРТЕРІАЛЬНИХ СУДИН

Монооксид вуглецю (CO) є одним із представників родини газотрансмітерів. У статті представлені результати механографічних досліджень механізмів дії CO на сегменти грудного відділу аорти щура. Встановлено, що релаксуюча судинні гладенькі м'язи дія донора CO CORM-2 опосередкована переважно відкриванням потенціалзалежних калієвих каналів гладеньком'язових клітин (ГМК): їх блокування 4-амінопіридином практично повністю усувало CO-індуковану вазорелаксацію сегментів, попередньо скорочених деполяризацією мембрани гладеньком'язових клітин у гіперкалієвому (30 ммоль/л KCl) розчині або 10 мкмоль/л фенілефрину. Вперше показано, що CORM-2 зменшує нікардипінчутливий вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в свіжовиділені клітини аорти. Є підстави вважати, що потенціалзалежні кальцієві канали L-типу судинних ГМК є ще однією мішенню дії CO, через яку реалізується розслаблююча дія цього газотрансмітера. Додаткові дослідження необхідні для з'ясування внеску впливу комплексів рутенію (Ru(II)) на феноменологію ефектів монооксиду вуглецю.

Ключові слова: монооксид вуглецю, гладенькі м'язи судин, калієві канали, кальцієві канали L-типу.

M.B. Baskakov, A.S. Zheludeva, S.V. Gusakova, L.V. Smagly, A.N. Aleinik, P.I. Yanchuk, M.A. Medvedev, S.N. Orlov

IONIC MECHANISMS OF CARBON MONOXIDE ACTION ON THE CONTRACTILE PROPERTIES OF SMOOTH MUSCLES OF THE BLOOD VESSELS

Carbon monoxide (CO) is one of a family of gas transmitters. In this article we present the results of mechanographic investigations of the mechanisms of CO action on a rat thoracic aorta segments. We found that relaxing effect of CO donor CORM-2 on vascular smooth muscles is mediated mainly by opening of voltage-dependent potassium channels in smooth muscle cells: 4-aminopyridine, blocking these channels, almost completely eliminated the CO-induced vasorelaxation of the segments precontracted by depolarization of the smooth muscle cells membranes with high potassium (30 mM KCl) solution or by phenylephrine (10 μM). For the first time we documented that CORM-2 reduces the nicardipine-sensitive input of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in freshly isolated aorta cells. There are reasons to suggest that the L-type voltage-dependent calcium channels of vascular smooth muscle cells are another target for CO, which is implemented in the relaxing effect of this gas transmitter. Additional research

is needed to determine the influence of ruthenium complexes (Ru(II)) on phenomenology of carbon monoxide effects.

Key words: carbon monoxide, vascular smooth muscles, potassium channels, L-type calcium channels.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Tomsk Polytechnic University, Russia;

Laboratory of the Research Center of the University of Montreal, Canada;

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams D.J., Hill M.A. Potassium channels and membrane potential in the modulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2004. – **15**. – P.598–610.
2. Baskakov M., Gusakova S., Smagly L. Mechanisms of regulation of gasotransmitters contractile activity of smooth muscle cells // *Hypertension.* – 2012. – **30**. Suppl. A. – P. 366.
3. Burnham M., Bychkov R. Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF // *Br J. Pharmacol.* – 2002. – **135**. – P.1133–1143.
4. Catterall W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} -channels // *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2000. – **16**. – P.521–555.
5. Gagov H., Kadinov B., Christov K. Role of constitutively expressed heme-oxygenase-2 in the regulation of guinea pig coronary artery tone // *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* – 2003. – **446**. – P.412–421.
6. Jaggar J.H., Leffler C.W., Cheranov S.Y. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} -activated K^{+} channels // *Circ. Res.* – 2002. – **91**, № 7. – P.610–617.
7. Jaggar J., Li A., Parfenova H. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels // *Circ Res.* – 2005. – **97**, №8. – P.805–812.
8. Kamp T.J., Hell J.W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C // *Circ. Res.* – 2000. – **87**, № 12. – P.1095–102.
9. Monaghan A.S., Benton D.C., Bahia P.K., Hosseini R., Shah Y.A., Haylett D.G., Moss G.W. The SK3 subunit of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P.1003–1009.
10. Motterlini R., Clark J., Foresti R. Carbon Monoxide – releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities // *Circulation Research.* – 2002. – **90**. – P.17–24.
11. Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities // *Biochemical Society Transactions.* – 2007. – **35**, N5. – P.1142–1146.
12. Orlov S.N., Tremblay J. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx in vascular smooth muscle cells // *Hypertension.* – 1996. – **27**. – P.774–780.
13. Sansom M.S.P., Shrivastava I.H., Bright J.N. et al. Potassium channels: structures, models, simulations // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2002. – 1565. – P.294–307.
14. Sheng J.Z., Andrew P.B. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells // *Amer. J. Cell. Physiol.* – 2007. – **293**. – P.458–467.
15. Tang X.D., Xu R., Reynolds M.F. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels // *Nature.* – 2003. – **425**. – P.531–535.
16. Williams J. The functions of two species of calcium channel in cardiac muscle excitation-contraction coupling // *European Heart Journal.* – 1997. – **18**. – P.A27–A35.
17. Wilkinson W.J., Kemp P.J. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels // *J. Physiol.* – 2011. – **589**. – P.3055–3062.
18. Wu L., Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – **57**. – P.585–630.
19. Wu L., Cao K., Lu Y., Wang R. Different mechanisms underlying the stimulation of KCa channels by nitric oxide and carbon monoxide // *J. Clin. Invest.* – 2002. – **110**. – P. 691–700.

Сибир. мед. ун-т, г. Томск, Россия;

Нац. исслед. Томск. политех. ун-т, Россия;

Лаборатория Науч.-исслед. центра ун-та, г. Монреаль, Канада;

Киев. нац. ун-т им. Тараса Шевченко, Украина

E-mail: yanchuk49@ukr.net

Материал поступил в редакцию 05.02.2013

А.О. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Особливості динаміки кальцієвого сигналу, викликаного довготривалою високочастотною стимуляцією культивованих нейронів гіпокампа

Досліджували зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) в культивованих нейронах гіпокампа з використанням кальційчутливого флуоресцентного барвника Indo-1. Зміни $[Ca^{2+}]_i$ під впливом довготривалої стимуляції (в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина») було вивчено на 56 нейронах; за характером динаміки кальцієвого сигналу після закінчення стимуляції нейрони були поділені на 2 групи: в першій групі ($n=24$) $[Ca^{2+}]_i$ знижувалась одразу після припинення стимуляції; у другій групі ($n=32$) було зареєстровано затримку зниження. Затримка варіювала від 1 до 27 с і залежала від тривалості та частоти стимуляції. Максимальне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ достовірно відрізнялось у клітин першої (1820 ± 195 нмоль/л, $n=24$) та другої (2618 ± 165 нмоль/л, $n=23$) груп. Лінійна залежність між постійною часу спаду та частотою стимуляції існувала тільки для клітин другої групи. Після виникнення ефекту затримки спаду достовірно змінювалась постійна часу спаду – у всіх випадках вона збільшилась (у середньому на $41 \pm 8\%$). Зміна динаміки кальцієвого сигналу та значне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ можуть бути зумовлені наявністю низькоафінного буфера та потребують подальшого фармакологічного дослідження.

Ключові слова: кальцієві сигнали, Indo-1, нейрони гіпокампа.

ВСТУП

Упродовж останніх років вивчення властивостей імпульсної активності нейронів кортекса [3], зорового кортекса [13], гіпокампа [10, 11], спінальних гангліїв [5] привертає значний науковий інтерес. Багатьма авторами було проведено електрофізіологічну класифікацію нейронів залежно від їхньої відповіді на тривалу (0,5–1 с) ін'єкцію деполяризувального струму [7, 8, 10, 13]. При цьому значну увагу приділяють нейронам, для яких характерна високочастотна генерація потенціалів дії (ПД) у відповідь на вище згадану ін'єкцію, тобто частота ПД перевищує 50 Гц [2, 4, 14]. Оскільки серія ПД значно підвищує концентрацію Ca^{2+} в клітині, то кінетика його подальшого зв'язування внутрішньоклітинними буферами та динаміка виведення із клітини викликають безумовний фундаментальний інтерес та практичне значення, бо саме іони

кальцію є основними вторинними посередниками, що регулюють значну кількість внутрішньоклітинних процесів. Тому метою цього дослідження було вивчення зміни кінетики кальцієвого сигналу при довготривалій стимуляції нейронів гіпокампа.

МЕТОДИКА

Культивування нейронів гіпокампа. Культивування нейронів гіпокампа проводили як описано раніше [6]. Після декапітації новонароджених щурів лінії Вістар гіпокамп виділяли та обробляли 0,025%-м розчином трипсину протягом 10 хв при 34°C. Після механічної дисоціації за допомогою пастерівських піпеток клітини висівали на покриті полі-L-орнітином/ламніном чашки Петрі. Клітини культивували у розчині, що складався з мінімального середовища ігла (MEM), 10%-ї

© А.О. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO_3 , 6 мг/мл інсуліну, пеніциліну та стрептоміцину. На третю добу культивування 1 мкмоль/л Ara-C на 24 год додавали до культурального розчину для припинення проліферації гліальних клітин. Експерименти проводилися на 14–28 добу культивування.

Електрофізіологія. В експериментах використовувалися такі розчини (ммоль/л): зовнішньоклітинний: NaCl – 140, KCl – 3, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 2, Hepes – 10, глюкоза – 12; внутрішньоклітинний: K-глюконат – 100, KCl – 40, MgCl_2 – 5, HEPES – 20, EGTA – 0,15, Na-ATP – 3, Na-ADP – 0,5, Na-GTP – 0,5, кальцій-чутливий барвник Indo-1 (пентакалієва сіль) – 0,1.

Досліди проводили в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина», на мембрані підтримували потенціал -70 мВ. Нейрони стимулювали деполяризувальними імпульсами амплітудою 80 мВ, тривалістю 3 мс, частотою 30–125 Гц протягом 2–30 с. Інтервали між серіями стимулів становили не менше ніж 4 хв, чого було достатньо для відновлення базової внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію.

Зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію реєстрували за допомогою спектрофотометричної установки («Carin Research Ltd», Великобританія). Флуоресценція барвника збуджувалася на довжині хвилі 360 нм, флуоресцентне випромінювання від об'єкта реєструвалось при $\lambda = 408$ і 480 нм двома фотоелектронними помножувачами, сигнали від яких оцифровувались та записувались за допомогою АЦП DigiData 1322A. Відношення інтенсивності флуоресцентного випромінювання на довжинах хвиль 408 та 480 нм (R) перераховували в $[\text{Ca}]_i$ з використанням співвідношення $[\text{Ca}]_i = K_d(R_{\min} - R)/(R - R_{\max})$, де $R_{\min} = 0,31$ та $R_{\max} = 2,71$ – значення при мінімальній і максимальній концентраціях кальцію у внутрішньоклітинному розчині, $K_d = 0,54$ мкмоль/л – ефективне значення константи дисоціації барвника, які були визначені експериментально в калібрувальних

дослідах з використанням внутрішньоклітинних розчинів з різною фіксованою концентрацією кальцію.

Результати аналізували за допомогою програмного пакета pClamp 9.0 (Axon Instruments) та програм Origin 7.0 (OriginLab Corporation) та Excel 2003 (Microsoft Corporation). Перевірку на відповідність нормальному розподілу здійснювали тестом Шапіро–Уїлка. Результати представлені як середнє \pm стандартна похибка середнього. Достовірність різниці середніх значень перевірялися за критерієм t Стьюдента ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію під впливом довготривалої стимуляції було досліджено на 56 нейронах. У внутрішньоклітинний розчин додавався кальційчутливий флуоресцентний барвник Indo-1 (0,1 ммоль/л), після утворення конфігурації «ціла клітина» протягом 5–10 хв клітина завантажувалася барвником, після чого інтенсивність флуоресцентного випромінювання сягала стаціонарного рівня та відповідала концентрації кальцію $43,7 \pm 2,5$ нмоль/л ($n=48$). Стимуляцію нейронів виконували в режимі фіксації потенціалу, використовуючи деполяризувальні імпульси від потенціалу покою (-70 мВ) амплітудою 80 мВ і тривалістю 3 мс, частота варіювала від 30 до 125 Гц, тривалість серії імпульсів була від 2 до 30 с. Короткочасний деполяризувальний зсув мембранного потенціалу клітини від -70 до $+10$ мВ імітував виникнення ПД.

За характером динаміки кальцієвого сигналу після закінчення стимуляції нейрони були поділені на 2 групи. У першій групі (24 нейрони) концентрація кальцію знижувалась одразу після припинення імпульсації (рис. 1, а). У другій групі (32 нейрони), починаючи з тривалості стимулу 2–30 с було зареєстровано затримку спаду кальцієвого сигналу від 1 до 27 с після припинення імпульсації (рис. 1, б).

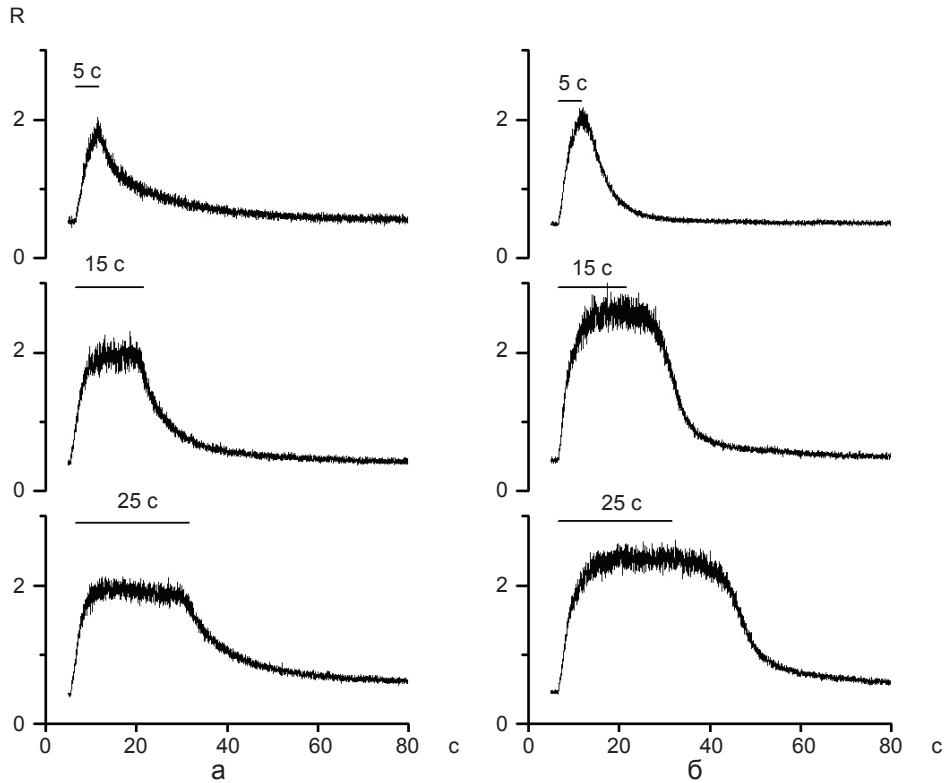


Рис. 1. Два типи кальцієвих сигналів (R) нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляції різної тривалості (5, 15, 25 с): а – кальцієвий сигнал від нейронів першої групи (зниження концентрації кальцію одразу після припинення стимуляції), б – другої групи (затримка спаду концентрації кальцію)

Зниження концентрації кальцію в нейронах обох груп апроксимувалося однією експонентою. Постійні часу спаду для першої та другої груп були: $10,6 \pm 0,9$ с ($n=24$) і $11,0 \pm 0,9$ с ($n=32$), які достовірно ($P<0,05$) не відрізнялись між собою (рис. 2).

Затримка спаду концентрації кальцію виникала при варіюванні частоти стимуляції від 30 до 125 Гц і тривалості серії стимулів від 2 до 30 с; середня частота стимуляцій, при якій спостерігалась максимальна затримка, становила 66 ± 3 Гц.

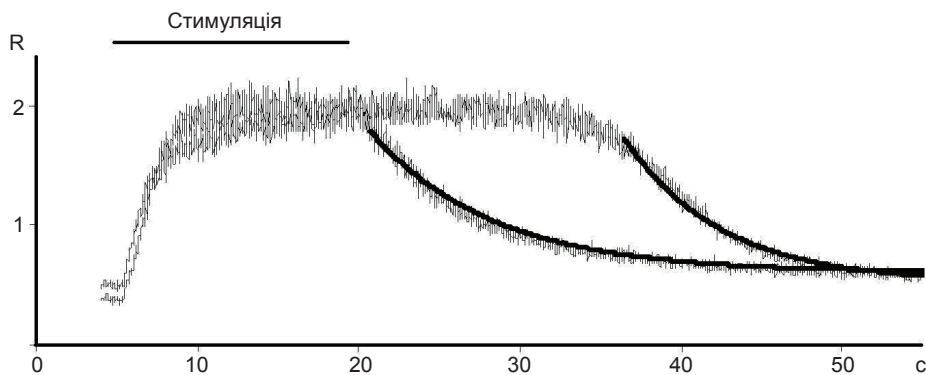


Рис. 2. Кальцієві сигнали (R) двох різних нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляцію тривалістю 15 с (частота 80 Гц, тривалість окремого деполаризувального стимулу 3 мс). Спад сигналів апроксимовано моноекспоненційною функцією. Кальцієвий сигнал у клітині першої групи нейронів спадає одразу після закінчення стимуляції (1), у нейроні другої групи (2) – знаходиться на стаціонарному рівні не менше ніж 12 с після закінчення стимуляції

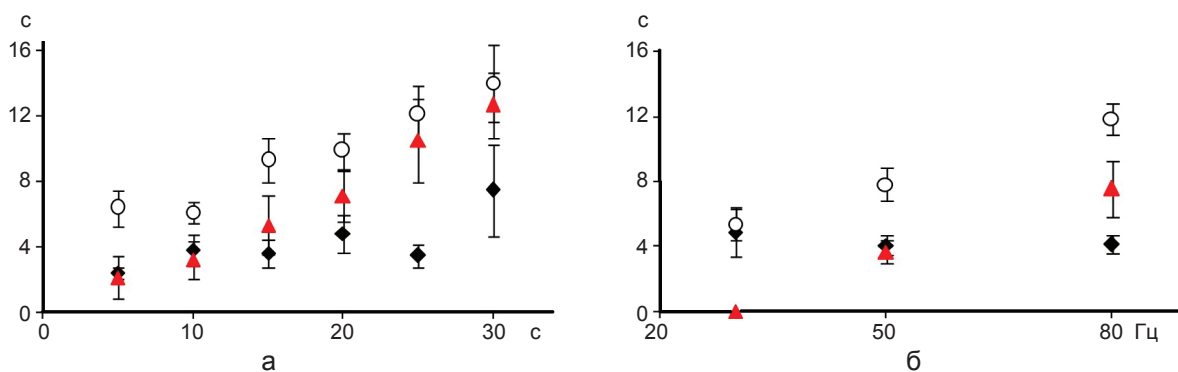


Рис. 3. Залежності середніх значень постійної часу зростання (◆), постійної часу спаду (○) та тривалості затримки (▲) від тривалості (а) та частоти (б) стимуляції. Представлено результати, отримані при усередненні значень для 8 (а) та 7 клітин (б)

У наших експериментах тривалість затримки спаду лінійно залежала від тривалості та частоти стимуляції. Ці параметри стимуляції також впливали на постійну часу спаду і не впливали на постійну часу зростання кальцієвого сигналу (рис. 3).

Постійна часу спаду кальцієвого сигналу в клітинах першої групи не залежала від частоти стимуляції, для клітин другої групи постійна часу спаду сигналу лінійно залежала від частоти стимуляції (рис. 4).

Середня частота стимуляції, при якій виникала затримка, становила 59 ± 3 Гц. Порівняння постійної часу спаду кальцієвого сигналу, викликаного стимуляцією з частотою, яка ще не викликала затримки спаду сигналу і за умови, що затримка виникне при збільшенні частоти, у клітин другої групи ($n=18$) та постійної часу спаду сигналу в клітинах першої групи ($n=24$) свідчить про

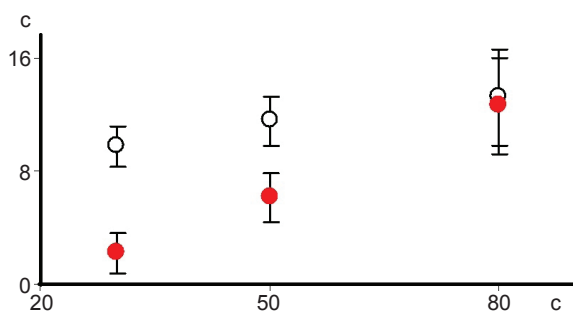


Рис. 4. Залежність середніх значень постійних часу спаду для клітин першої (○) та другої (●) груп. $P < 0,05$ – при стимуляції з частотами 30 та 50 Гц

достовірність ($P < 0,05$) різниці. Крім того, у 18 клітин другої групи була проаналізована динаміка кальцієвого сигналу, викликаного стимуляцією з частотами, які недостатні та достатні для виникнення затримки спаду. Після виникнення ефекту затримки спаду достовірно змінювалася постійна часу спаду – у всіх випадках вона збільшилася (в середньому на 41 ± 8 %), водночас постійна часу зростання достовірно ($P < 0,05$) не змінилась.

Лінійна залежність амплітуди кальцієвого сигналу від частоти стимуляції спостерігалася при частоті стимуляції до ~ 60 Гц, що відповідає середній частоті виникнення затримки. При збільшенні частоти стимуляції амплітуда сигналу мала тенденцію виходу на стаціонарний рівень. При стимуляції нейрона з частотою більшою за частоту виникнення затримки подальшого зростання амплітуди кальцієвого сигналу не відбувалося (рис. 5).

Максимальне підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію достовірно відрізнялось у клітин першої (1820 ± 195 нмоль/л, $n=24$) та другої (2618 ± 165 нмоль/л, $n=23$) груп.

Таким чином, описані дві групи нейронів, які відрізняються за формою (з затримкою та без затримки спаду), за кінетичними характеристиками та максимальною амплітудою кальцієвого сигналу, що може свідчити про відмінності в механізмах регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію в

різних нейронах культури гіпокампа.

У наших експериментах кальцієвий сигнал моноекспоненціально спадає або одразу після припинення стимуляції, або після затримки. Аронте та співавт. [1] показали, що на корзинкових ГАМК-ергічних нейронах гіпокампа в спаді концентрації внутрішньоклітинного кальцію були наявні швидка та повільна компоненти, тому він значно краще апроксимувався двома експонентами. Згадані нейрони імунореактивні до парвальбумін-специфічного типу антитіл, і саме наявність парвальбуміну перетворює моноекспоненціальний спад у біекспоненціальний [15]. Однак Lee та співавт. [9] показали наявність останнього, викликаного поодиноким ПД, в пірамідальних клітинах гіпокампа, які, як відомо, не містять парвальбумін. Автори цей факт намагаються пояснити наявністю повільного кальцієвого буфера.

Деяко подібний ефект затримки спаду концентрації кальцію, викликаний тетанічною стимуляцією (20 Гц, 15 с) в експериментах на нейронах симпатичних гангліїв земноводних, спостерігали інші автори [12]. Аналогічна затримка при попередньо індукованій черепно-мозковій травмі відбувалася на нейронах гіпокампа при аплікації глутамату (50 мкмоль/л, 4 хв) [16]. Більше того, після такої збуджувальної стимуляції концентрація кальцію не поверталась на базовий рівень

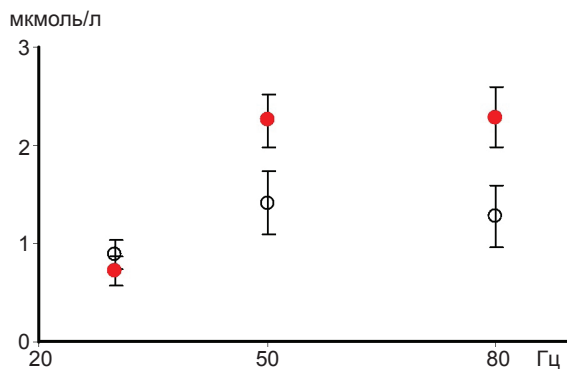


Рис. 5. Залежність середньої амплітуди кальцієвого сигналу від частоти стимуляції для нейронів першої (○, n=5) та другої (●, n=7) груп

упродовж щонайменше 10 хв. За поясненням авторів, цей ефект було викликано порушенням кальцієвого гомеостазу внаслідок травми.

На нашу думку, динаміка спаду кальцієвого сигналу та значне підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію можуть бути зумовлені наявністю низькоафінного буфера. Після короткотривалої або низькочастотної стимуляції вільні іони кальцію або зв'язуються внутрішньоклітинними депо чи буферами, або виводяться з клітини назовні. При збільшенні тривалості або частоти стимуляції концентрація вільного кальцію в клітині підвищується і в дію вступає низькоафінний буфер, поріг роботи якого залежить від концентрації іонів кальцію в цитозолі. Після закінчення стимуляції, коли кальцій припиняє надходити до клітини, починається поступове спустошення буфера. Цей процес підтримує стаціонарний рівень концентрації кальцію і, таким чином, змінює динаміку його викиду з клітини.

Ця робота є частиною проекту спільних наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень (№ реєстрації 0112U004111).

А.А. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, Н.С. Веселовський

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ КальциЕВого СИГНАЛА, ВЫЗВАННОГО ДОЛГОДЛЯЩЕЙСЯ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

Исследовали изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в культивируемых нейронах гиппокампа с использованием кальцийчувствительного флуоресцентного красителя Indo-1. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под влиянием долгодлительной стимуляции (в режиме фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка») было изучено на 56 нейронах; по характеру динамики кальциевого сигнала после окончания стимуляции нейроны были разделены на 2 группы: в первой группе (n=24) $[Ca^{2+}]_i$ моноэкспоненциально снижалась сразу же после окончания стимуляции; во второй группе (n=32) была зарегистрирована задержка спада кальциевого сигнала после окончания стимуляции, длительность задержки варьировала от 1 до 27 с и зависела

от длительности и частоты стимуляции. Максимальное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ достоверно отличалось у клеток первой (1820 ± 195 нмоль/л, $n=24$) и второй (2618 ± 165 нмоль/л, $n=23$) групп. Линейная зависимость между постоянной времени спада и частотой стимуляции существовала только у клеток второй группы. После возникновения эффекта задержки постоянная времени спада достоверно изменялась – во всех случаях она увеличилась (в среднем на $41 \pm 8\%$). Предполагается, что изменение динамики кальциевого сигнала и значительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ могут быть обусловлены наличием низкоаффинного буфера, что требует дальнейшего фармакологического исследования. Ключевые слова: кальциевые сигналы, Indo-1, нейроны гиппокампа.

A. Moskalyuk, S. Voytenko, S. Fedulova, N. Veselovsky

CHANGES IN THE KINETICS OF CALCIUM SIGNALS IN RESPONSE TO HIGH FREQUENCY STIMULATION IN THE CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Dynamic changes in the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were studied in hippocampal cultured neurons using fluorescent Ca^{2+} -indicator dye Indo-1 and somatic whole-cell recordings. During the tetanus stimulation Ca^{2+} -transient increased their amplitude up to a steady-state level during repetitive stimulation. We identified two groups of neurons based on Ca-signal dynamics after the end of stimulation: the first group ($n=24$) with the monoexponential decay of $[Ca^{2+}]_i$ direct after the end of the tetanus; the second group ($n=32$) with the monoexponential delayed $[Ca^{2+}]_i$ decay after the end of the tetanus, the duration of delay varied from 1 to 27 s and depended on duration and frequency of stimulation. Peak amplitudes of Ca^{2+} -transients were statistically different between the first (1820 ± 195 nM, $n=24$) and the second (2618 ± 165 nM, $n=23$) groups. A linear dependence between decay time constant and frequency of stimulation was found for the second group of neurons only. In all cases when the delayed decay was observed the decay time constant changed reliably after emergence of delayed decay; the average rise made up $41 \pm 8\%$. We suggest dynamic changes and essential rise in the intracellular free Ca^{2+} concentration arise from the presence of intracellular low-affinity buffer. This statement is to be further tested using pharmacological approach. Key words: calcium signals, Indo-1, hippocampal cultured neurons.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aponte Y., Bischofberger J., Jonas P. Efficient Ca^{2+}

buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus // *J. Physiol.* – 2008. – **586**. – P. 2061–2075.

2. Bartos M., Vida I., Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – **8**. – P. 45–56.
3. Connors B.W., Gutnick M.J. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons // *Trends Neurosci.* – 1990. – **13**. – P. 99–104.
4. Csicsvari J., Jamieson B., Wise K.D., Buzsaki G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat // *Neuron.* – 2003. – **37**. – P. 311–322.
5. Fang X., McMullan S., Lawson S., Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo // *J. Physiol.* – 2005. – **565**. – P. 927–943.
6. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., Romanyuk S.G., Veselovsky N.S. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons // *Neuroscience.* – 1999. – **92**. – P. 1217–1230.
7. Kawaguchi Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex // *J. Neurosci.* – 1995. – **15**. – P. 2638–2655.
8. Kawaguchi Y., Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex // *Cereb. Cortex.* – 1997. – **7**. – P. 476–486.
9. Lee S.H., Rosenmund C., Schwaller B., Neher E. Differences in Ca^{2+} buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat // *J. Physiol.* – 2000. – **525**. – P. 405–418.
10. Martina M., Schultz J.H., Ehmke H., Monyer H., Jonas P. Functional and molecular differences between voltage-gated K^+ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**. – P. 8111–8125.
11. McBain C.J., Fisahn A. Interneurons unbound // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – **2**. – P. 11–23.
12. Nohmi M., Hua S.Y., Kuba K. Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells // *J. Physiol.* – 1992. – **458**. – P. 171–190.
13. Nowak L.G., Azouz R., Sanchez-Vives M.V., Gray C.M., McCormick D.A. Electrophysiological classes of cat primary visual cortical neurons in vivo as revealed by quantitative analyses // *J. Neurophysiol.* – 2003. – **89**. – P. 1541–1566.
14. Rudy B., McBain C.J. Kv3 channels: voltage-gated K^+ channels designed for high-frequency repetitive firing // *Trends Neurosci.* – 2001. – **24**. – P. 517–526.
15. Schwaller B. Cytosolic Ca^{2+} buffers // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – **2**. – a004051.
16. Sun D.A., Deshpande L.S., Sombati S., Baranova A., Wilson M.S., Hamm R.J., DeLorenzo R.J. Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca^{2+})-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca^{2+} homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – **27**. – P. 1659–1672.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: nast@petrov.com.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 08.10.2012*

О.В. Долга, Н.Х. Погорєла, О.С. Богорад-Кобельська, Н.М. Жолобак, С.О. Заноза, С.А. Ляхов, І.С. Магура

Вплив похідних дифенілу на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів селезінки миші

Методом клітинного електрофорезу досліджували ранні зміни електрофоретичної рухомості (ЕФР) Т-лімфоцитів селезінки миші, індуковані структурними аналогами аміксину дигідрохлоридом 4,4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифенілу (сполука 1) та дигідрохлоридом 2-метоксикарбоніл-4,4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифенілу (сполука 2). В інтервалі 0-2 год усі сполуки дозозалежно збільшували абсолютне значення ЕФР порівняно з контролем. Ці зміни були однотипними та відрізнялися лише кількісно. В інтервалі 2-4 год за наявності аміксину або сполуки 1 абсолютне значення ЕФР додатково збільшувалося, а за наявності сполуки 2, навпаки, зменшувалося. Показано, що протилежна спрямованість ефектів указаних сполук може бути обумовлена тим, що аміксин та сполука 1 індукують, а сполука 2 не індукує продукцію інтерферону в Т-лімфоцитах in vitro. Отримані результати важливі для розуміння механізмів імуномодулювального ефекту аміксину та його структурних аналогів.

Ключові слова: аміксин, похідні дифенілу, індуктори інтерферону, Т-лімфоцити, електрофоретична рухомість.

ВСТУП

Профілактика та лікування вірусних захворювань є одним з пріоритетних напрямів медицини. Оскільки імунна система відіграє фундаментальну роль в антивірусному та протипухлинному захисті організму, пошук сполук, що мають імуномодулювальні властивості, є актуальним завданням сучасної фармакології. Імуномодулятори, впливаючи на процеси диференціювання, міграції, кооперації імункомпетентних клітин, а також на продукцію цитокінів згаданими клітинами, нормалізують імунну відповідь. Особливий інтерес представляють сполуки, що індукують ендогенну продукцію інтерферонів (ІФН), оскільки система ІФН залучена до реалізації антивірусної, протипухлинної та імунної відповіді [5, 19-24]. Використання інтерферогенів у клінічній практиці є не лише повноцінною заміною екзогенних ІФН, але і має ряд переваг. Зокрема, ці сполуки не мають антигенності та можуть

використовуватися впродовж тривалого часу. Вони не викликають надпродукції ІФН, оскільки його синтез збалансований і контролюється організмом. Одноразове введення індуктора забезпечує тривалу (впродовж декількох діб) циркуляцію в організмі ІФН в терапевтичній концентрації [5].

Активацію генів ІФН можна викликати різними природними та синтетичними індукторами. Серед останніх високо ефективними інтерферогенами є планарні ароматичні або гетероароматичні сполуки, які здатні до інтеркаляції між комплементарними парами азотистих основ ДНК, зокрема 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-он (тилорон) [22, 28]. Ця сполука має антивірусну, інтерфероніндукувальну, імунотропну, протипухлинну і протизапальну активність [30]. Нещодавно з'явилися повідомлення про її нейротропні властивості. Показано, що тилорон є селективним агоністом $\alpha 7$ нікотинового ацетілхолінового рецептора [21], а також модулює

© О.В. Долга, Н.Х. Погорєла, О.С. Богорад-Кобельська, Н.М. Жолобак, С.О. Заноза, С.А. Ляхов, І.С. Магура

експресію NF- κ B-індукованих генів у клітинах центральної нервової системи [34].

В Україні тилорон був синтезований за розробленим Богатським і співробітниками методом [1] та впроваджений в медичну практику як препарат Аміксин ІС (ВАТ “ІнтерХім”, Україна). Цей препарат успішно використовується при лікуванні інфекційних захворювань вірусної етіології [6-9]. Проте є публікації про деякі побічні ефекти при тривалому застосуванні надвисоких доз аміксину [20, 25, 33]. В рамках вивчення механізму дії препарату отримано більш активні та менш токсичні його похідні та/або аналоги. Наприклад, *in vitro* показана антивірусна та імунomodulatory активність 9-флуоренон-4-карбоксамідів [15], β -*O*-глюкозидів 9-флуоренон-2-карбогідроксиестерів [16], 2(4)-заміщених-9-флуоренонів та їх *O*-глюкозидів [17]. В експериментах *in vivo* продемонстровано, що аналоги аміксину, які містять у своїй структурі дифенільний фрагмент замість флуоренонового, безпечніші та індукують вищий титр ІФН, порівняно із аміксином [12, 13].

Аміксин не лише запускає в клітині цілий ряд біохімічних реакцій, але й змінює фізико-хімічні властивості плазматичної мембрани, в тому числі її поверхневий заряд [23], який, відповідно до сучасних уявлень, є одним з найважливіших показників функціональної активності клітини [26]. У зв'язку з цим вивчення механізмів ендогенної і фармакологічної регуляції величини поверхневого заряду є актуальною проблемою. Особливої уваги заслуговує дослідження модулювального впливу інтерферогенів на поверхневий заряд плазматичної мембрани імункомпетентних клітин, оскільки саме на рівні мембрани здійснюється ряд молекулярних процесів, з яких складається імунна реакція [10]. Індукована інтерферогенами зміна сумарного заряду поверхні вказаних клітин може впливати на їх взаємодію в процесі презентації антигену, і, отже, мати важливе значення для регуляції імунної відповіді.

Мета нашої роботи - дослідити вплив структурних аналогів аміксину – похідних дифенілу – на електрофоретичну рухомість (ЕФР) Т-лімфоцитів селезінки миші *in vitro*.

МЕТОДИКА

Реактиви. В роботі використовували дигідрохлорид 2,7-*bis*-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-ону (аміксин) [1], а також його структурні аналоги дигідрохлорид 4,4'-*bis*-[2-(діетиламіно)етокси]дифенілу (далі сполука 1) та дигідрохлорид 2-метоксикарбоніл-4,4'-*bis*-[2-(діетиламіно)етокси]дифенілу (далі сполука 2) [12], синтезовані у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України. Для приготування базових розчинів вказані сполуки розчиняли в дистильованій воді до кінцевої концентрації 2 мг/мл

Виділення лімфоцитів. Лімфоцити отримували із селезінки мишей лінії СВА 8-тижневого віку (самці) [11] і розділяли на колонках з нейлоновою ватою [14]. Кількість Т-лімфоцитів у збагаченій таким чином суспензії клітин була не менше ніж 80 % [4].

Обробка лімфоцитів аміксином або його структурними аналогами. Т-лімфоцити ($6,5 \cdot 10^5$ клітин/мл) інкубували за наявності аміксину або сполук 1, 2 у збалансованому сольовому розчині, що містив (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 2,5, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 1,0, тріс-НCl (рН 7,4) – 10,0, глюкоза – 5,0, впродовж вказаного часу при 37 °С. Для кожної концентрації (або експозиції) досліджених сполук готували 3 незалежні зразки. Кількість клітин з пошкодженою мембраною як в контролі, так і після інкубації з досліджуваними сполуками оцінювали за їхнім забарвленням трипановим синім методом світлової мікроскопії [11]. Після закінчення терміну інкубації лімфоцити осаджували центрифугуванням (10 хв, 400 г). Супернатант заморожували та зберігали при -25 °С.

Вимірювання електрофоретичної рухомості клітин. Осаджені лімфоцити двічі відмивали центрифугуванням (10 хв, 400 г) в розчині

такого складу (ммоль/л): $\text{KCl} - 2,5$, $\text{CaCl}_2 - 2,0$, тріс- $\text{HCl} - 10,0$ (рН 7,4), глюкоза – 280,0. ЕФР клітин визначали у тому самому розчині при 20 °С [32]. Серія експериментів включала 3 незалежні досліди, у кожному з яких вимірювали ЕФР не менше ніж 40 лімфоцитів.

Визначення титру індукованого ІФН. Активність ІФН оцінювали за результатами титрування зразків середовища, кондиціонованого Т-лімфоцитами, в культурі мишачих фібробластів L929 як описано раніше [18]. Як тест-вірус використовували вірус везикулярного стоматиту (штам Індіана). За одиницю активності ІФН приймали величину, обернену максимальному розведенню препарату, при якому спостерігали захист 50 % клітин від цитопатичної дії тест-вірусу.

Аналіз результатів. Статистичний аналіз експериментальних результатів проводили, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel та OriginPro 7.0. Розподіл значень ЕФР у наших експериментах був нормальним або близьким до нормального. Достовірність при оцінці істинного значення вимірюваної величини ЕФР становила 95 %. Результати представлені як середнє \pm помилка середнього. Для визначення достовірності відмінностей при порівнянні середніх значень використовували критерій t Стьюдента. Значення вважали достовірними при $P < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Методом клітинного електрофорезу вивчали ранні зміни ЕФР Т-лімфоцитів селезінки

миші, індуковані сполуками 1 та 2, які є структурними аналогами добре відомого індуктора ІФН аміксину, вибраного нами як препарат порівняння. Вказані сполуки відносяться до амфіфільних речовин і ефективно взаємодіють з поверхнею клітини. Відомо, що деякі амфіфільні речовини ушкоджують біологічні мембрани [31]. У зв'язку з цим у попередніх експериментах нами проведено порівняльне дослідження цитотоксичної дії аміксину та сполук 1, 2. Встановлено, що в інтервалі концентрацій 6–100 мкг/мл цитотоксичність залежить від структури сполуки і знижується у ряді аміксин $>$ сполука 1 \sim сполука 2 (таблиця). Отримані результати свідчать про те, що похідні дифенілу менш цитотоксичні, ніж аміксин. У подальших експериментах використовували такі експозиції та концентрації досліджуваних сполук, які викликали ушкодження мембрани не більше, ніж у 10 % клітин.

Результати вимірювання ЕФР Т-лімфоцитів в перші години дії аміксину та похідних дифенілу 1, 2 (50 мкг/мл) представлені на рис. 1. Для всіх досліджуваних сполук абсолютне значення ЕФР достовірно ($P < 0,001$) збільшувалося порівняно з контролем та до кінця першої години від початку їх дії сягало стаціонарного рівня, а потім практично не змінювалося протягом наступної години. Порівняльний аналіз результатів дає змогу зробити висновок, що за ефективністю збільшення ЕФР лімфоцитів в інтервалі 0 – 2 год досліджувані сполуки можуть бути розташовані в такій послідовності: сполука 2 $>$

Цитотоксичність аміксину та похідних дифенілу (n = 3)

Сполука	Приріст кількості лімфоцитів з пошкодженою мембраною порівняно з контролем, %			
	концентрація, мкг/мл			
	6	25	50	100
Аміксин	2,0	5,4	10,2	27,9
Сполука 1	-	1,5	4,0	7,0
Сполука 2	-	1,0	3,7	6,0

Примітка: Т-лімфоцити інкубували з різними концентраціями аміксину або сполук 1 чи 2 впродовж 4 год при 37 °С.

сполука 1 ~ аміксин. Через 2 год від початку дії аміксіну або сполуки 1 абсолютне значення ЕФР лімфоцитів знову збільшувалося, причому при однаковій концентрації ефект аміксіну був більшим, ніж ефект сполуки 1. Навпаки, за тих самих умов ЕФР лімфоцитів у присутності сполуки 2 зменшувалася.

Індуковане досліджуваними сполуками збільшення ЕФР Т-лімфоцитів упродовж перших двох годин залежало від концентрації сполук в інтервалі 6–100 мкг/мл (див. рис. 2).

ЕФР клітин залежить від сумарного поверхневого заряду їх плазматичної мембрани. Тому на підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що аміксин і сполуки 1, 2 збільшують сумарний негативний поверхневий заряд Т-лімфоцитів. Цей ефект може мати важливе значення для міжклітинної взаємодії при реалізації імунної відповіді. Крім того, величина поверхневого заряду впливає на примембранну концентрацію іонів, дифузю, пасивний та активний транспорт [27], активність зв'язаних із мембраною рецепторів,

ферментів [2, 26] та потенціалкерованих іонних каналів [29]. Отримані експериментальні результати важливі для розуміння механізмів імуномодулювального ефекту аміксіну та його структурних аналогів.

Результати наших експериментів свідчать про те, що упродовж перших двох годин зміни ЕФР Т-лімфоцитів, індуковані аміксіном або похідними дифенілу 1, 2, були однотипними та відрізнялися лише кількісно. Однакова спрямованість ефектів згаданих сполук у цьому інтервалі часу, найімовірніше, вказує на наявність подібних механізмів їх взаємодії з плазматичною мембраною. Через 4 год після початку дії зміни ЕФР, спричинені сполукою 2, були протилежні до тих, які спостерігались після впливу на клітини аміксіну чи сполуки 1.

При аналізі отриманих результатів необхідно враховувати, що величина поверхневого заряду клітини залежить від внутрішньоклітинних метаболічних процесів. Це ускладнює оцінку ролі окремих молекулярних механізмів в модифікації сумарного

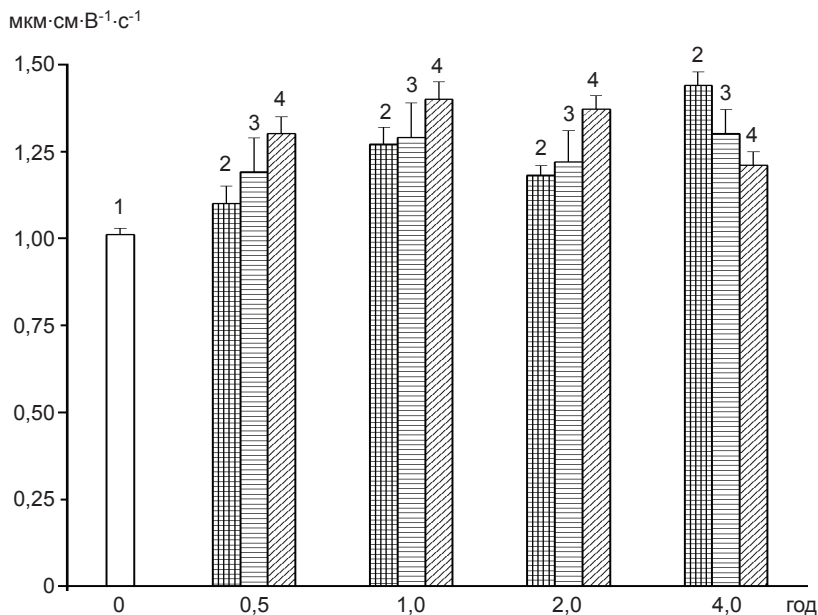


Рис. 1. Залежність електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів селезінки миші від тривалості дії досліджуваних сполук: 1 – контроль, 2 – аміксин, 3 – сполука 1, 4 – сполука 2. Т-лімфоцити інкубували за наявності вказаних сполук (50 мкг/мл) при 37 °С. $P < 0,001$ порівняно з контролем

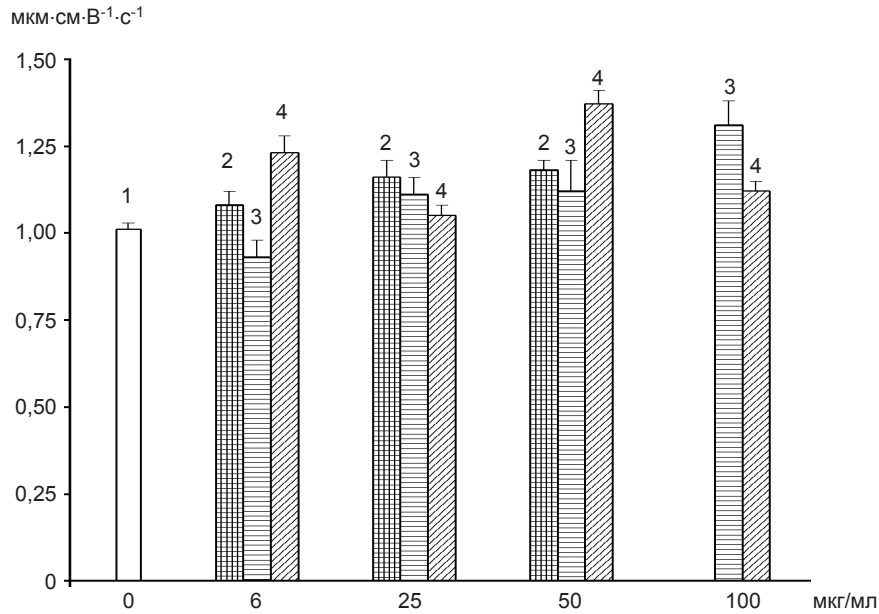


Рис. 2. Залежність електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів селезінки миші від концентрації досліджуваних сполук: 1 – контроль, 2 – аміксин, 3 – сполука 1, 4 – сполука 2. Т-лімфоцити інкубували за наявності вказаних сполук протягом 2 год при 37 °С. $P < 0,001$ порівняно з контролем.

поверхневого заряду. Відомо, що ІФН дозозалежно збільшує ЕФР Т-лімфоцитів селезінки миші [3]. У початковий період часу дії індуктора ІФН, коли концентрація індукваного ІФН в інкубаційному середовищі незначна, виявлене в наших експериментах збільшення ЕФР є ранньою відповіддю клітини на вплив індуктора. Зі зростанням концентрації ІФН в середовищі, додаткове збільшення ЕФР може бути зумовлене власне ним. У відповідь на індукцію різними за своєю хімічною природою сполуками продукція ІФН Т-лімфоцитами може бути різною і, відповідно, зміна ЕФР клітин під впливом індукваного ІФН також відрізнятиметься.

Враховуючи вищезазначене, ми припустили, що протилежна спрямованість ефектів сполук 1 та 2 у інтервалі 2-4 год зумовлена тим, що сполука 1 індукує, а сполука 2 не індукує синтез ІФН в Т-лімфоцитах *in vitro*. Для перевірки цього припущення визначали вміст ІФН у середовищі, в якому попередньо інкубували Т-лімфоцити з досліджуваними сполуками:

Т-лімфоцити

Титр інтерферонів в середовищі, кондиціонованому лімфоцитами, \log_2 (розведення⁻¹)

нативні (контроль)	1,0
оброблені аміксином	
6 мкг/мл	4,5
50 мкг/мл	5,0
оброблені сполукою 1	
6 мкг/мл	4,0
50 мкг/мл	8,0
оброблені сполукою 2	
6 мкг/мл	<1
50 мкг/мл	<1

Т-лімфоцити інкубували за наявності вказаної концентрації аміксіну або сполук 1 чи 2 впродовж 2 год при 37 °С (n = 3).

Слід відмітити, що аміксин та сполука 1 має, а сполука 2 не має інтерфероніндукувальної активності. Продукція ІФН Т-лімфоцитами, обробленими аміксином чи сполукою 1 у концентрації 6 мкг/мл, практично не відрі-

няється, проте значно нижча цитотоксичність є перевагою сполуки 1, завдяки чому вона може розглядатися як новий перспективний індуктор ІФН.

Нами не виявлено залежності між збільшенням ЕФР та інтерферогенною активністю досліджуваних сполук. Присутність флуоренонового фрагменту в молекулі аміксину чи дифенільного у сполуці 1 практично не впливає на їх інтерферогенні властивості, тоді як додаткове введення метоксикарбонільної групи в положення 2 дифенільного фрагменту практично унеможливує вірогідність реалізації планарної структури для сполуки 2 та супроводжується втратою здатності викликати продукцію ІФН в Т-лімфоцитах *in vitro*. Подальше вивчення взаємодії індукторів ІФН з плазматичною мембраною представляється надзвичайно важливим не лише для розуміння механізмів їх імуномодулювального ефекту, але й для впливу на ці процеси в організмі.

Е.В. Долгая, Н.Х. Погорелая, Е.С. Богорад-Кобельская, Н.М. Жолобак, С.О. Занога, С.А. Ляхов, И.С. Магура.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛА НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ

Методом клеточного электрофореза исследовали ранние изменения электрофоретической подвижности (ЭФП) Т-лимфоцитов селезенки мыши, индуцированные структурными аналогами амиксина дигидрохлоридом 4,4'-бис-[2-(диэтиламино)этокси]дифенила (соединение 1) и дигидрохлоридом 2-метоксикарбонил-4,4'-бис-[2-(диэтиламино)этокси]дифенила (соединение 2). В интервале 0–2 ч все соединения дозозависимо увеличивали абсолютное значение ЭФП по сравнению с контролем. Эти изменения были однотипны, а различия носили только количественный характер. В интервале 2–4 ч в присутствии амиксина или соединения 1 абсолютное значение ЭФП вновь увеличивалось, а в присутствии соединения 2 - уменьшалось. Показано, что противоположная направленность эффектов указанных соединений обусловлена тем, что амиксин и соединение 1 индуцируют, а соединение 2 не индуцирует продукцию интерферона в Т-лимфоцитах *in vitro*. Полученные результаты важны для понимания механизмов иммуномодулирующего эффекта амиксина и его структурных аналогов.

Ключевые слова: амиксин, производные дифенила, индукторы интерферона, Т-лимфоциты, электрофоретическая подвижность.

O.V. Dolga, N.Kh. Pogorela, O.S. Bogorad-Kobelska, N.M. Zholobak, S.O. Zanoza, S.A. Lyakhov, I.S. Magura

EFFECTS OF DIPHENYL DERIVATIVES ON ELECTROPHORETIC MOBILITY OF MURINE T LYMPHOCYTES

The early changes of electrophoretic mobility (EPM) of murine T lymphocytes induced by structural analogues of amixine - dihydrochloride 4,4'-bis-[2(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 1) and dihydrochloride 2-methoxycarbonyl-4,4'-bis-[2(diethylamino)ethoxy]diphenyl (compound 2) were studied by electrophoresis technique. During the interval 0-2 hours all compounds increased the absolute values of EPM in comparison with control. These changes were of the same kind - distinctions were quantitative. Amixine and compound 1 during the interval 2-4 hours additionally increased the EPM. The compound 2, on the contrary, decreased the EPM. It was shown that the opposite effects of the aforementioned compounds were caused by the fact that amixine and compound 1 induce, and compound 2 does not induce IFN production in T lymphocytes *in vitro*. The results of our experiments are important for understanding of the mechanisms of immunomodulating effect of amixine and its structural analogues.

Key words: amixine, diphenyl derivatives, interferon inducers, T lymphocytes, electrophoretic mobility.

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

D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute National Academy of Sciences of Ukraine, Odesa

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Богатський О.В., Грень А.І., Литвинова Л.О., Лемпарт Г.В. Про синтез 2,7-бис-[2-(диетиламіно)етокси]-флуорен-9-ону // Доп. АН УРСР. Сер. Б. – 1976. – № 7. – С. 610–612.
2. Гринштейн С.В., Кост О.А. Структурно-функціональні особливості мембранних білків // Успехи біол. хімії. – 2001. – 41. – С. 77–104.
3. Долга О.В., Жолобак Н.М., Співак М.Я., Магура І.С. Вплив α/β -інтерферону на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів миші // Фізіол. журн. – 2009. – 55, № 1. – С. 7–11.
4. Долгая Е.В., Крылова И.В., Рожманова О.М. Изменение электрофоретической подвижности Т-лимфоцитов мыши под влиянием конканавалина А // Биол. мембраны. – 1991. – 8, № 7. – С. 755–762.

5. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2005. – 368 с.
6. Ляхов С.А., Литвинова Л.А. Механизмы противовирусной активности Амиксина (обзор литературы) 1. Общая характеристика и индукция интерферона // Сучасні інфекції. – 2007. – № 4. – С. 99–105.
7. Ляхов С.А., Литвинова Л.А. Механизмы противовирусной активности Амиксина (обзор литературы) (Продолжение) // Там само. – 2008. – № 1. – С. 82–86.
8. Ляхов С.А., Литвинова Л.А. Механизмы противовирусной активности амиксина (обзор литературы) 2. Противовирусная активность и влияние на некоторые биохимические процессы // Там само. – 2008. – № 2. – С.112–116.
9. Ляхов С.А., Литвинова Л.А. Механизмы противовирусной активности амиксина (обзор литературы) 2. Противовирусная активность и влияние на некоторые биохимические процессы // Там само. – 2008. – № 3. – С. 89–95.
10. Петров Р.В., Атауллаханов Р.И. Биохимия мембран. Клеточные мембраны и иммунитет. – М.:Высш. школа, 1991. – 144 с.
11. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток. – В кн.: Лимфоциты. Методы / Ред. Дж. Клаус, пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – С. 15–68.
12. Шай Д.С., Жолобак Н.М., Ляхов С.А., Мальцев Г.В., Фернандес де Ривас С.О., Литвинова Л.О., Андронаті С.А., Співак М.Я. Інтерферогенна активність аналогів аміксину і похідних дифенілу // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 5. – С. 59–64.
13. Шай Д.С., Жолобак Н.М., Співак М.Я. Стан системи інтерферону у мишей, оброблених аміксином та його аналогами // Імунологія та алергологія. – 2007. – № 1. – С. 22–23.
14. Эккерт Р. Разделение клеток иммунной системы. – В кн.: Иммунологические методы / Ред. Фримель Г., пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – С. 226–253.
15. Alcaro S., Arena A., Di Bella R., Neri S., Ottana R., Ortuso F., Pavone B., Vigorita M.G. 9-fluorenon-4-carboxamides: synthesis, conformational analysis, anti-HSV-2, and immunomodulatory evaluation. Note II // ARKIVOC – 2004. – **5** – P. 334–348.
16. Alcaro S., Arena A., Di Bella R., Neri S., Ottana R., Ortuso F., Pavone B., Trincone A., Vigorita M.G. Biocatalysed synthesis of β -O-glucosides from 9-fluorenon-2-carbohydroxyesters. Part 3: IFN-inducing and anti-HSV-2 properties // Bioorganic & Med. Chem. – 2005. – **13**, № 10. – P. 3371–3378.
17. Arena A., Arena N., Ciurleo R., De Gregorio A., Maccari R., Ottana R., Pavone B., Tramice A., Trincone A., Vigorita M.G. 2/4-substituted-9-fluorenon-2-carboxamides as potential immunomodulators and anti-herpes simplex virus-2 agents. Part 5 // Europ. J. Med. Chem. – 2008. – **43**, № 12. – P. 2656–2664.
18. Bogorad-Kobelska O.S., Zholobak N.M., Dolga O.V. Maltzev G.V., Lyakhov S.A., Andronati S.A., Spivak M.Ya. Diphenyl derivatives: cytotoxicity, antiviral and IFN-inducing activities in vitro // IJBM. – 2011. – **1**, №3. – P. 153–157.
19. Borden E.C., Sen G.C., Uze G., Silverman R.H., Ransohoff R.M., Foster G.R., Stark G.R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine // Nature Rev. – 2007. – **6**, December. – P. 975–990.
20. Bredehorn T., Duncker G.I. Tilorone-induced functional changes in the rat retina // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. – 2000. – **216**, № 4. – P. 219–222.
21. Briggs C.A., Schrimpf M.R., Anderson D.J., Gubbins E.J., Gronlien J.H., Hakerud M., Ween H., Thorin-Hagene K., Malysz J., Li J., Bunnelle W.H., Gopalakrishnan M., Meyer M.D. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist properties of tilorone and related tricyclic analogues // Brit. J. Pharmacol. – 2008. – **153**, №5. – P. 1054–1061.
22. Chandra P. Tilorone hydrochloride: the drug profile // Top. Curr. Chem. – 1977. – **72**, № 1. – P. 125–148.
23. Dolga O.V., Pogorela N. Kh., Bogorad-Kobelska O.S., Andronati S.A., Magura I.S. Effect of amixine on electrophoretic mobility of murine T lymphocytes // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2011. – **2**, № 4. – P. 355–360.
24. Feldmann M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease // J. Clin. Invest. – 2008. – **118**, № 11. – P. 3533–3536.
25. Fischer J., Lüllmann H., Lüllmann-Rauch R. Drug-induced lysosomal storage of sulphated glycosaminoglycans // General. Pharmacol. The Vascular System. – 1996. – **7**, № 8. – P. 1317–1324.
26. Goldenberg N.M., Steinberg B.E. Surface charge: a key determinant of protein localization and function // Cancer Res. – 2010. – **70**, № 4. – P.1277–1280.
27. James A.M. Molecular aspects of biological surfaces // Chem. Soc. Rev. – 1979. – **8**, № 3. – P. 389–418.
28. Kruger R.F., Mayer G.D. Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent // Science. – 1970. – **169**, № 951. – P.1213–1214.
29. Latorre R., Labarca P., Naranjo D. Surface charge effects on ion conduction in ion channels // Methods Enzymol. – 1992. – **207**. – P.471–501.
30. Levin R.H., Albrecht W.L. Tilorone and related bis-basic substituted polycyclic aromatic and heteroaromatic compounds // Prog. Med. Chem. – 1981. – № 18. – P. 135–190.
31. Maher P., Singer S.J. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphilic molecules // Biochemistry. – 1984. – **23**, № 2. – P. 232–240.
32. Mironov S.L., Dolgaya E.V. Surface charge of mammalian neurones as revealed by microelectrophoresis // J. Memb. Biol. – 1985. – **86**, № 2. – P. 197–202.
33. Prokopek M. The tilorone-induced mucopolysaccharidosis in rats: Biochemical investigations // Biochem. Pharmacol. – 1991. – **42**, № 11. – P. 2187–2191.
34. Ratan R.R., Siddiq A., Aminova L., Langley B., McConoughy S., Karpisheva K., Lee H.H., Carmichael T., Kornblum H., Coppola G., Geschwind D.H., Hoke A., Smirnova N., Rink C., Roy S., Sen C., Beattie M.S., Hart

R.P., Grumet M., Sun D., Freeman R.S., Semenza G.L., Gazaryan I. Small molecule activation of adaptive gene expression: tilorone or its analogs are novel potent activa-

tors of hypoxia inducible factor-1 that provide prophylaxis against stroke and spinal cord injury // Ann. NY Acad. Sci. – 2008. – **1147** – P. 383–394.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ;
Фіз.-хім. ін-т ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса
E-mail: dolgaya@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 23.10.2012

А.М. Пузиренко, І.С. Чекман, Т.П. Куфтирева, Н.О. Горчакова

Вплив амлодипіну та бісопрололу на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

Блокатори кальцієвих каналів та β_1 -адреноблокатори – одні з основних груп антигіпертензивних препаратів. Але на сьогоднішній день їх здатність проявляти протекторний вплив на клітини органів-мішеней вивчена недостатньо. У нашому дослідженні амлодипін вводили у дозі 10 мг/кг, бісопролол – 25 мг/кг через орогастральний зонд щурам зі спонтанною артеріальною гіпертензією протягом 3 міс. За допомогою електронної мікроскопії проведено якісну та кількісну оцінку ультраструктурних особливостей міокарда щурів. Амлодипін значно покращував ультраструктуру міокарда, усував надмірне скорочення міофібрил. Він також сприяв злиттю мітохондрій, яке має компенсаторний характер на тлі гарної збереженості мітохондріальної ультраструктури. Ще однією особливістю дії амлодипіну є значне збільшення числа кровоносних капілярів з ознаками активації біосинтетичних процесів в ендотеліальних клітинах. Бісопролол суттєво зменшував прояви надмірного скорочення міофібрил, але ознаки дистрофічно-деструктивних процесів у міофібрилах та мітохондріях кардіоміоцитів залишалися. Покращувався стан ендотеліальних клітин, але функціональна активність в цих клітинах не посилювалася. Сумісне застосування двох антигіпертензивних препаратів – амлодипіну та бісопрололу призводило до кращого відновлення міофібрил, ніж при їх окремому використанні, тоді як вплив на мітохондрії відмічався аналогічний щодо групи щурів, які отримували бісопролол, тобто гірший, ніж при монотерапії амлодипіном. Не виявлено доцільності комплексного застосування цих препаратів і за станом кровоносних мікросудин, хоча їх кількість зростає на фоні лікування амлодипіном і бісопрололом у порівнянні з щурами зі спонтанною артеріальною гіпертензією, але значно меншою мірою, ніж при монотерапії амлодипіном. Така протекторна дія амлодипіну (менш істотна бісопрололу) на клітини серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією може стати додатковим фактором у лікуванні гіпертонії, особливо коли вона поєднується з виникаючими патологічними змінами в серці.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, амлодипін, бісопролол, ультраструктура кардіоміоцита, мітохондрії, кровоносні судини.

ВСТУП

Тісний анатомо-функціональний зв'язок різних систем організму і складні механізми їх регуляції сприяють розвитку метаболічних, функціональних і структурних порушень в органах при артеріальній гіпертензії. Це зумовлює необхідність комплексного підходу до підбору для антигіпертензивної терапії ефективних серцево-судинних засобів, які будуть не тільки достатньою мірою знижувати підвищений артеріальний тиск, а й

проявляти цитопротекторні властивості. У зв'язку з вищезазначеним важливим завданням є пошук антигіпертензивних препаратів з цитопротекторною дією.

В останні роки за частотою призначень при лікуванні артеріальної гіпертензії блокатор кальцієвих каналів III покоління амлодипін посідає одне з провідних місць, що зумовлено його ефективною терапевтичною дією як антигіпертензивного засобу [5, 19]. Також, незважаючи на широку дискусію щодо β -адреноблокаторів, бісопролол залишається

© А.М. Пузиренко, І.С. Чекман, Т.П. Куфтирева, Н.О. Горчакова

не менш популярним препаратом серед групи антигіпертензивних засобів [4, 24]. Проте наразі не проводилося детальних досліджень щодо впливу цих медикаментів на ультраструктуру серця з морфометричним аналізом отриманих даних [10, 11, 20–22].

Метою нашого дослідження було вивчення дії амлодипіну та бісопрололу на ультраструктуру міокарда у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією та проведення морфометричного аналізу мітохондрій кардіоцитів.

МЕТОДИКА

У дослідях використовували субстанції амлодипіну (“Glochem Industries Limited”, Індія) та бісопрололу (ЗАТ НВЦ «Боршагівський ХФЗ», Україна). Щури лінії Вістар-Кіото з нормальним артеріальним тиском та щури зі спонтанною артеріальною гіпертензією (САГ) [3], обох статей були надані віварієм Національного медичного університету. Тварин утримували у приміщенні з постійною температурою (23–25°C) і достатнім природним освітленням. Вони мали вільний доступ до стандартного раціону харчування та води. Всі експериментальні дослідження проводили з дотриманням етичних норм (Directive 86/609/EEC) та з дозволу етичної комісії Національного медичного університету (Експертний висновок № 62 від 05.IV.2012).

Дослідні тварини були розділені на 5 груп (по 7 щурів у кожній групі): дві контрольні та три дослідні. До I контрольної групи ввійшли щури з нормальним артеріальним тиском, до II – щури із САГ. Тварини дослідних груп отримували 10 мг/кг амлодипіну (III група), 25 мг/кг бісопрололу (IV група) і їх комбінацію (V група). Препарати вводили один раз на добу через орогастральний зонд протягом 3 міс. Носієм (розчинником) для всіх препаратів була вода [1]. Після ентерального введення досліджуваних речовин, тварин до їжі допускали через 4 год.

Умови досліджень визначали застосу-

ванням препаратів у клінічній практиці, а також особливостями їх фармакокінетики та коефіцієнта видової чутливості. Вибір доз амлодипіну та бісопрололу базувався на даних попередніх пошукових досліджень [6, 9, 14, 16, 17]. Лімітуючим фактором при виборі дози для цих препаратів була максимальна доза речовин четвертого класу токсичності при внутрішньошлунковому введенні.

Для електронно-мікроскопічних досліджень матеріалом був міокард лівого шлуночка серця, який отримували після введення щурів у наркоз за допомогою кетаміну. Досліджувані фрагменти міокарда щурів спочатку фіксували за допомогою 2,5%-го розчину глутаральдегіду в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) протягом 1 год. Потім зразки промивали тричі 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4). Наступний крок полягав у фіксації матеріалу 1%-м розчином чотириокису осмію у тому самому буферному розчині впродовж години. Зневоднювали зразки у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 100 %) та ацетоном, з наступним зануренням у суміш епону та аралдиту, згідно з загальноприйнятою методикою [2]. Напів- та ультратонкі зрізи з блоків отримували на ультратомах LKB (Швеція) та Reichert (Австрія). Ультратонкі зрізи контрастували 2%-м розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Препарати міокарда досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

Морфометричні дослідження проведені за допомогою програми “ОРГАНЕЛА” на напівавтоматичному пристрої обробки графічних зображень. У кожній дослідній групі обробці підлягали 30 зон міокарда при збільшенні в 20–27 тисяч разів. Визначали об’ємну та кількісну щільність мітохондрій у цитоплазмі каріоміоцитів, площу зрізу цих органел.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою статистичної програми MS Excel 97. Розраховували середнє арифметичне значення (M), середнє квадратичне відхилення, похибку середньої арифметичної (m); отримані результати ви-

ражали у вигляді $M \pm m$. Вірогідність різниці між кількісними значеннями двох вибірко-вих сукупностей оцінювали за критерієм t Стьюдента при нормальному розподілі ознак. Відмінності між показниками, що порівнювалися, вважали достовірними при рівні значимості $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Електронно-мікроскопічний аналіз отриманих результатів показав, що ультраструктурна організація міокарда лівого шлуночка щурів лінії Вістар-Киото не має ознак порушень. Кардіоміоцити містять міофібрили, організовані у типові саркомери, де розрізняються диски А та І, які в сусідніх міофібрилах розташовуються приблизно на одному рівні. Мітохондрії овальної або витягнутої форми, з чітко структурованою зовнішньою мембраною, матриксом помірної електронної щільності та кристами, розташованими переважно паралельно.

Морфометричний аналіз показав, що мітохондрії займають $30,3 \pm 2,9\%$ об'єму кардіоміоцитів (таблиця, рис. 1). Їх кількісна щільність становить $(51,1 \pm 5,20) \cdot 10^{-2}/\text{мкм}^3$ при середній площі зрізу $(41,3 \pm 2,04) \cdot 10^{-2} \text{ мкм}^2$.

Кровоносні мікросудини здебільшого мають розкритий просвіт, куди виступає ядровмісна зона ендотеліоцитів, периферичні ділянки цих клітин помірної товщини, містять переважно мікропіноцитозні пухирці.

Основною відмінністю міокарда лівого шлуночка серця щурів із САГ, від тварин з нормальним артеріальним тиском на електронно-мікроскопічному рівні є мозаїчність ультраструктури кардіоміоцитів, що зумовлено різним ступенем і поширеністю пошкоджень, які стосуються, в першу чергу, скоротливого та енергетичного апаратів цих клітин.

Лише поодинокі кардіоміоцити містять міофібрили без деструктивних ознак. Спостерігається лізис міофіламентів, який іноді поширюється на весь саркомер. Міофібрили значною мірою скорочені, внаслідок чого в саркомерах не розрізняються диски А та І, а Z-лінії різко зближені (рис. 2,а).

Порушення скоротливих структур міокарда корелюють зі змінами вставних дисків, до яких вони кріпляться. В одних кардіоміоцитах спостерігається розширення щілини, внаслідок розходження плазматичних мембран сусідніх кардіоміоцитів, в інших – ділянки плазмалем закручуються, в них змінюється порядок розташування десмосомальних і щілинних з'єднань.

З порушеннями скоротливості кардіоміоцитів можуть бути також пов'язані зміни, що відбуваються з системою Т-трубочок і саркоплазматичною сіткою, взаємодія яких зумовлює вивільнення та акумуляцію кальцію в кардіоміоцитах і чергування скорочення та розслаблення міофіламентів. У щурів із САГ каналця цієї системи повсюдно розширені, Т-трубочки глибоко проникають у кардіоміоцит, що і викликає, очевидно, підвищене

Морфометричні показники, що характеризують зміни мітохондрій у кардіоміоцитах щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією та під впливом курсового (3 міс) введення амлодипіну та бісопрололу ($M \pm m$; $n=30$)

Групи тварин	Об'ємна щільність, %	Кількісна щільність, $10^{-2}/\text{мкм}^3$	Площа зрізу, 10^{-2} мкм^2
Контроль 1	$30,3 \pm 2,9$	$51,1 \pm 5,2$	$41,3 \pm 2,04$
Контроль 2	$21,16 \pm 2,47^*$	$59,21 \pm 10,63$	$31,96 \pm 1,53^*$
Тварини, яким вводили			
амлодипін	$27,46 \pm 1,76^{**}$	$21,38 \pm 4,36^{*,**}$	$81,16 \pm 7,69^{*,**}$
бісопролол	$24,46 \pm 1,45^*$	$55,05 \pm 3,90$	$35,07 \pm 1,90^*$
амлодипін і бісопролол	$22,41 \pm 2,64^*$	$65,91 \pm 10,13$	$32,93 \pm 1,89^*$

* вірогідність відносно контрольної групи 1, ** відносно контрольної групи 2.

вивільнення кальцію і, відповідно, посилене скорочення міофібрил.

При артеріальній гіпертензії мітохондрії в кардіоміоцитах лівого шлуночка часто набувають хвилястого вигляду через інвагінації зовнішньої мембрани. подекуди спостерігається локальний лізис зовнішніх мембран, який іноді поширюється на всю мітохондрію, так що в цитоплазмі залишаються одні внутрішні мембрани – кристи (див. рис. 2,б).

Морфометричний аналіз в свою чергу показав, що кількість мітохондрій у 1 мкм^3 не відрізняється від такої у здорових тварин (див. таблицю). При цьому їхня об'ємна щільність вірогідно менша, що відбувається внаслідок зниження середньої площі зрізу. Водночас аналіз розподілу мітохондрій за площею показав, що в кардіоміоцитах щурів із САГ на фоні превалюючого збільшення числа дрібних мітохондрій з'являється невелика кількість крупних органел, що не було

притаманно тваринам з нормальним артеріальним тиском (див. рис. 1). А той факт, що найбільш крупні мітохондрії набряклі, дає підставу розглядати таке збільшення розміру цих органел не як компенсаторну гіпертрофію, а як прояв дистрофічних процесів.

Амлодипін значною мірою нормалізує ультраструктуру міокарда, але повністю не відновлює його. Так, цей антигіпертензивний препарат запобігає посиленню скоротливості міофібрил, а збереженість зовнішніх і внутрішніх мембран мітохондрій значно краща, ніж у щурів із САГ (рис. 3,а). Більш повний опис цієї частини нашого дослідження викладено у нашій праці [18].

Результати проведеного морфометричного аналізу (див. таблицю, рис. 1) дають підставу вважати, що амлодипін викликає злиття мітохондрій, яке, враховуючи добру збереженість їхньої ультраструктури, має компенсаторну спрямованість на фоні вазо-

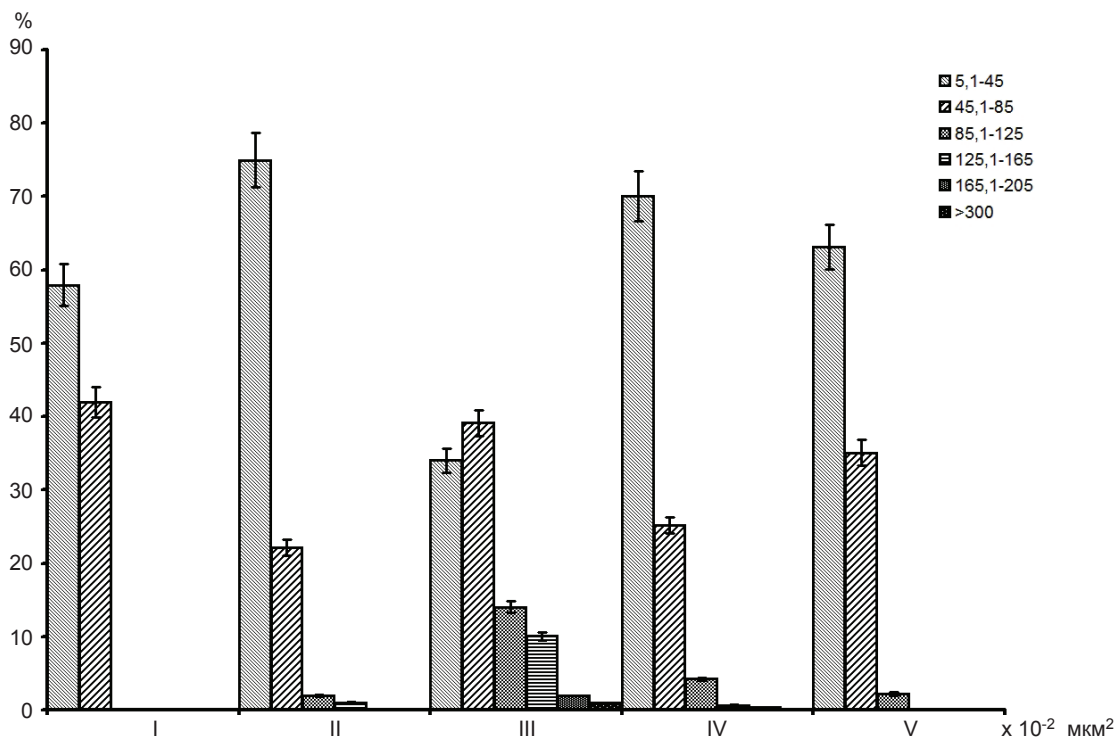


Рис. 1. Розподіл мітохондрій за площею у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією та під впливом амлодипіну і бісопрололу: I – щури з нормальним артеріальним тиском, II – щури з гіпертензією, III–IV – щури, яким вводили амлодипін і бісопролол і їх комбінацію відповідно. За віссю абсцис – площа зрізу мітохондрій (10^{-2} мкм^2); за віссю ординат – кількість мітохондрій (%). Різною штриховкою відображені групи мітохондрій залежно від діапазону величини площі

дилатації коронарних артерій і покращення перфузії міокарда. Таке злиття мітохондрій може пояснюватися активацією мітофузинів їх зовнішніх і внутрішніх мембран під впливом ефектів, які може викликати амлодипін [7, 8, 15].

Однією із особливостей дії амлодипіну є значне збільшення кількості кровоносних капілярів (див. рис. 3,б). У цитоплазмі ендотеліальних клітин цих гемокапілярів поширені рибосоми, полісоми, каналці ендоплазматичної сітки, ядра рівномірно заповнені хроматином, що є ознакою їх біосинтетичної активності (див. рис. 3,в). Невеликі діаметри, розкриті просвіти, близьке розташування капілярів свідчать про їх активне новоутворення, що відновлює зменшене при артеріальній гіпертензії число цих мікросудин. Такий ангиогенез, певно, зумовлений нормалізуючим

впливом амлодипіну на вміст синтази оксиду азоту та підвищенням функціональної активності ендотеліоцитів, що значно страждає на фоні підвищеного артеріального тиску. А як ми знаємо, підвищення функціональної активності ендотеліоцитів – це основний момент для ініціації міграції та поділу даних клітин [12, 13, 23, 25]. Ці новоутворені судини можуть сприяти зменшенню пошкоджень тканин, що пов'язані з недостатністю кровопостачання.

Курс лікування бісопрололом значною мірою нормалізує ультраструктуру міокарда, але повністю не відновлює його. Значна кількість кардіоміоцитів містить міофібрили, організовані у типові саркомери однакової довжини. Разом з тим спостерігаються ділянки розходжень міофіламентів та часткова або навіть повна відсутність одного-двох сарко-

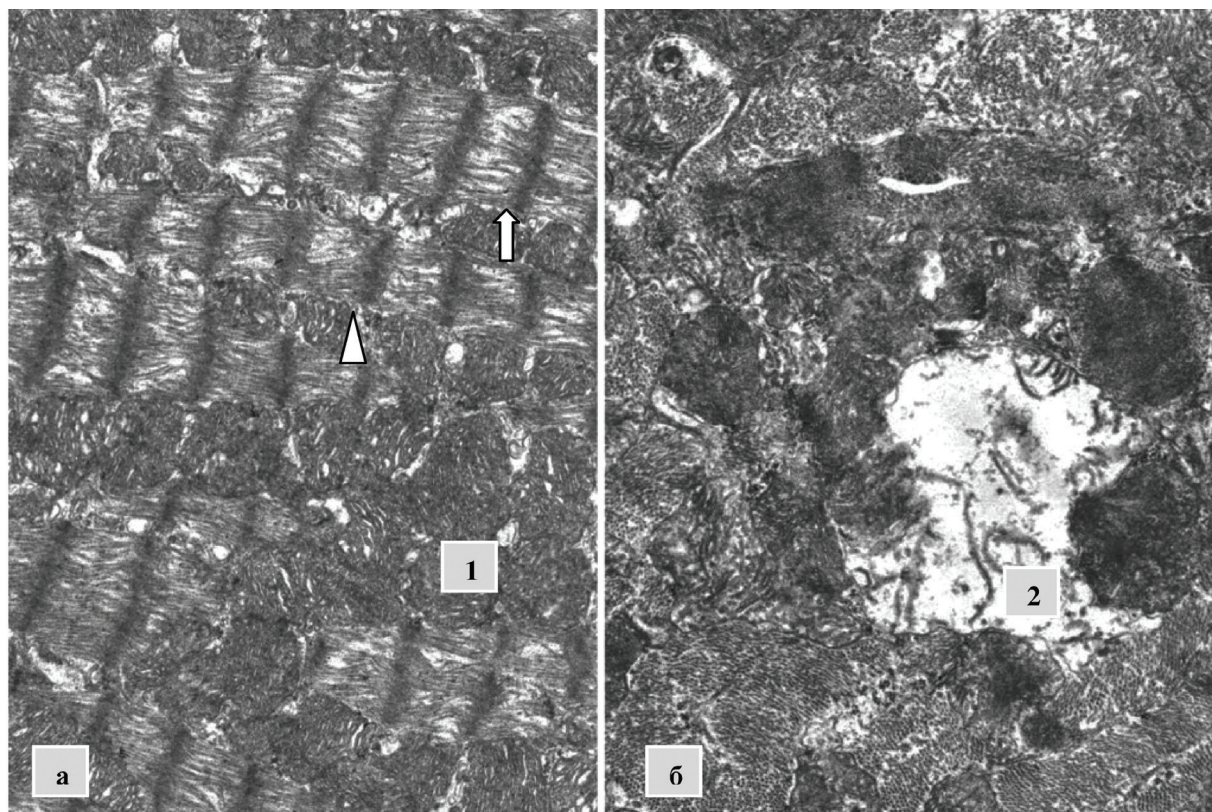


Рис. 2. Фрагменти міокарда лівого шлуночка серця шурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією (електронно-мікроскопічні фото): а – перескорочені міофібрили (Δ); ділянки розходження (\uparrow) міофібрил; електронно-щільні (1) мітохондрії у кардіоміоцитах. Збільшення 19500. На б – набрякла мітохондрія з залишками крист (2). Збільшення 16000

мерів у міофібрилах. Відмічаються крім того міофібрили з ознаками нерівномірного скорочення, але надмірного скорочення структур не спостерігається. Відсутність останніх позитивно відображується і на вставних дисках, де зникають ділянки розходження сусідніх плазмолем (рис. 4,а,б).

T-трубочки та каналці саркоплазматичної сітки без суттєвих порушень і не відрізняються від цих же структур у щурів з нормальним артеріальним тиском. Мітохондрії мають переважно витягнуту форму. Слід однак відмітити, що зовнішня мембрана, як і у щурів із САГ, яких не лукували, подекуди не зберігає своєї цілісності, але поширеність таких органел суттєво менша після лікування бісопрололом (див. рис. 4,б).

Морфометричний аналіз показав, що при лікуванні бісопрололом кількісна щільність, як і об'ємна щільність і площа зрізу мітохондрій залишаються статистично однотипними з показниками у щурів без лікування (див. таблицю). Також у цих групах відсутня різниця в розподілі мітохондрій за площею (див. рис. 1). Разом з тим зіставлення результатів якісного та кількісного аналізу свідчить про різну спрямованість процесів в мітохондріях щурів в цих групах. Відсутність органел з ознаками лізису та набряку дає підставу вважати, що після курсу лікування бісопрололом у кардіоміоцитах розвиваються компенсаторні процеси, тоді як при артеріальній гіпертензії – деструктивно-дистрофічні процеси. Крім того, майже вдвічі більший, ніж у щурів з

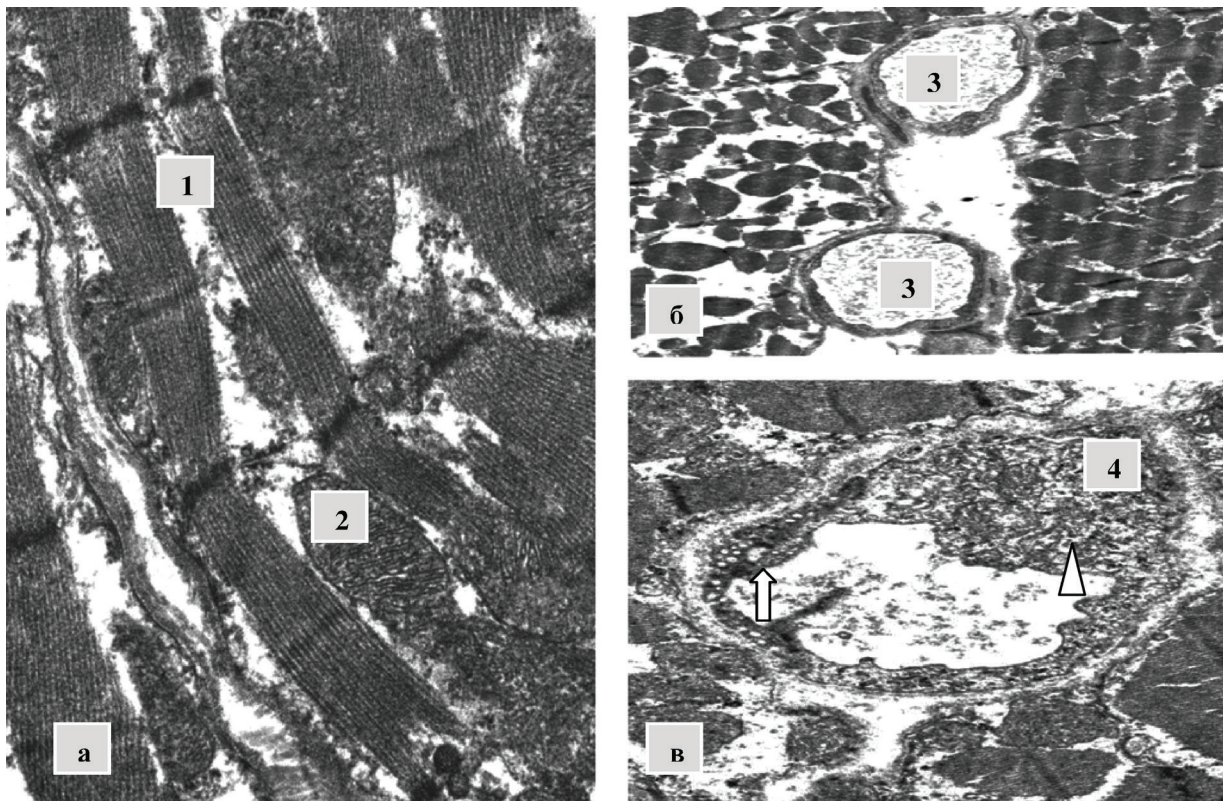


Рис. 3. Фрагменти міокарда лівого шлуночка серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією після лікування амлодипіном (електронно-мікроскопічні фото): а – міофібрили без ознак перескорочення (1), мітохондрії (2) в кардіоміоцитах. Збільшення 40000. На б – кровеносні капіляри з розширеними просвітами (3). Збільшення 8000. На в – мітохондрії (4), каналця ендоплазматичної сітки (Δ) в ендотеліоциті помірної електронної щільності. Вакулярні структури (↑) в електроннощільному ендотеліоциті. Збільшення 26000

гіпертензією відсоток найдрібніших мітохондрій (розміром до 7 мкм), може свідчити про спрямованість клітин до компенсаторного новоутворення мітохондрій, на фоні зменшеної енергопотреби кардіоміоцитів, що розвивається при негативному іно- та хронотропному впливі бісопрололу на серце. Ендотеліальні клітини переважно без виразних пошкоджень, що в цілому не відрізняє їх від ендотеліоцитів у здорових тварин.

Комбінована дія двох гіпотензивних препаратів – бісопрололу та амлодіпіну, як і їх окреме застосування, позитивно впливає на скоротливу та енергетичну функцію кардіо-

міоцитів. Так, не спостерігається надмірного скорочення міофібрил, Z-лінії сусідніх саркомерів розташовуються переважно на одному рівні. Разом з тим все ж залишаються ділянки розходження та лізису міофібрил (рис. 5,а).

Мітохондрії дещо різняться за ультраструктурою у різних кардіоміоцитах. Частина з них відновлює цілісність зовнішніх мембран, мають матрикс середньої електронної щільності та помірну кількість крист (див. рис. 5,б). В інших мітохондріях зовнішня мембрана не завжди візуалізується або збережена лише на окремих ділянках (див. рис. 5,в).

Морфометричний аналіз, в свою чергу,

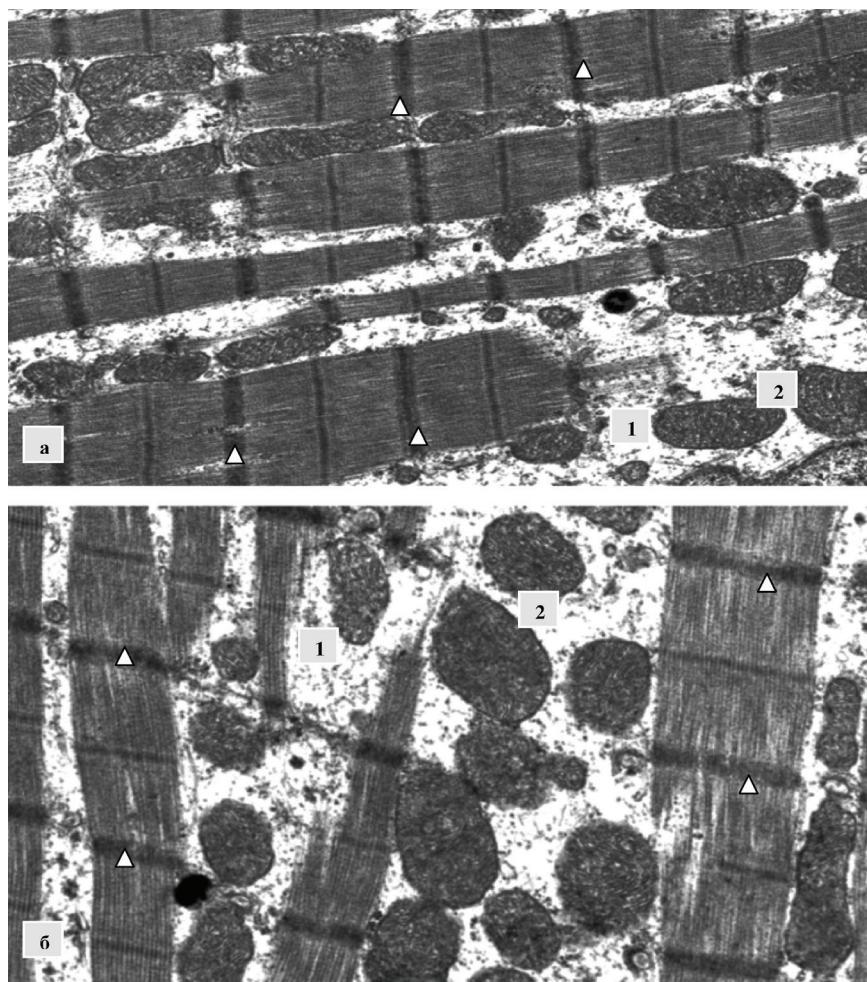


Рис. 4. Фрагменти міокарда лівого шлуночка серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією після лікування бісопрололом (електронно-мікроскопічні фото): а, б – Z-лінії (Δ) у типових саркомерах, ділянки лізису міофібрил (1), мітохондрії (2). Збільшення 22000

показав, що кількість мітохондрій в одиниці об'єму цитоплазми кардіоміоцитів вірогідно не змінюється порівняно з цим показником як у тварин з нормальним артеріальним тиском, так і у щурів із САГ (див. таблицю). Водночас їхня об'ємна щільність, не відрізняється від такої у тварин із САГ і залишається вірогідно меншою, ніж у здорових тварин. Причиною такого розподілу є вірогідне зменшення середньої площі мітохондрій, у порівнянні з контролем. І хоча ці морфометричні показники мітохондрій у тварин, яких лікували і яких не лікували не відрізняються, аналіз

розподілу таких органел за площею свідчить про відсутність гігантських мітохондрій після сумісного застосування бісопрололу з амлодипіном, що наявні у щурів із САГ (див. рис. 1).

Також, порівнюючи характер дії бісопрололу та амлодипіну окремо та їх комбінації на кількісні показники мітохондрій, можна бачити, що зміни при комплексному лікуванні однотипні з монотерапією бісопрололом, тоді як амлодипін викликав значне збільшення середньої площі мітохондрій при зменшенні їх кількості.

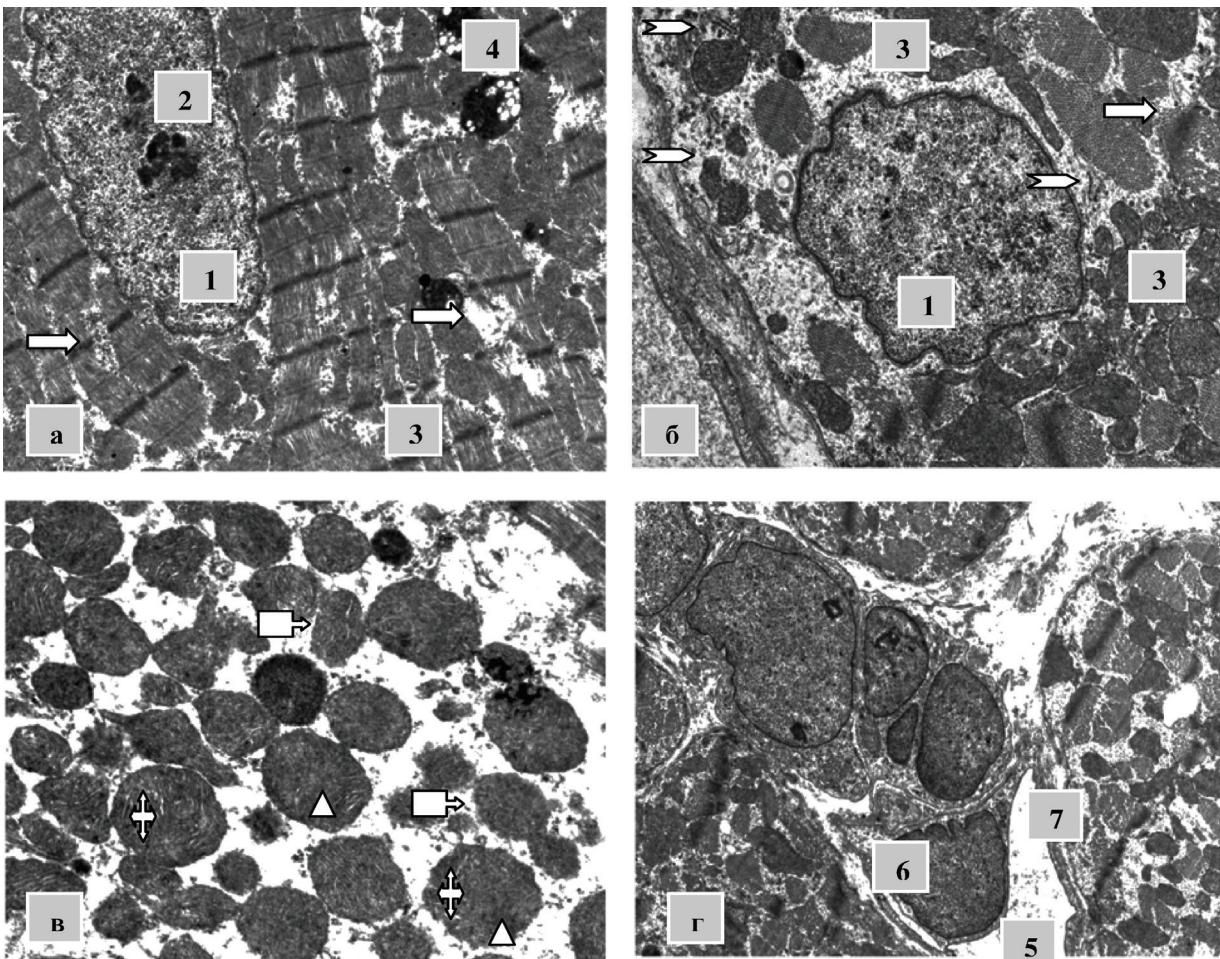


Рис. 5. Фрагменти міокарда лівого шлуночка серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією після лікування амлодипіном з бісопрололом (електронно-мікроскопічні фото): а, б – ядро (1), ядерця (2), мітохондрії (3), ділянки лізису міофібрил (⇔), каналця зернистої ендоплазматичної сітки (⊳), залишкові тільця (4) в кардіоміоцитах. Збільшення 19500. На в – неповністю відновлена зовнішня мембрана (⊕), кристи (⊕), матрикс (Δ) у мітохондріях. Збільшення 28000. На г – просвіт кровоносного капіляра (5), ядро (6), стоншені периферичні ділянки ендотеліоцитів (7). Збільшення 10000

Число кровоносних мікросудин у міокарді збільшується у порівнянні з щурами, яких не лікували, але не такою мірою, як при монотерапії амлодипіном. Просвіти мікросудин під сумісним впливом амлодипіну з бисопрололом подекуди відкриті, а інколи звужені (див. рис. 5,г).

ВИСНОВКИ

1. Курсове, протягом трьох місяців, введення амлодипіну призводить до значного покращення ультраструктури міокарда. Цей антигіпертензивний препарат усуває перекорочення міофібрил. Він також сприяє злиттю мітохондрій, яке носить компенсаторний характер на тлі гарної збереженості мітохондріальної ультраструктури. Ще однією особливістю амлодипіну є значне збільшення числа кровоносних капілярів, з ознаками активації біосинтетичних процесів в ендотеліальних клітинах.

2. Курсове, протягом 3 міс, введення бисопрололу призводить до зменшення надмірного скорочення міофібрил, але ознаки дистрофічно-деструктивних процесів у міофібрилах і мітохондріях кардіоміоцитів залишалися. Також покращувався стан ендотеліальних клітин, але посилення функціональної активності в цих клітинах не простежувалося.

3. Сумісне застосування двох антигіпертензивних препаратів – амлодипіну та бисопрололу призводило до кращого відновлення міофібрил, ніж при їх окремому використанні, тоді як вплив на мітохондрії відмічався аналогічний щодо групи щурів, які отримували бисопролол, тобто гірший, ніж при монотерапії амлодипіном. Не виявлено доцільності комплексного застосування цих препаратів і за станом кровоносних мікросудин, число яких на фоні лікування амлодипіном і бисопрололом, хоча і збільшено у порівнянні зі щурами із САГ, але значно меншою мірою, ніж при монотерапії амлодипіном.

А.Н. Пузыренко, И.С. Чекман, Т.П. Куфтырева, Н.А. Горчакова

ВЛИЯНИЕ АМЛОДИПИНА, БИСОПРОЛОЛА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МИОКАРДА КРЫС СО СПОНТАННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Блокаторы кальциевых каналов и β_1 -адреноблокаторы – одни из основных групп антигипертензивных препаратов. Но, на сегодняшний день их способность оказывать протекторное влияние на клетки органов-мишеней изучена недостаточно. В нашем исследовании амлодипин вводили в дозе 10 мг/кг, бисопролол – 25 мг/кг через орогастральный зонд крысам со спонтанной артериальной гипертензией в течение 3 мес. С помощью электронной микроскопии проведена качественная и количественная оценка ультраструктурных особенностей миокарда крыс. Амлодипин значительно нормализовал ультраструктуру миокарда, устранял чрезмерное сокращение миофибрилл. Он также способствовал слиянию митохондрий, которое носит компенсаторный характер на фоне хорошей сохранности митохондриальной ультраструктуры. Еще одной особенностью действия амлодипина является значительное увеличение числа кровеносных капилляров с признаками активации биосинтетических процессов в эндотелиальных клетках. Бисопролол существенно уменьшал проявления чрезмерного сокращения миофибрилл, но признаки дистрофически-деструктивных процессов в миофибриллах и митохондриях кардиомиоцитов сохранялись. Также улучшалось состояние эндотелиальных клеток, но стимуляция функциональной активности в этих клетках не прослеживалась. Совместное применение двух антигипертензивных препаратов – амлодипина и бисопролола приводило к лучшему восстановлению миофибрилл, чем при их раздельном использовании, тогда как влияние на митохондрии отмечалось аналогичное, что и в группе крыс, получавших бисопролол, то есть хуже, чем при монотерапии амлодипином. Не выявлено целесообразности комплексного применения этих препаратов и по влиянию на состояние кровеносных микрососудов, хотя их количество увеличивается на фоне лечения амлодипином и бисопрололом по сравнению с крысами со спонтанной артериальной гипертензией, но значительно в меньшей степени, чем при монотерапии амлодипином. Такое протективное действие амлодипина (меньше бисопролола) на клетки сердца крыс со спонтанной артериальной гипертензией может стать дополнительным фактором в лечении гипертонии, особенно когда она сочетается с развившимися патологическими изменениями в сердце.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, амлодипин, бисопролол, ультраструктура кардиомиоцита, митохондрии, кровеносные сосуды.

**A.M. Puzyrenko, I.S. Chekman, T.P. Kufyryeva,
N.O. Gorchakova**

**THE EFFECT OF AMLODIPINE, BISOPROLOL
ON THE MYOCARDIAL ULTRASTRUCTURE
OF THE HYPERTENSIVE RATS**

Calcium channel blockers and β_1 -adrenoblockers are effective antihypertensive agents, but their cell protective properties are not investigated well. Spontaneously hypertensive rats received a 10 mg/kg/day amlodipine dose and 25 mg/kg/day bisoprolol dose via an orogastric tube during three months. We performed examination of the myocardium's fragments under a scanning electron microscope. Morphometric investigation of mitochondrions we performed using special program what is named "ORGANELLE". Amlodipine significantly normalizes the ultrastructure of the myocardium. This antihypertensive drug prevented the signs of over-contractility of myofibrils. Amlodipine causes the fusion mitochondrions which has compensatory character on the background of good safety of mitochondrial ultrastructures. Another feature of amlodipine is a significant increase in the number of capillaries. Bisoprolol significantly reduced over-contractility of the myofibrils, but the signs of dystrophic-destructive processes in myofibrils and mitochondrions of cardiomyocytes remained. Bisoprolol improved the condition of the endothelial cells, but the activation of the functional activity of these cells has not been observed. The combined use of two antihypertensive drugs amlodipine and bisoprolol led to a better recovery of myofibrils than their separate use, whereas the effect on mitochondrions noted similar as in the group of rats received bisoprolol and that effect was worse than during amlodipine's monotherapy. Also we didn't reveal a reason to combine these drugs after analysis of the effect of the drug combination on the conditions of blood microvessels, which number was increased compared with hypertensive rats, but significantly less than when rats received only amlodipine. These essential cell-protective effects of amlodipine and bisoprolol in spontaneously hypertensive rats could be a significant additional factor in the treatment of hypertension complicated with pathological changes in the heart. Key words: hypertension, amlodipine, bisoprolol, ultrastructure of cardiomyocytes, mitochondrions, blood vessels.

National O.O. Bogomolets Medical University, Department of Pharmacology, Kyiv

Institute of Problems of Pathology of National O.O. Bogomolets Medical University, Department of Electron Microscopy, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Западнюк И.В., Западнюк В.И., Захариев К.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
2. Каруну В.Я. Электронная микроскопия. – К.: Вища школа, 1984. – 208 с.
3. Маркель А.Л., Маслова Л.Н., Шишкина Г.Т. Патологи-

зиологический анализ факторов риска артериальной гипертензии и атеросклероза. – Новосибирск, 1992. – 72 с.

4. Пузыренко А.М., Загородний М.І., Горчакова Н.О. β -Адреноблокатори: сучасні клініко-фармакологічні аспекти застосування в медичній практиці // Укр. наук.-мед. молод. журн. – 2012. – № 1. – С. 9–12.
5. Пузыренко А.М., Горчакова Н.О., Чекман І.С. Довгань Р.С. Сучасні клініко-фармакологічні аспекти застосування блокаторів кальцієвих каналів в медичній практиці // Тас само. – № 3. – С. 30–34.
6. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Докл. АН СССР. – 1979. – № 6. – С. 1513–1516.
7. Chan D. Mitochondrial fusion and fission in mammals // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. – 2006. – 22. – P. 79–99.
8. Chen H., Vermulst M., Wang Y.E., Chomyn A., Prolla T.A., McCaffery J.M., Chan D.C. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations // Cell. – 2010. – 14(2). – P. 280–289.
9. Choi S.M., Kim J.E., Ahn B.O. Effects of amlodipine orotate on hypertension-related complications in spontaneously hypertensive rats // Arzneimittelforschung. – 2006. – 56, № 1. – P. 12–17.
10. Hazama F., Ozaki T., Amano S. Scanning electron microscopic study of endothelial cells of cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats // Stroke. – 1979. – 10(3). – P. 245–52.
11. Khan N.A., Chattopadhyay P., Abid M., Pawdey A., Kishore K., Wahi A.K. Protective effects of amlodipine on mitochondrial injury in ischemic reperfused rat heart // J. Environ. Biol. – 2012. – 33(3). – P. 591–595.
12. Kizhakekuttu T.J., Wang J., Dharmashankar K., Ying R., Gutterman D.D., Vita J.A., Widlansky M.E. Adverse alterations in mitochondrial function contribute to type 2 diabetes mellitus-related endothelial dysfunction in humans // Arterioscler. Thromb. Vas.c Biol. – 2012. – 32(10). – P. 2531–2539.
13. Lee Y.J., Choi D.H., Cho G.H., Kim J.S., Kang D.G., Lee H.S. Arctium lappa ameliorates endothelial dysfunction in rats fed with high fat/cholesterol diets // BMC Complement. Altern. Med. – 2012. – 12(1). – P. 116.
14. Lu J.C., Cui W., Zhang H.L. Additive beneficial effects of amlodipine and atorvastatin in reversing advanced cardiac hypertrophy in elderly spontaneously hypertensive rats // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2009. – 36, № 11. – P. 1110–1119.
15. Mozdy A., Shaw J. A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – 4(6). – P. 468–478.
16. Mougnot N., Modiani O., Lechat P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats // Pharmacol. Res. – 2005. – 51, № 4. – P. 359–365.
17. Nishio M., Sakata Y., Mano T. Beneficial effects of

- bisoprolol on the survival of hypertensive diastolic heart failure model rats // *Eur. J. Heart. Fail.* – 2008. – **10**, № 5. – P. 446–453.
18. Puzyrenko A.M., Chekman I.S., Kuftyreva T.P., Gorchakova N.O. The effect of amlodipine on the myocardial ultrastructure of the hypertensive rats // *J. Int. Scien. Publications.* – 2012. – **6**. – P. 351–358.
19. Sanaei-Zadeh H. Treatment of amlodipine overdose // *Indian. J. Crit. Care Med.* – 2012. – **16**. – P. 182.
20. Sag C., Yokusoglu M., Cincik M., Ozkan M., Kayir H., Uzun M., Baykal B., Ozogul C., Baysan O., Uzbay I.T. The prevention of myocardial ultrastructural changes by perindopril, atenolol and amlodipine in chronic alcohol administered rats // *Pharmacol. Res.* – 2006. – **53**(2). – P. 142–148.
21. Sorop O., Bakker E.N., Pisteu A., Spaan J.A., VanBavel E. Calcium channel blockade prevents pressure-dependent inward remodeling in isolated subendocardial resistance vessels // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006. – **29**(3). – P. 1236–1245.
22. Singh A., Bangalore S. Do angiotensin receptor blockers prevent myocardial infarctions as well as other initial therapies? // *Curr. Opin. Cardiol.* – 2012. – **27**(4). – P. 381–385.
23. Sun L., Bai Y., Du G. Endothelial dysfunction – an obstacle of therapeutic angiogenesis // *Aqing. Res. Rev.* – 2009. – **8**(4). – P. 306–313.
24. Statsenko M.E., Derevianchenko M.V. The Place of adrenergic blockers in the Treatment of Cardiovascular Disease in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Kardiologija.* – 2012. – **52**. – P. 57–63.
25. Vesterdal L.K., Mikkelsen L., Folkmann J.K., Sheykhzade M., Cao Y., Roursgaard M., Loft S., Müller P. Carbon black nanoparticles and vascular dysfunction in cultured endothelial cells and artery segments // *Toxicol. Lett.* – 2012. – **214**(1). – P. 19–26.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Ін-т проблем патології нац. мед. ун-ту ім. О.О.
Богомольця, Київ
E-mail: a.puzyrenko@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 17.12.2011*

І.В. Харчук, О.О. Андрухова, В.К. Рибальченко, О. Андрухов

Механізми нефротоксичності нової протипухлинної сполуки - похідного малеїміду MI-1

Досліджено особливості впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) на життєздатність і апоптозіндуковану загибель епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців нирок, а також вміст у них загальної та фосфорильованої форми кінази ERK1/2 для встановлення можливих механізмів нефротоксичності MI-1. Дослідження впливу останнього на життєздатність та апоптоз епітеліоцитів канальців нирок проводили за допомогою 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту та проточної цитометрії після фарбування специфічними антитілами до анексину V відповідно. Вміст ERK1/2 визначали за допомогою імуноблотингу. Встановлено, що MI-1 є більш токсичним відносно епітеліоцитів дистальних канальців, ніж проксимальних. До механізмів нефротоксичності MI-1 залучений апоптоз, а також підсилення фосфорильовання ERK1/2 у дистальних канальцях. Водночас збільшення вмісту ERK1/2 в проксимальних канальцях під впливом MI-1 може сприяти виживанню епітеліоцитів за умов дії токсичного чинника чи окисдативного стресу.

Ключові слова: похідні малеїміду (піроли), нефротоксичність, апоптоз, ERK1/2-сигнальний каскад.

ВСТУП

Одним з найбільш поширених супутніх ускладнень хіміотерапії є нефропатії, викликані цитостатичними препаратами, що значно обмежує ефективне лікування онкозахворювань. Тому визначальним критерієм у пошуку нових протипухлинних засобів є селективність їхньої дії [6, 17]. АТФ-конкурентний інгібітор тирозинкіназ похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) є потенційною протипухлинною сполукою з подвійним фармакологічним ефектом, оскільки здатний пригнічувати кінази, що задіяні як у ангіогенезі, так і у регуляції процесів проліферації та росту пухлин (EGF-R, FGF-R1, VEGF-R1-3, IGF1-R, INS-R, SRK, YES, ZAP70) [1]. MI-1 ефективно зменшує кількість пухлин і загальну площу ураження у щурів при хімічноіндукованому канцерогенезі товстого кишечника [11], а також попереджає пренеопластичні зміни у нирках за умов дії канцерогену [10].

Крім того, низька токсичність сполуки відносно тканин та органів тварин є хорошим аргументом на користь її подальшого дослідження для терапевтичного застосування [5].

Однак у дослідженнях з використанням тваринних моделей була виявлена деяка нефротоксичність MI-1 після 10- та 30-добового застосування [2, 3], що спонукало до більш детального вивчення цього питання. Виявлені структурні зміни у тубулярному, та меншою мірою, у гломерулярному апараті нирок, порушення гемодинаміки органа та незначне запалення в інтерстиції є характерними для початкових етапів медикаментозно індукованого тубуло-інтерстиційного нефриту [2]. Ураження нирок є більш суттєвим після 10 діб впливу 5 мг/кг MI-1, ніж після 30 діб 2,7 мг/кг сполуки [3]. У тубулярному апараті під дією MI-1 більшого ушкодження зазнають дистальні канальці (розширення, зменшення висоти епітелію, його десквамація). Після тривалого впливу (20 тиж) ці порушення є значно меншими [10]. Дослідження

© І.В. Харчук, О. Андрухова, В.К. Рибальченко, О. Андрухов

механізмів нефротоксичності MI-1 відносно тубулярного апарату нирок, є важливим завданням для встановлення ризиків, усунення можливих побічних ефектів і покращення якості життя пацієнтів.

Метою нашого дослідження було виявлення особливостей впливу MI-1 на життєздатність та апоптозіндуковану загибель епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців нирок для встановлення можливих механізмів його нефротоксичності.

МЕТОДИКА

Виділення сегментів ниркових канальців для органної культури. Сегменти ниркових канальців виділяли за методикою Burg і співавт. [7]. Для цього нирки мишей лінії C57BL/6 перфузували стерильним середовищем Ham's F12, GIBCO («Invitrogen», США), яке містило 1 мг/мл колагенази (тип II; «Sigma», США) і 1 мг/кг пронази Е (тип XXV; «Sigma», США) при рН 7,4 і 37°C. Тканину кори нирок подрібнювали (при 4°C) на шматочки 1-2 мм і поміщали при 37°C в середовище Ham's F12, що містило по 0,5 мг/мл колагенази II і пронази Е на 15 хв при інтенсивному струшуванні. Після центрифугування протягом 4 хв при 3000 об/хв ферментвмісний розчин видаляли і канальці ресуспендували в охолодженому середовищі, що містило 1%-й розчин антибіотик/антимікотик і ставили на лід.

Виділення і культивування епітеліоцитів проксимальних і дистальних ниркових канальців. Первинні епітеліоцити проксимальних і дистальних канальців нирок виділяли з мишей відповідно до методики Qi і співавт. [16] після обробки колагеназою та центрифугування у градієнті щільності та культивували у середовищі без сироватки. Експерименти з клітинами проксимальних і дистальних канальців та канальцевими сегментами проводили у середовищі з 5% CO₂ без сироватки при 37°C. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 протягом 4 та 24 год, а канальцеві сегменти органної

культури – у середовищі зі вказаними концентраціями впродовж 2 год. Для імуноблотингу були відібрані зразки сегментів і епітеліоцитів канальців.

Імуноблотинг. Білки були виділені в RIPA-буфері з інгібіторами протеаз. Зразки білків розділяли за допомогою електрофорезу на поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату натрію (50 мкг/лунку) і перенесли на нітроцелюлозні мембрани («Thermo Scientific», США), які інкубували 12 год при +4°C з первинними антитілами до загальної кінази (tERK1/2; «BD Biosciences», США) та фосфорильованої (pERK1/2; «Cell Signaling», США), а також антитілами до β-актину («Sigma», США) в 2 % (маса/об'єм) сироватки альбуміну бика («Sigma», США) в TBS (Tris-buffered saline) [150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л трис-НCl (рН 7,4), 0,2% Твін-20]. Після промивки мембрани інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Amersham Life Sciences», Великобританія). Специфічний сигнал візуалізували за допомогою системи хемілюмінесцентного виявлення для імуноблотингу ECL kit («Amersham Life Sciences», Великобританія). Смуги білків кількісно оцінювали за допомогою програми Total Lab v. 2.01. Рівні експресії були нормалізовані за зворотним забарвленням за допомогою Ponceau S. Рівні експресії pERK1/2 були нормалізовані до tERK1/2.

МТТ-тест. Визначення життєздатності клітин проводили за допомогою колориметричного методу з використанням 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту, в основі якого лежить здатність мітохондрій живих клітин відновлювати тетразолієву сіль МТТ до МТТ-формазану [13]. Клітини були культивовані зі щільністю $2 \cdot 10^4$ клітин/лунку в 24-лункових планшетах. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 протягом 4 та 24 год (контрольні лунки не містили досліджуваних речовин). Кожна група клітин складалась із 6 окремих проб. Після культивування життєдіяльність клітин оцінювали за допомогою

МТТ-тесту, який проводили згідно з інструкцією виробника («Sigma», США). Клітини, що не підлягали впливу МІ-1, були взяті за контроль. Значення оптичної густини (D) при різних концентраціях були нормалізовані з середнім значенням контролю, яке приймали за 1. Результати представлені як $M \pm SD$, де M – середнє значення трьох незалежних експериментів, SD-стандартне відхилення. Після підтвердження нормального розподілу всіх результатів за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова, статистично значима різниця між дослідними групами і контролем була проаналізована з використанням критерію t Стьюдента. Результати проаналізовані з використанням статистичної програми SPSS 14.0 («SPSS Inc», США). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значимою при $P < 0,05$.

Апоптоз. Вивчення шляхів загибелі клітин здійснювали після їх фарбування специфічними антитілами з флюоресцентною міткою до анексину V, що зв'язується з фосфатидилсерином на клітинній поверхні та після фарбування йодидом пропідіуму, який є маркером мертвих клітин. Транслокація фосфатидилсерину з цитоплазматичного моношару плазматичної мембрани на зовнішній за допомогою ферменту скрамблази є однією з найбільш ранніх подій апоптозу. Клітини розсіювали в 6-лункові планшети в кількості $0,7 \cdot 10^6$ клітин/лунку в 3 мл середовища без сироватки. Дослідження апоптозу клітин

проводили після 24 год впливу речовини у концентраціях 1 і 10 мкмоль/л методом флюорисцентно-активованого розділення клітин (FACS, від англ. fluorescence-activated cell sorting) за допомогою проточної цитометрії («FACS Calibur, Becton Dickenson», США) з використанням програмного забезпечення CellQuest Software («BD Biosciences», США), що застосовується для встановлення відсоткового співвідношення апоптотичних і некротичних клітин. Результати розподіляли на чотири популяції (у відсотках від загальної кількості клітин): живі клітини; клітини на ранній стадії апоптозу; клітини, що загинули через апоптоз, та клітини, що загинули через некроз.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що після 4 год впливу МІ-1 рівень виживання епітеліоцитів проксимальних каналців становить 92–95 %. Збільшення часу експозиції клітин (24 год) до досліджуваних речовин викликає зменшення кількості живих клітин, однак вона залишається достатньо високою – 73–75 % (рис. 1, а).

Для епітеліоцитів дистальних каналців навпаки - більшого пригнічення клітини зазнають після короткочасного впливу МІ-1, кількість життєздатних клітин становить 72–73 %. Після 24 год цей показник збільшується до 90 % (див. рис. 1, б). Тобто виявлене за допомогою МТТ-тесту зменшення кількості життєздатних епітеліоцитів обох

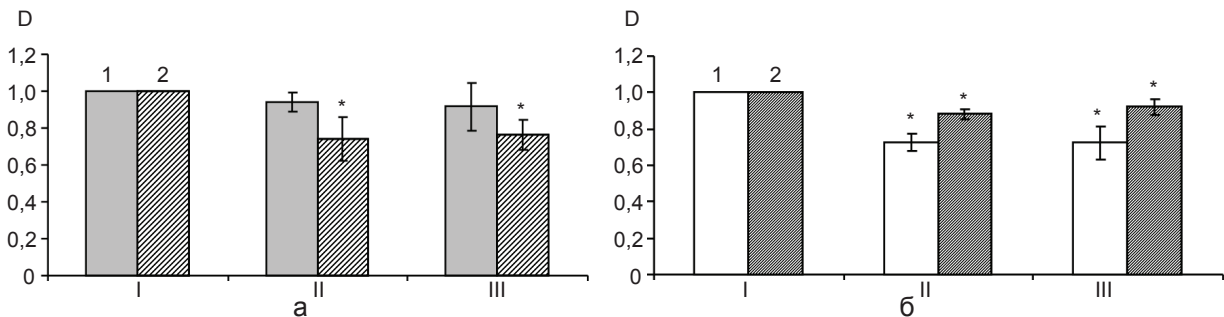


Рис. 1. Вплив похідного малеїміду МІ-1 на життєздатність клітин первинної лінії епітеліоцитів проксимальних (а) та дистальних каналців (б) нирок мишей після 4 (1) та 24 (2) год впливу: I – контроль, II – 1 мкмоль/л, III – 10 мкмоль/л. Клітини, що не підлягали впливу МІ-1, були взяті за контроль. D - значення оптичної густини при різних концентраціях, нормалізовані з середнім значенням контролю. * $P < 0,05$ відносно контролю

первинних ліній є таким, що вказує на низьку токсичність MI-1 відносно клітин тубулярного апарату нирок.

При вивченні апоптозу епітеліоцитів проксимальних каналців встановлено, що лише при більшій концентрації MI-1 кількість життєздатних клітин зменшується на 5 % за рахунок збільшення таких на ранній стадії апоптозу, а число тих, що загинули, залишається на рівні контролю (рис. 2, а). MI-1 викликає зменшення кількості життєздатних епітеліоцитів дистальних каналців з 87 у контролі до 60 %, трикратне збільшення клітин у ранній і віддаленій стадіях апоптозу, а також загиблих через некроз лише при досягненні концентрації 10 мкмоль/л (рис. 2, б).

Отримані результати свідчать про більшу резистентність до сполуки MI-1 епітеліоцитів проксимальних каналців порівняно з дистальними. Виявлена у попередніх гістологічних дослідженнях токсичність MI-1 відносно епітеліоцитів дистальних каналців [2, 3] підтвердилась отриманими результатами, що вказують на апоптозіндукований шлях загибелі клітин.

Відомо, що сигнальний шлях ERK1/2 залучений до патогенезу цисплатиніндукованої гострої ниркової недостатності [14, 15]. Фосфорилування ERK1/2 призводить до підсилення апоптозу у культурі клітин проксимальних каналців через активацію 3-каспази, а пригнічення - знижує рівень апоптозу [14]. Саме ураження цих каналців

спочатку вважалось основою для розвитку цисплатиніндукованої нефротоксичності. Однак подальші дослідження *in vivo* виявили переважну локалізацію pERK1/2 у дистальних каналцях [9] і при інших патологіях, наприклад при діабеті [7]. У мишей з гострою нирковою недостатністю цисплатин викликає фосфорилування ERK1/2 переважно в дистальних каналцях і збірних трубочках, а це в свою чергу призводить до опосередковано фактором некрозу пухлин α запалення і апоптозу через активацію 3-каспази. Застосування інгібітора U0126 до мітогенактивованої протеїнкінази кінази зменшувало фосфорилування ERK1/2 і значно покращувало функціональний і морфологічний стан тубулярного апарату [8]. Це можна використати для попередження нефротоксичності ліків, а збільшення вмісту pERK1/2, що відіграє ключову роль у патогенезі гострої ниркової недостатності, може бути індикатором потенційної нефротоксичності певного чинника.

У дослідженнях з використанням органної культури тканини кіркової зони нирок мишей, встановлено, що після 2 год інкубації з MI-1 у концентрації 1 та 10 мкмоль/л вміст tERK1/2 та pERK1/2 суттєво не змінюється порівняно з контролем (рис. 3). Однак після інкубації з MI-1 у більш високій концентрації вміст tERK1/2 в проксимальних каналцях зростає в 2,6 раза, а в дистальних каналцях майже не змінюється. Вміст pERK1/2 в проксимальних каналцях після інкубації з MI-1 зростає на

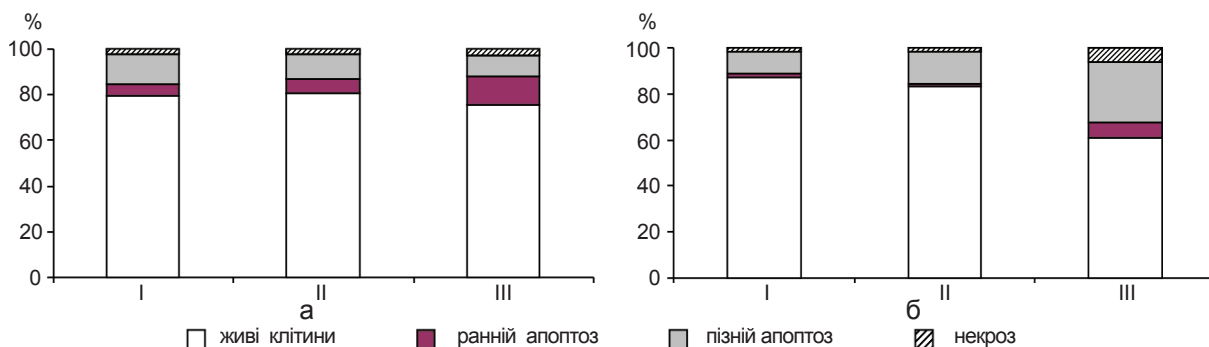


Рис. 2. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих через апоптоз і некроз епітеліоцитів проксимальних (а) та дистальних каналців (б) після впливу похідного малеїміду MI-1 протягом 24 год: I – контроль, II – 1 мкмоль/л, III – 10 мкмоль/л. Клітини, що не підлягали впливу MI-1, були взяті за контроль

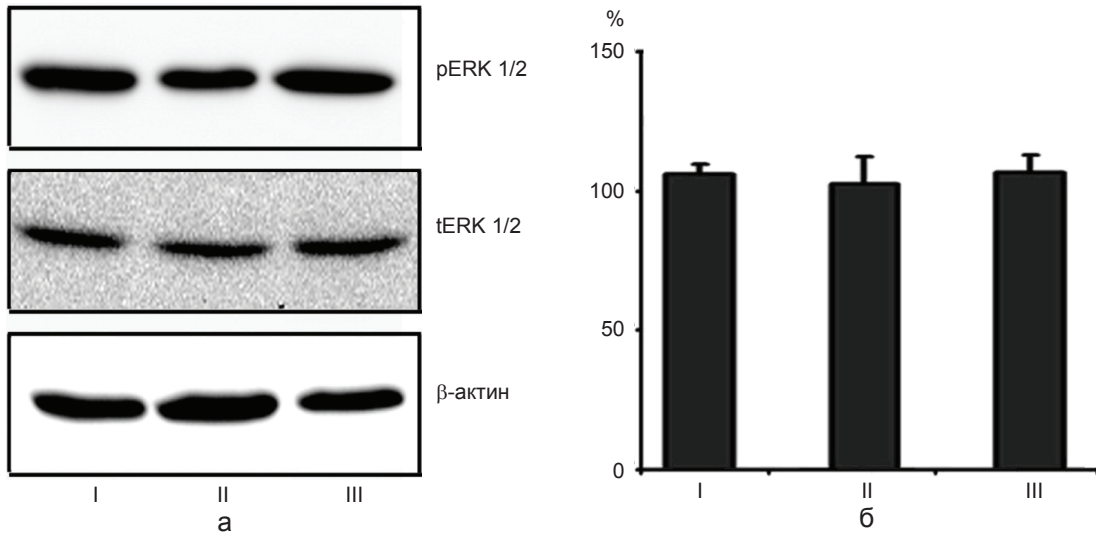


Рис. 3. Імуноблотинг фосфорильованої кінази (pERK1/2) і загальної (tERK1/2) (а) та співвідношення їх експресії (pERK1/2/tERK1/2) (б) у зразках білків з органної культури кори нирок мишей після 2 год впливу розчинника (I - контроль) або похідного малеїміду MI-1 (II - 1 мкмоль/л, III - 10 мкмоль/л)

25 %, в дистальних – на 50 % порівняно з контрольним рівнем. Подальша нормалізація вмісту pERK до tERK дала змогу встановити зниження цього показника в проксимальних каналцях ($pERK1/2/tERK1/2=48\pm 10\%$) та його збільшення в дистальних ($pERK1/2/tERK1/2=166,7\pm 12\%$; рис. 4).

Збільшення вмісту pERK1/2 у дистальних каналцях під впливом MI-1 (рис. 5) вказує на можливу токсичність сполуки відносно

тубулярного апарату нирок. Оскільки це збільшення в дистальних каналцях було в 2 рази вище, ніж у проксимальних, можна припустити, що MI-1 *in vivo* буде більше пошкоджувати перші, перешкоджаючи функціональній здатності цієї частини нефрону реабсорбувати фізіологічно необхідні для мінерального обміну організму такі електrolіти, як кальцій, калій та натрій. Як вже зазначалося, при дослідженні впливу MI-1

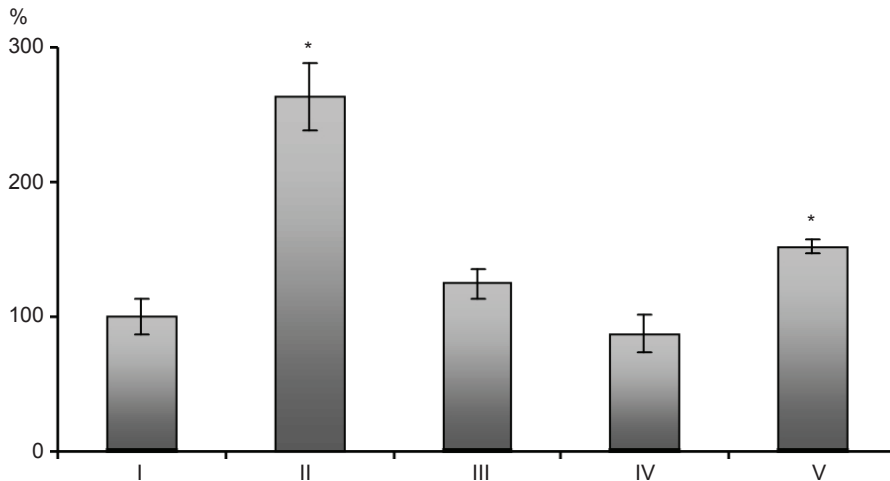


Рис. 4. Рівень експресії загальної кінази (tERK1/2) (II, IV) та фосфорильованої (pERK1/2) ERK1/2 (III, V) в органній культурі проксимальних (II, III) та дистальних каналців (IV, V) нирок мишей після 2 год впливу похідного малеїміду MI-1 в концентрації 10 мкмоль/л, нормалізований до контролю (I) – рівня експресії обох форм білка у органних культурах каналців, що не підлягали впливу MI-1. *P<0,05 відносно контролю

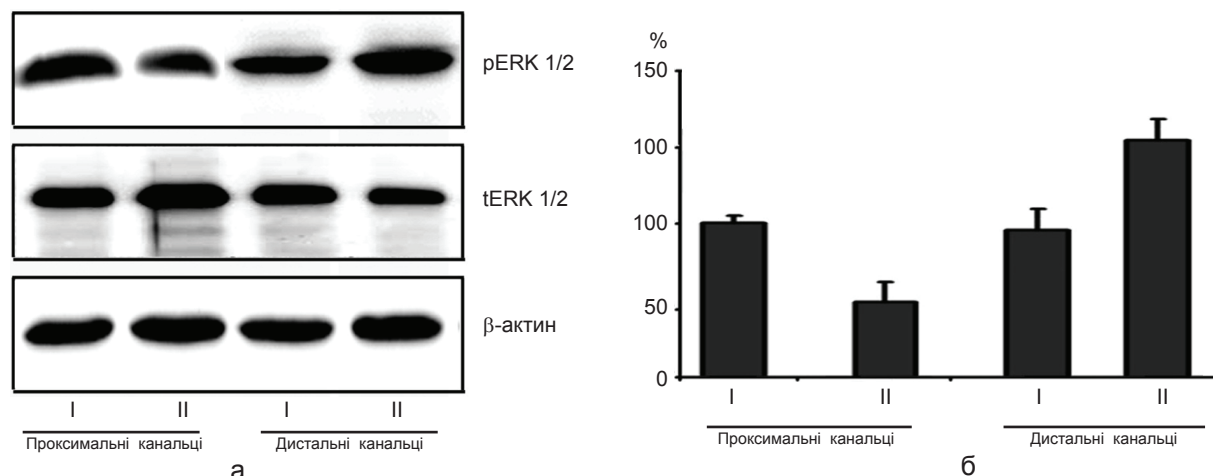


Рис. 5. Імуноблотинг фосфорильованої кінрази (pERK1/2) і загальної (tERK1/2) (а) та співвідношення їх експресії (pERK1/2/tERK1/2) (б) у зразках білків з органної культури проксимальних і дистальних канальців нирок мишей після 2 год впливу розчинника (I - контроль) або похідного малеїмиду MI-1 (II - 10 мкмоль/л). * P<0,05 відносно контролю

на морфологію нирок щурів дійсно була виявлена його більша токсичність відносно дистальних канальців [2].

З іншого боку відомо, що цисплатиніндукована активація ERK1/2 сигнального шляху захищає клітини від цисплатинової токсичності і залежить від *de novo* синтезу білка [15]. Крім того є дані, що ERK1/2 відіграє провідну роль у виживанні епітеліоцитів тубулярного апарату в умовах оксидативного стресу [12]. Збільшення загальної кількості ERK1/2 в проксимальних канальцях під впливом MI-1 може бути позитивним у разі канцерогенезу, коли тканини знаходяться в умовах порушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги. Це збігається з даними морфологічних досліджень нирок за умов CoCl_2 -індукованого оксидативного стресу, в яких встановлена протективна дія MI-1 щодо тубулярного апарату нирок [4].

Таким чином, сполука MI-1 має низьку цитотоксичність відносно епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців нирок, до механізмів якої залучений апоптоз. Збільшення вмісту pERK1/2, особливо у дистальних канальцях, під впливом MI-1 вказує на те, що одним з можливих механізмів нефротоксичності MI-1 є підсилення

фосфорилування ERK1/2, що може призводити до апоптозу епітеліоцитів через активацію 3-каспази. Водночас збільшення вмісту tERK1/2 в проксимальних канальцях під впливом MI-1 може сприяти виживанню їх клітин за умов, наприклад, дії токсичного чинника чи оксидативного стресу. В цілому низька нефротоксичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність подальших її досліджень.

И.В. Харчук, О. Андрухова, В.К. Рыбальченко, О. Андрухов

МЕХАНІЗМИ НЕФРОТОКСИЧНОСТІ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЄДИНЕННЯ - ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДУ МИ-1

Исследованы особенности влияния производного малеи-мида 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион (МИ-1) на жизнеспособность и апопто-зиндуцированную гибель эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев почек, а также содержание общей и фосфорилированной форм киназы ERK1/2 в них для установления возможных механизмов нефротоксичности МИ-1. Исследование влияния последнего на жизнеспособность и апоптоз эпителиоцитов канальцев почек проводили с помощью 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенил-тетразо-лиум бромид (МТТ)-теста и проточной цитометрии после окрашивания специфическими антителами к анексину V соответственно. Содержание ERK1/2 определяли с помощью иммуноблотинга. Установлено, что МИ-1 яв-

ляется более токсичным по отношению к эпителиоцитам дистальных канальцев, чем проксимальных. В механизмы цитотоксичности МИ-1 вовлечен апоптоз. Одним из возможных механизмов нефротоксичности соединения МИ-1 является усиление фосфорилирования ERK1/2 в дистальных канальцах. Одновременное увеличение общего количества ERK1/2 в проксимальных канальцах под влиянием МИ-1 может способствовать выживанию эпителиоцитов в условиях действия токсического фактора или оксидативного стресса.

Ключевые слова: производные малеимида (пиролы) нефротоксичность, апоптоз, ERK1/2 сигнальный каскад.

I.V. Kharchuk, O. Andrukhova, V.K. Rybalchenko, O. Andrukhov

MECHANISMS OF NEPHROTOXICITY OF NOVEL ANTICANCER COMPOUND MALEIMIDE DERIVATIVE MI-1

The features of the impact of the maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-fenilamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1) on the viability and apoptosis-induced cell death of renal proximal and distal tubular epithelial cells and the amount of total and phosphorylated ERK1/2 were studied in order to establish possible mechanisms of nephrotoxicity induced by of MI-1. The viability and apoptosis of renal epithelial tubular cells after incubation with MI-1 were performed by 3,4,5-dymethyliazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)-test and by flow cytometry after staining with specific antibodies to annexin V, respectively. The amount of ERK1/2 was determined by Western blotting. The data indicate that MI-1 was more toxic with respect to the epithelial cells of distal than proximal tubule cells. The apoptosis-induced cell death pathway is involved in the mechanisms of MI-1 cytotoxicity. One of the possible mechanisms of MI-1 nephrotoxicity is increase in phosphorylation of ERK1/2 in the distal tubules. At the same time the increase amount of total ERK1/2 in proximal tubules under the influence of MI-1 may contribute to the survival of proximal tubular epithelial cells under the impact of a toxic factor or oxidative stress.

Key words: maleimide derivatives, nephrotoxicity, apoptosis, ERK1/2 signalling pathway.

Taras Shevchenko National University, Kyiv;

Vienna University of Animal Medicine, Austria

Vienna Medical University, Austria

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О. Толмачов А.О., Воловенко Ю.М. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-*R*-бензил)-3-*R*1-4-(*R*2-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Журн. органіч. та фармацевт. хімії. – 2007. – Вип. 5, № 1. – С. 39–49.

2. Харчук І.В. Вивчення нефротоксичності похідного малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-хлор-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Соврем. пробл. токсикологии. – 2009. – № 2. – С. 46–49.

3. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. Особливості морфо-функціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Доп. НАН України. – 2009, № 10. – С. 185–188.

4. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Філінська О.М., Яблонська С.В., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діоном // Урологія. – 2009. - № 1. – С. 27–31.

5. Яблонська С.В., Філінська О.М., Островська Г.В., Рибальченко В.К. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 3. – С. 83–92.

6. Arias J.L. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview // Mini Rev. Med. Chem. – 2011. – **11**, №1. – P. 1–17.

7. Burg M.B., Grantham J., Abramow M., Orloff J., Schafer J.A. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons // J. Amer. Soc. Nephrol. – 1997. – **8**, №4 – P. 675–683.

8. Fujita H., Omori S., Ishikura K., Hida M., Awazu M. ERK and p38 mediate highglucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells // Amer. J. Physiol. Renal Physiol. - 2004. – **286**, №1. – P. F120–F126.

9. Jo S.K.; Cho W.Y.; Sung S.A.; Kim H.K, Won N.H. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis // Kid. Int. – 2005. – **67**, № 2. – P. 458–466.

10. Kharchuk I., Filinska O., Yablonska S., Rybalchenko V. Preventive action of maleimide derivative 1-(4-*Cl*-benzil)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-fenilamino)-1*H*-pyrrol-2,5-dion on rat's renal system in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Lublin – Polonia. – Sectio DDD. Pharmacia. – 2010. - **23**, № 2. – P. 191–195.

11. Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V. Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats // Gut «GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London». – 2009. – 58 (Suppl. II). – P. A334.

12. di Mari J.F., Davis R., Safirstein R.L. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277. – P. F195–F203.

13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. – **65**, № 1-2. – P. 55–63.

14. Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №45. – P. 43377–43388.
15. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Cui W., Pelling J.C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin // Clin. Cancer Research. – 1999. – **5**. – P. 1007–1014.
16. Qi W., Johnson D.W., Vesey D.A., Pollock C.A., Chen X. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney // Nephrology (Carlton). - 2007. – **12**. – P. 155–159.
17. Zhang J., Yang P.L., Gray N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // Nature Rev. Cancer. – 2009. – **9**, № 11. – P. 28–39.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Віден. ун-т ветеринар. медицини, Австрія;
Віден. мед. ун-т, Австрія
E-mail: kharchukirina@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 31.11.12*

Є.Е. Колеснікова, В.І. Носар, Л.В. Братусь

Корекція експериментальної мітохондріальної дисфункції нейронів стовбура мозку фармакологічними препаратами ритмокор і мілдронат

Представлені результати фармакологічної корекції препаратами мілдронат і ритмокор експериментальної мітохондріальної дисфункції нейронів стовбура мозку, викликаної однократним введенням специфічного блокатора комплексу I дихального ланцюга мітохондрій ротенону щуром лінії Вістар. Показано, що 14-добове курсове введення ритмокору сприяло підвищенню резервної потужності мітохондрій нейронів стовбура мозку при окисненні комплексу глутамату та малату і при використанні як субстрату окиснення сукцинату. Аналогічне введення мілдронату достовірно підвищувало швидкість дихання за наявності АДФ і без нього при використанні обох субстратів окиснення. При корекції експериментальної мітохондріальної дисфункції нейронів стовбура мозку мілдронат сприяв підвищенню швидкості дихання за наявності АДФ, а також дихального контролю більшою мірою при використанні глутамату та малату, що наближало згадані показники до контрольних значень здорових тварин. Одночасне підвищення ступеня спряження фосфорильовання й окиснення та його ефективності при корекції мітохондріальної дисфункції ритмокором могло свідчити про суттєву економізацію роботи дихального ланцюга мітохондрій. Встановлено, що основний механізм дії обох препаратів пов'язаний з переважним посиленням НАД-залежного окиснення, яке дає змогу підвищити резистентність дихального ланцюга мітохондрій, а також економізувати «роботу» мітохондрій.

Ключові слова: стовбур мозку, мітохондрій, мітохондріальна дисфункція, біоенергетична гіпоксія, ротенон, комплекс I дихального ланцюга мітохондрій, полярографія, мілдронат, ритмокор.

ВСТУП

Стовбур мозку вважається структурою відносно стійкою до будь-яких фізіологічних змін. Очевидно, така його стабільність має особливе значення для підтримання кардіореспіраторної функції, яка визначає життєздатність і виживання організму як одного цілого. Разом з тим встановлено, що, зокрема, фізіологічне старіння організму супроводжується підвищеним вмістом продукції вільних радикалів, які пошкоджують ДНК і функціонування мітохондрій (МХ) [14, 21]. Одночасно ситуації гіпоксія/ішемія (як результат порушення функцій системи дихання, серцево-судинної системи, кисневотранспортної функції тощо), які розглядаються як фазний

процес, залежать від тяжкості чи тривалості гіпоксичної дії та призводять до різних відхилень енергосинтезувальної функції дихального ланцюга МХ [4]. Крім того, процес реперфузії після ішемії тканин, який спряжений з окисним стресом, супроводжується вторинним зменшенням енергопродукції [16]. Виділяють цілу низку захворювань, за яких можуть виникати виразні МХ-дисфункції (переважно комплексу I дихального ланцюга МХ) як неспецифічної реакції організму на початкових стадіях будь-якої патології, чи як результат дефіциту CoQ10 при специфічних генетичних аномаліях (кардіоміопатія, міотонічна дистрофія, β -таласемія, спадкова атаксія Фридрейха тощо), результатом яких також слід вважати порушення енергосинте-

© Є.Е. Колеснікова, В.І. Носар, Л.В. Братусь

зувальної функції мітохондріального апарату [5].

Ротенон досить широко застосовується як блокатор мітохондріального комплексу I (НАДН-СoQ-оксиредуктаза) дихального ланцюга МХ, який викликає зміни транспорту електронів на ділянці НАД-СoQ, проте не перешкоджає окисненню сукцинату – субстрату комплексу II. Зміни, які викликає ротенон у межах дихального ланцюга МХ, аналогічні зсувам, які виникають на початковій стадії так званої „біоенергетичної гіпоксії” [4]. Застосування ротенону в модельних дослідах дає змогу вивчити „поведінку” енергетичного обміну нейронів стовбура мозку за умов експериментальної мітохондріальної дисфункції, а також відслідкувати інтенсивність енергопродукції в МХ та ефективність використання кисню.

У клінічній практиці важливо визначити біохімічні реакції, які відбуваються в дихальному ланцюзі при застосуванні препаратів метаболічної дії. Зокрема, до таких препаратів належать мілдронат та ритмокор. Причому слід зазначити, що оскільки мілдронат (3 - (2, -2, -2 - триметилгідразиній) за хімічною будовою структурно подібний γ -бутиробетайну, він гальмує синтез карнітину з нього, наслідком чого вважається пригнічення карнітин-залежного окиснення жирних кислот в МХ, що запобігає пошкодженню їхніх мембран [13]. Мілдронат вважають цитопротектором другого покоління, механізм протекції якого заснований на оптимізації утилізації O_2 , відновлення внутрішньоклітинного транспорту АТФ, нормалізації функції насосів, індукції синтезу та накопичення білків, відповідальних за альтернативні процеси енергозабезпечення ішемізованої тканини [13]. Унікальність мілдронату пов'язана з оптимізацією процесів, що визначають виживання клітин, в умовах дефіциту O_2 незалежно від причин його виникнення. Оригінальний комбінований препарат ритмокор (діюча речовина – пентагідросикапронова (глюконова) кислота у вигляді магнієвої та калієвої солей) також

є метаболічним регулятором біохімічних процесів при зниженні напруження кисню, зокрема, в міокарді. Ритмокор покращує клітинний метаболізм, надає мембраностабілізуювальну, антиоксидантну дію [2]. Сприятливий вплив ритмокору на метаболізм зумовлений підвищенням активності окисно-відновних ферментів (зокрема, Na^+ , K^+ -АТФази) [3]. Досвід клінічного застосування ритмокору до останнього часу обмежувався виключно дослідженням його антиаритмічної ефективності.

Метою нашого дослідження було вивчення енергетичного метаболізму нейронів стовбура мозку за умов фармакологічної корекції експериментальної мітохондріальної дисфункції препаратами мілдронат і ритмокор.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на щурах-самцях лінії Вістар масою 280–320 г, які знаходилися на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця за стандартним світловим режимом (12 год – день, 12 год – ніч). Дослідження проводили згідно з положенням Міжнародної конвенції з захисту тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1989) та також відповідно до положення Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Для часткової блокади дихального ланцюга МХ нейронів стовбура мозку були застосовані одноразові підшкірні введення малих доз ротенону (3 мг/кг у ділянку між лопатками), селективного блокатора комплексу I дихального ланцюга МХ [17]. Ротенон («Sigma», США) розчиняли в мінімальній кількості суміші двох розчинників (диметилсульфоксид (DMSO) і поліетиленгліколь (PEG), 1:1 («Sigma», США) [17]. Через 24 год після введення ротенону починали експеримент.

Тварин поділили на 7 груп. До 1-ї групи входили контрольні тварини; 2-га – щури,

яким одноразово підшкірно вводили ротенон; 3-тя група – одноразове підшкірне введення комплексного розчинника ротенону (DMSO і PEG); 4-та та 5-та групи – внутрішньоочеревинне введення ритмотору протягом 14 діб (0,1 мл 10%-го розчину препарату на добу; АОЗТ „ФарКоС”, Україна) та мілдронат (100 мг/кг на добу, АТ «Гриндекс», Латвія) [18–20]; 6-та група – фармакологічна корекція ритмотором та 7-ма – мілдронатом (у вище зазначених дозуваннях) протягом 14 діб після введення ротенону.

Після декапітування тварин усіх груп (під легким ефірним наркозом), препарування нижньої частини стовбура мозку проводили на межі мосту. МХ нервових клітин стовбура мозку виділяли в середовищі, яке містило (ммоль/л): манітолу – 210, сахарози – 70, NEPES – 10. ЕДТА – 1, БСА – 0,1 % (рН 7,4) [5]. Середовище інкубації містило (ммоль/л): КСІ – 120, NEPES – 10, ЕДТА – 0,2, K_2HPO_4 – 2 (рН 7,4). Як субстрати окиснення використовували (ммоль/л): сукцинат натрію – 10, глутамат натрію – 5, малат – 5, ротенон – 1 мкмоль/л. Дихання МХ стимулювали 200 мкмоль/л АДФ. Використовуючи одержані полярограми, обчислювали показники дихання МХ (за Чансом) [8]: швидкість дихання при відсутності АДФ (стан спокою V_4^s , швидкість фосфорильовального (метаболічний стан 3, V_3) та контрольованого (метаболічний стан 4, $V_4^{ATФ}$) дихання, дихальний контроль ($V_3/V_4^{ATФ}$), коефіцієнт ефективності фосфорильовання (АДФ/О) [11]. Концентрацію білка визначали методом Лоурі.

Результати обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток мітохондральної дисфункції нейронів стовбура мозку в відповідь на одноразове введення ротенону. Як уже згадувалося вище, нами був застосований ротенон, що дало можливість оцінити рівень енергетичного метаболізму МХ нейронів стовбура мозку

за умов інгібування комплексу I дихального ланцюга МХ. Доведено значення саме першої ланки дихального ланцюга МХ в захисті органів на початковій стадії ішемії [4]. Ротенон відомий як токсичний агент, який при експериментальному „відтворенні” синдрому Паркінсона у тварин викликає селективну загибель дофамінергічних нейронів чорної субстанції в результаті їх пошкодження при блокаді комплексу I та розвитку оксидативного стресу. Разом з тим показано [9], що ротенон при системному, чи навіть одноразовому, введенні інгібує комплекс I дихального ланцюга МХ нейронів усього мозку, а не тільки в substantia nigra. Крім того, деякі автори [7, 8] вважають, що саме комплекс I найбільш чутливий до ішемічного інгібування ділянки дихального ланцюга МХ мозку. Таким чином, ми застосовували ротенон для експериментальної моделі, яка передбачала стійке інгібування комплексу I в МХ нейронів стовбура мозку щурів.

Було показано відсутність будь-яких змін мітохондріальної функції нейронів стовбура мозку на окремо введеній суміші DMSO і PEG.

За умов дії ротенону при окисненні глутамату та малату відмічалось зниження таких показників: V_4^s (на 53 %), V_3 (на 59 %), $V_4^{ATФ}$ (на 32 %), а також дихального контролю $V_3/V_4^{ATФ}$ (на 39 %) та ефективності окиснювального фосфорильовання – АДФ/О (на 21 %; табл. 1). Отримані результати свідчать про інгібувальний ефект ротенону, який пов'язаний з активністю комплексу I дихального ланцюга МХ та проявляється в пригніченні потоку відновлених еквівалентів, які забезпечують ресинтез АТФ.

При введенні ротенону щурам за умов окиснення сукцинату (табл. 2) спостерігалось зниження V_4^s (на 17 %), V_3 (на 35 %), дихального контролю (на 31 %) та АДФ/О (на 10 %), яке свідчило про певне роз'єднання процесів окиснення та фосфорильовання. Менш виражені зміни зазначених показників при окисненні сукцинату говорило про те, що

за умов блокування комплексу І ротеноном особливу роль починає відігравати сукцинатакцидазний шлях окиснення, завдяки якому зберігається електронотранспортна функція дихального ланцюга та здатність до окиснювального фосфорилування.

Отримані нами результати вказують на більш напружену роботу системи мітохондріальних ферментних комплексів, яка супроводжується зниженням енергозабезпечення функції МХ.

Вплив ритмокору і мілдронату на мітохондріальну функцію нейронів стовбура мозку. Відомо, що ритмокор і мілдронат досить широко застосовуються для комплексної терапії в кардіологічній і неврологічній практиці та здійснюють переважно метаболічний ефект. Також відомо, що в умовах ішемії мілдронат відновлює рівновагу в постачанні кисню та його споживанні в клітинах, попереджує порушення синтезу АТФ, одночасно з цим активує гліколіз, який відбувається без додаткового споживання кисню. Метаболічна активність ритмокору характеризується активацією пентозного шунту окиснення глюкози,

який є постачальником енергетичних еквівалентів як для гліколізу, так і для аеробного окиснення [1]. Таким чином, в умовах гіпоксії і при достатньому вмісті кисню, препарат проявляє свою дію, яка супроводжується активацією окисно-відновних ферментів, підвищенням інтенсивності продукції АТФ та креатинфосфату.

В наших дослідах 14-добове курсове введення ритмокору підвищувало активне дихання МХ як за умов окиснення глутамату та малату, так і сукцинату порівняно з контролем, (V_3 – на 28 та 41 % відповідно; див. табл.1, 2). Всі інші полярографічні показники дихання МХ стовбура мозку не відрізнялися від контрольних.

Аналогічне курсове введення мілдронату вірогідно підвищувало швидкість дихання МХ за наявності АДФ (V_3) та без нього ($V_4^{АТФ}$) (на 47 та 54 % відповідно) при використанні субстрату окиснення глутамату та малату (див. табл. 1). За умов окиснення сукцинату стимулювалося активне дихання V_3 (на 66 %) і збільшувалася спряженість процесів окиснення і фосфорилування ($V_3/V_4^{АТФ}$ на 16 %; див. табл. 2).

Таблиця 1. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондрій нейронів стовбура мозку щурів при окисненні глутамату та малату ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Швидкість споживання кисню без АДФ у стані спокою, $нг \cdot атом O^{-1} \cdot хв^{-1} \cdot мг білка$	Швидкість фосфорилувального дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3), $нг \cdot атом O^{-1} \cdot хв^{-1} \cdot мг білка$	Швидкість контрольованого дихання мітохондрій (в метаболічному стані 4), $нг \cdot атом O^{-1} \cdot хв^{-1} \cdot мг білка$	Коефіцієнт дихального контролю за Чансом	Коефіцієнт ефективності фосфорилування, $мкмоль/нг \cdot атом O$
Контроль	20,77± 1,25	41,43± 3,17	15,24± 1,67	2,74± 0,18	2,32± 0,11
Ротенон	9,66± 0,65*	17,14± 1,95*	10,28± 0,96*	1,67± 0,09*	1,83± 0,14*
Диметилсульфоксид і поліетиленгліколь	13,65±0,63	37,34±1,29	14,64±1,97	2,55±0,20	2,26±0,34
Ритмокор	17,92± 1,23	53,25± 3,43*	18,54± 1,29	2,87± 0,16	2,46± 0,07
Мілдронат	24,00±0,95	61,00±1,19*	23,54±1,54*	2,62±0,11	2,11±0,16
Ротенон і ритмокор	18,07± 2,09**	44,00± 1,94**	20,00± 2,26**	2,21± 0,05**	2,26±0,17**
Ротенон і мілдронат	18,12±0,09**	44,62±1,37**	17,87±1,09**	2,50±0,14**	2,20±0,09**

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі введенням ротенону.

Корекція експериментальної МХ-дисфункції нейронів стовбура мозку ритмокором і мілдронатом. Курсове застосування ритмокору з попереднім одноразовим введенням тваринам ротенону відновлювало електронотранспортну функцію МХ за умов окиснення глутамату та малату, про що свідчить підвищення показників дихання (V_4^s , V_3 , $V_4^{ATФ}$, АДФ/О) до контрольних значень. Дещо нижчим залишався показник дихального контролю (на 19 %), проте він був вищий (на 32 %) при введенні тільки ротенону (див. табл. 1). При використанні сукцинату як субстрату окиснення значення $V_3/V_4^{ATФ}$ було менше (на 11 %) порівняно з контролем, та вище (на 36 %) у тварин, яким вводили ротенон.

Підвищення спряженості $V_3/V_4^{ATФ}$ та ефективності АДФ/О свідчить про суттєву економізацію роботи дихального ланцюга МХ через активацію окиснення НАД-залежних субстратів. Слід зазначити, що фармакологічна корекція порушень мітохондріальних процесів ритмокором дає змогу наблизити основні полярографічні показники функції МХ нейронів стовбура мозку до контрольних

значень, за винятком зниження $V_3/V_4^{ATФ}$ на тлі окиснення НАД-залежних субстратів, що, імовірно, віддзеркалює досить стійке токсичне пошкодження ділянки НАД-СоQ дихального ланцюга МХ.

У тварин з експериментальною мітохондріальною дисфункцією (викликаною введенням ротенону) застосування мілдронату відновлювало киснезалежні процеси, про що свідчать показники дихання МХ в усіх метаболічних станах, а також рівень спряження окиснення з фосфорилуванням та активність споживання кисню за умов окиснення глутамату, малату і сукцинату. Як відомо, ефект ротенону відносно дихального ланцюга МХ опосередковується кількома шляхами, зокрема, пов'язаними з зменшенням електронного транспорту через комплекс I дихального ланцюга МХ, зменшенням вмісту АТФ, зниженням $\Delta\psi_m$ (трансмембранного потенціалу МХ), підвищенням інтенсивності продукції активних форм кисню внаслідок збільшення утворення убісеміхінону, первинного донора електронів при генерації O_2^- , здатного поглиблювати вищезгадані події [15, 22]. Оскільки мілдронат і ритмокор мають деякі

Таблиця 2. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондій нейронів стовбура мозку щурів при окисненні сукцинату натрію ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Швидкість споживання кисню без АДФ у стані спокою, $ng \cdot atom O^{-1} \cdot xv^{-1}$ - мг білка	Швидкість фосфорильовального дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3), $ng \cdot atom O^{-1} \cdot xv^{-1}$ - мг білка	Швидкість контрольованого дихання мітохондрій (в метаболічному стані 4), $ng \cdot atom O^{-1} \cdot xv^{-1}$ - мг білка	Коефіцієнт дихального контролю за Чансом	Коефіцієнт ефективності фосфорилування, $mkmol/ng \cdot atom O$
Контроль	23,30±0,92	49,32± 3,62	20,31± 2,10	2,43± 0,14	1,62± 0,12
Ротенон	19,22± 1,91	32,13± 2,55*	20,16± 1,72	1,59± 0,06*	1,46± 0,05
Диметилсульфоксид і поліетиленгліколь	17,93±0,98*	38,75±2,24	17,58±0,54	2,20±0,14	1,80± 0,04
Ритмокор	21,24±1,91	53,75±3,78	23,17 ±1,39	2,32 ±0,16	1,65 ±0,07
Мілдронат	26,39±1,52	81,95±4,15*	29,23±2,39*	2,81±0,16*	1,70±0,11
Ротенон і ритмокор	27,62±1,53**	57,33±3,55**	26,13± ,62**	2,20± ,09**	1,75± ,04**
Ротенон і мілдронат	22,51±0,86	50,87±1,34**	22,91±1,16	2,22±0,09**	1,77±0,09**

відмінності фармакологічної активності, а саме ритмокор, крім метаболічної дії, має ще й антиоксидантні властивості, містить солі калію, то, ймовірно, згаданий препарат здатен коректувати іонний склад МХ, що попереджує перевантаження їх іонами кальцію, вирівнювати $\Delta\psi_m$ та перешкоджати гіперпродукції активних форм кисню [12].

Таким чином, наші експериментальні результати дають змогу зробити висновок про досить високий рівень ефективності застосування милдронату та ритмокору для фармакологічної корекції мітохондріальної дисфункції нейронів стовбура мозку. Очевидно, що основний механізм дії обох препаратів пов'язаний з переважною інтенсивністю НАД-залежного окиснення, що є одним із шляхів підвищення резистентності дихально-го ланцюга МХ, а також з певною економізацією його роботи за рахунок НАД-залежного окиснення субстратів.

Е.Э. Колесникова, В.И. Носарь, Л.В. Братусь

КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ НЕЙРОНОВ СТВОЛА МОЗГА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ РИТМОКОР И МИЛДРОНАТ

Представлены результаты фармакологической коррекции препаратами милдронат и ритмокор экспериментальной митохондриальной дисфункции нейронов ствола мозга, вызванной однократным введением специфического блокатора комплекса I дыхательной цепи митохондрий ротенона крысам линии Вистар. Показано, что 14-суточное курсовое введение ритмокора способствовало повышению резервной мощности митохондрий нейронов ствола мозга как при окислении глутамата и малата, так и при использовании в качестве субстрата окисления сукцината. Аналогичное введение милдроната сопровождалось достоверным повышением скорости дыхания в присутствии и без АДФ при использовании обоих субстратов окисления. При коррекции экспериментальной митохондриальной дисфункции милдронат способствовал повышению скорости дыхания в присутствии АДФ и дыхательного контроля в большей степени при использовании в качестве субстрата окисления глутамат и малата, что приближало упомянутые показатели к контрольным значениям здоровых животных. Одновременное повышение степени сопряжения фосфорилирования и окисления и его эффек-

тивности при коррекции митохондриальной дисфункции ритмокором могло свидетельствовать об существенной экономизации работы дыхательной цепи митохондрий. Установлено, что основной механизм действия обоих препаратов связан с преимущественным усилением НАД-зависимого окисления, которое позволяет повысить резистентность дыхательной цепи митохондрий, а также экономизировать «работу» митохондрий.

Ключевые слова: ствол мозга, митохондрии, митохондриальная дисфункция, биоэнергетическая гипоксия, ротенон, комплекс I дыхательной цепи митохондрий, полярография, милдронат, ритмокор.

E.E. Kolesnikova, V.I. Nosar, L.V. Bratus

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF EXPERIMENTAL MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION OF BRAIN STEM NEURONS BY RHYTMOCOR AND MILDRONATE.

The results of pharmacological correction of experimental mitochondrial dysfunction in brain stem neurons after single injection of specific respiratory complex I inhibitor rotenone by complex agents mildronate and rhytmocor have been presented. It was shown that 14-days rhytmocor injection promoted the rise of mitochondrial reserve capacity under glutamate and malate oxidation as well as under succinate oxidation. The mildronate injection was accompanied by enhancement of the velocity of phosphorylated mitochondrial respiration in the presence and absence of ADP when both substrates of oxidation were used. Under the brain stem experimental mitochondrial dysfunction, mildronate improved a decreased velocity of phosphorylated mitochondrial respiration and the respiratory control in a more significant degree under glutamate malate as the substrates of oxidation. Simultaneous increase in the respiratory control and in the coefficient of efficacy of phosphorylation during the correction of experimental mitochondrial dysfunction by rhytmocor could suggest about essential economization of processes in mitochondrial respiratory chain. It was concluded that the main mechanisms of influence on mitochondrial disturbances of both agents were connected to the powerful rise of NAD-related oxidation which allowed to enhance a resistance of mitochondrial respiratory chain and to optimize the mitochondrial function.

Key words: brain stem, mitochondria, mitochondrial dysfunction, bioenergetic hypoxia, rotenone, complex I of mitochondrial respiratory chain, polarography, mildronat, rhytmocor.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волков В.И., Строна В.И. Антиишемическая активность Ритмокора и его влияние на качество жизни больных, перенесших инфаркт миокарда // Кровообіг та гемостаз. – 2007. – №4. – С. 68–72.

2. Козловський В.О. Взаємовідношення анти аритмічної, антигіпоксичної та мембранопротекторної дії лікарських засобів // Вісн. Вінницьк. держ. ун-ту. – 2003. – №1. – С.1–2.
3. Липницький Т.М., Денисюк В.О., Козловський В.О. Вивчення антиаритмічної ефективності лікарських засобів при аритміях серця, спричинених активацією процесів перекисного окиснення ліпідів // Буковин. мед. вісн. – 2003. – 7, №2. – С. 131–133.
4. Лукьянова Л.Д. Бионергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // БЭБиМ. – 1997. – 124, № 9. – С. 244–254.
5. Лукьянова Л.Д. Фармакология митохондриальной дисфункции // Consilium Medicum. – 2007. – 9, № 8. – С. 102–103.
6. Тоньшин А.Л., Лобышева Н.В., Ягужинский Л.С., Безгина Е.Н., Мошков Д.А., Нарциссов Я.Р. Влияние тормозного нейромедиатора глицина на медихального ланцого енные деструктивные процессы в срезах коры больших полушарий головного мозга при аноксии // Биохимия. – 2007. – 72, №5. – С. 631–641.
7. Allen K.L., Almeida A., Bates T.E., Clark J.B. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischemia // J. Neurochem. – 1995. – 64. – P. 2222–2229.
8. Almeida A., Allen K., Bates T.E., Clark J. B. Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain // J. Neurochem. – 1995. – 65. – P. 1698–1703.
9. Betarbet R., Sherer T. B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces feature of Parkinson's disease // Nat. Neurosci. – 2000. – 3. – P. 1301–1306.
10. Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – 17. – P. 65–134.
11. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O Ratio // Methods Enzymol. – 1967. – 10. – P. 41–47.
12. Halestrap A. P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism // Biochim. and Biophys. Acta. – 1989. – 973, №3. – P. 355–382.
13. Kalvinsh I. Mildronate. The mechanisms of action and perspectives of use. – Riga: Grindex, 2002. – 36 p.
14. Lee H.C., Wei Y.H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging // Exp. Biol. Med. – 2007. – 232, №5. – P. 592–606.
15. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgist J., Rajwa B., Melendez J.A., Robinson J.P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenon induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production // J. Biol. Chem. – 2003. – 278, №10. – P. 8516–8525.
16. Niatetskaya Z.V., Sosunov S.A., Matsiukevich D., Utkina-Sosunova I.V., Ratner V.I., Starkov A.A., Ten V.S. The oxygen free Radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia – ischemia in neonate mice // J. Neurosci. – 2012. – 32, №9. – P. 3235–3244.
17. Sherer T.B., Kim J.-H., Betarbet R., Greenamyre J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation // Exp. Neurol. – 2003. – 179. – P. 9–16.
18. Svalbe B., Zvejniece L., Vavers E., Pugovics O., Muceniece R., Liepinsh E., Dambrova M. Mildronate treatment improves functional recovery following middle cerebral artery occlusion in rats // Behav Brain Res. – 2011. – 222, №1. – P. 26–32.
19. Trumbeckaite S., Kincius M., Preidis A., Preidiene M., Veikutis V., Borutaite V., Gulbinas A. Effects of ischemia-reperfusion and pretreatment with mildronate on rat liver mitochondrial function // Pharmacol. Rep. – 2009. – 61, №5. – P. 859–69.
20. Vilskersts R., Kuka J., Svalbe B., Cirule H., Liepinsh E., Grinberga S., Kalvinsh I., Dambrova M. Administration of L-carnitine and mildronate improves endothelial function and decreases mortality in hypertensive Dahl rats // Ibid. – 2011. – 63, №3. – P. 752–62.
21. Wei Y.H., Ma Y.S., Lee H.C., Lee C.F., Lu C.Y. Mitochondrial theory of aging matures-roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging // Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). – 2001. – 64, №5. – P. 259–70.
22. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vaysiere J.-L., Petit P. X., Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte cell death in vivo // J. Exp. Med. – 1995. – 181. – P. 1661–1672.

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

Матеріал надійшов
до редакції 22.01.2013

Р.В. Янко

Морфофункціональні зміни щитоподібної залози молодих щурів за умов нормобаричної гіпоксії

Досліджували вплив гіпоксичної газової суміші (ГГС; 10 % кисню в азоті) різних режимів на морфометричні показники функціональної активності паренхіми щитоподібної залози 3-місячних щурів. Показано, зменшення середньої площі поперечного перерізу фолікулів і колоїду, зниження внутрішнього діаметра фолікулів і збільшення висоти тиреоїдного епітелію, зростання кількості тироцитів у фолікулі, резорбційних вакуолей та інтерфолікулярних острівців, підвищення фолікулярно-колоїдний індексу та зниження індексу накопичення колоїду. Тобто дозована нормобарична ГГС саногенного рівня посилює функціональну активність та процеси фізіологічної регенерації щитоподібної залози молодих тварин.

Ключові слова: гіпоксична газова суміш, щитоподібна залоза.

ВСТУП

Гормони щитоподібної залози (ЩЗ) стимулюють обмін білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, водний і електролітний обмін тощо. Головним ефектом тиреоїдних гормонів є активація транскрипції значної кількості генів у ядрі. Гормони ЩЗ посилюють окиснення, процеси поглинання кисню, витрати поживних речовин, споживання тканинами глюкози [13]. На жаль, патологія ЩЗ посідає одне з провідних місць у структурі ендокринних захворювань і згідно з статистикою спостерігається у 8 % населення Землі. Причини захворювання ЩЗ різноманітні. До них належать й неправильне харчування, і вживання недоброякісної води, і несприятлива екологічна обстановка, у тому числі й радіаційна. Медикаментозне лікування не завжди дає бажаний ефект, а інколи може призводити до виникнення побічних явищ та ускладнень. Тому пошук немедикаментозних методів, які б мали здатність поліпшувати та стимулювати роботу ЩЗ (у разі потреби) є вельми актуальним. Одним з таких методів може бути застосування газових сумішей зі зниженим парціальним тиском

кисню. Про позитивний вплив гіпоксичних газових сумішей (ГГС) на ті чи інші системи організму свідчать дані багатьох авторів [1, 12, 14]. Більшість учених досліджували вплив нестачі кисню на ЩЗ при зниженому атмосферному тиску (гіпобарія) [3, 4, 15, 16]. Тоді ж як робіт, присвячених вивченню впливу нормобаричної ГГС на ЩЗ, обмаль [2]. Неоднозначність отриманих даних може бути пов'язана з використанням різних видів тварин, віковим аспектом, тривалістю та режимом подачі ГГС тощо.

Мета роботи – дослідити зміни морфометричних показників функціональної активності ЩЗ молодих щурів під впливом переривчастої нормобаричної гіпоксії двох різних режимів.

МЕТОДИКА

Дослідження впливу ГГС здійснювали протягом 28 днів на 36 щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс. Тварин як контрольної, так і дослідних груп утримували на стандартному харчовому раціоні. ГГС (10 % кисню в азоті) подавали щодня, за допомогою апарату

гірського повітря “Борей” [1] у двох різних режимах. Щури були розділені на 3 групи: I група – інтактні тварини, II – щури, що зазнавали впливу ГГС протягом 30 хв (I режим), III – тварини, які отримували ГГС у переривчастому режимі: 10 хв деоксигенація / 30 хв реоксигенація протягом 2 год (II режим). Дослідження проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних цілей.

По закінченні досліду тварин декапітували під легким ефірним наркозом. ЩЗ виділяли для макро-, мікроморфометричного та гістологічного досліджень. Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою: фіксацію здійснювали в рідині Буена (насичений розчин пікринової кислоти – 75 мл, нейтральний формалін – 25 мл і льодяна оцтова кислота – 5 мл), зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливали у парафін. Парафінові зрізи фарбували еозином та гематоксиліном Бемера [5]. Отримані препарати аналізували на світлооптичному мікроскопі. На цифрових зображеннях мікропрепаратів здійснювали морфометрію за допомогою комп’ютерної програми IMAGE J. На гістологічних зрізах ЩЗ вимірювали площу поперечного перерізу фолікулів, колоїду та фолікулярного епітелію, внутрішній діаметр фолікулів, висоту тироцитів і ширину сполучнотканинних тяжів, підраховували кількість тироцитів у фолікулі, визначали фолікулярно-колоїдний індекс (ФКІ) та індекс накопичення колоїду (ІНК). Всі морфометричні виміри ЩЗ проводили при збільшенні мікроскопа в 200 разів.

За літературними даними до активації ЩЗ можуть призводити різні емоційні реакції, знижена температура навколишнього середовища, вплив ГГС саногенного рівня тощо [1, 10]. При посиленні функціональної активності в структурі ЩЗ відбуваються деякі зміни: зменшується середня площа поперечного перерізу фолікулів і площа колоїду, зростає площа фолікулярного епітелію,

в колоїді з’являються резорбційні вакуолі, збільшується висота тироїдного епітелію, знижується внутрішній діаметр фолікулів, збільшується кількість інтерфолікулярних острівців, зростає ФКІ та знижується ІНК. Пригнічувати активність ЩЗ можуть запальні процеси, вплив радіації, важкі метали, патологія гіпоталамо-гіпофізарної системи, висока концентрація неорганічного йоду, деякі лікарські засоби тощо [11]. При цьому в структурі ЩЗ знижується висота тироїдного епітелію, візуалізується щільний колоїд без резорбційних вакуолей, зростає внутрішній діаметр фолікулів, збільшується площа поперечного перерізу фолікулів і зменшується площа фолікулярного епітелію, знижується ФКІ та збільшується ІНК, зростає ширина сполучнотканинних тяжів [6, 7].

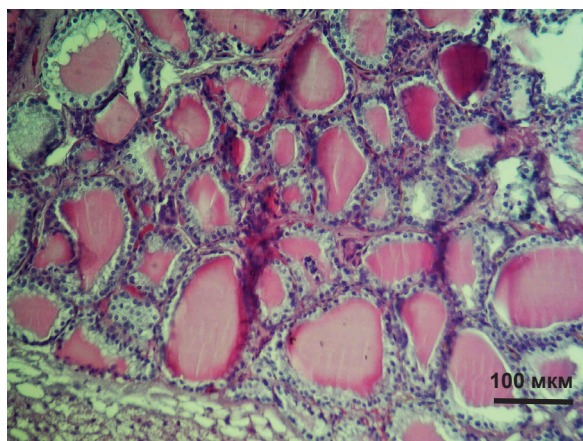
Цифрові результати обробляли методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

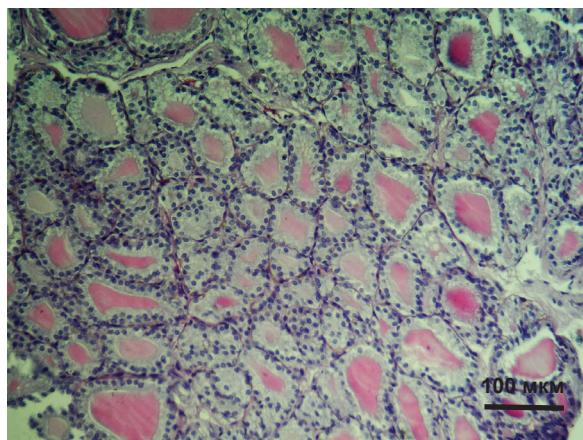
Показано, що після впливу ГГС (незалежно від режиму) маса та індекс ЩЗ залишаються на рівні контрольних значень.

На гістологічних зрізах у паренхімі ЩЗ щурів контрольної групи виявляли фолікули овальної форми, різних розмірів. Так, у центральній зоні вони були переважно середніми чи дрібними, а у периферичній – великими (рис. 1). У середньому площа поперечного перерізу фолікулів інтактної групи тварин становила 1288 мкм² (таблиця), а зовнішній і внутрішній діаметр фолікулів – 31 та 22 мкм відповідно.

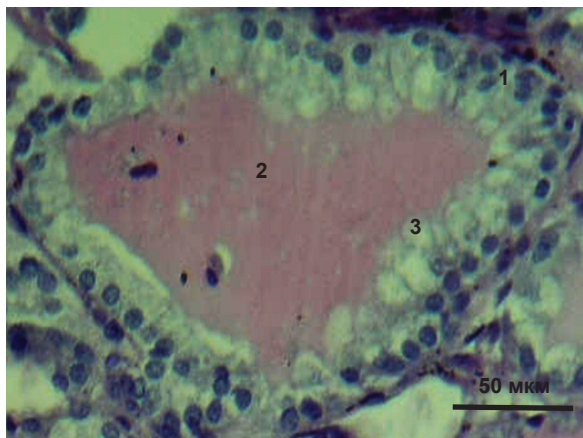
Після впливу ГГС фолікули в ЩЗ мали видовжену форму, переважно дрібного та середнього розміру (див. рис. 1). Площа фолікулів вірогідно зменшилася (на 23 %) лише після впливу ГГС I режиму (щодобова 30-хвилинна деоксигенація; див. таблицю). Зовнішній діаметр фолікулів при цьому залишався на рівні контрольних значень, а



а



б



в

Рис.1. Мікрофотографія щитоподібної залози інтактної тварини (а) та щура, який зазнавав впливу гіпоксичної газової суміші (б). Збільшення у 200 разів. На в – структура фолікула в активному функціональному стані після впливу гіпоксичної газової суміші: 1 – тироцити циліндричної форми; 2 – колоїд; 3 – резорбційні вакуолі. Збільшення у 400 разів. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином

внутрішній діаметр вірогідно знижувався на 14 % тільки після впливу ГГС I режиму (рис. 2). Зменшення середньої площі (переважно за рахунок посилення виведення гормонів і зменшення депонування колоїду) та внутрішнього діаметра фолікулів (за рахунок набуття тироцитами циліндричної форми) є одними з ознак підвищення функціонування залози (див. рис. 1,в) [7].

У фолікулах тироцити утворюють стінку і розміщуються в один шар на базальній мембрані, обмежуючи фолікул зовні. Форма тироцитів, залежно від функціонального стану, різна. Так, у ЩЗ інтактних щурів вони переважно кубічної форми, з висотою в середньому 4,5 мкм (див. рис. 2). Колоїд помірної щільності, має ділянки резорбції, що вказує на вивільнення гормонів. На периферії залози знаходяться великі фолікули, які містять тироцити пласкої форми. Колоїд у них щільний, без резорбційних вакуолей. Площа його поперечного перерізу в середньому становить 668 мкм² (див. таблицю).

У молодих щурів, що зазнавали впливу ГГС, фолікули мають кубічну та циліндричну форму. Циліндричні тироцити активно резорбують тиреоглобулін, виділяють активні гормони і секретують їх у кровеносне русло [7]. Висота тироцитів після впливу ГГС I та II режимів збільшується на 31 ($P < 0,05$) і 17 % відповідно порівняно з контролем (див. рис. 2). При цьому кількість колоїду різко зменшується, він стає пінистим, містить численні резорбційні вакуолі, його площа менша від контрольних значень на 15 % (див. таблицю).

Число тироцитів у фолікулі контрольної групи тварин у середньому становило 24. У фолікулі щурів, що зазнавали впливу ГГС, їх число збільшувалося на 17 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Проліферація тироцитів у фолікулах відбувається при підвищенні функціонального навантаження та посиленні процесів фізіологічної регенерації в ЩЗ [6].

До показників, які безпосередньо вказують на функціональний стан паренхіми ЩЗ відносять ФКІ та ІНК. ФКІ – відношення

Морфометричні показники щитоподібної залози 3-місячних щурів після впливу гіпоксичної газової суміші – ГГС (M±m, n=12)

Показники	Площа, мкм ²		
	фолікулів	колоїду	фолікулярного епітелію
Контроль	1288±111,9	668±25,8	620±39,9
ГГС I режиму	988±102*	567±34	572±26
ГГС II режиму	1234±118	565±28	669±46

*P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем.

площі фолікулярного епітелію до площі колоїду. У дослідних груп тварин він збільшився на 10 і 24 % після впливу ГГС I і II режимів відповідно (P<0,05; рис. 3). Як правило, функціональна активність залози прямо пропорційна відношенню об'єму епітелію і обернено пропорційна вмісту колоїду. Тому, це співвідношення можна вважати індексом активності ЩЗ.

ІНК – відношення середнього внутрішнього діаметра фолікула до подвійної висоти фолікулярного епітелію. У тварин, що зазнавали впливу ГГС I та II режимів ІНК знижувався на 27 (P<0,05) і 13 % відповідно (див. рис. 3). Це може бути одним із показників активації функціонального стану ЩЗ.

Крім фолікулів, у ЩЗ виділяють інтерфолікулярні острівці – скупчення тироцитів без порожнини, які у невеликій кількості

виробляють тиреоїдні гормони. За необхідності тироцити активуються, починають синтезувати колоїд і острівцеві перетворюються у фолікул. Вважається, що репаративна і фізіологічна регенерація фолікулярного епітелію відбувається за рахунок тироцитів, розміщених в інтерфолікулярних острівцях [7]. У щурів, які зазнавали впливу ГГС різних режимів, останні краще візуалізуються (ніж у контролі), кількість їх збільшується, що можна вважати ознакою активації функціонального та регенераторного стану ЩЗ.

Зовні ЩЗ оточена капсулою зі щільної волокнистої сполучної тканини, від якої в середину відходять тяжі (трабекули), що несуть кровonosні і лімфатичні судини, нерви, які ділять її на часточки. З віком, при пошкодженнях різного генезу чи інших змінах, зменшується маса паренхіми ЩЗ і

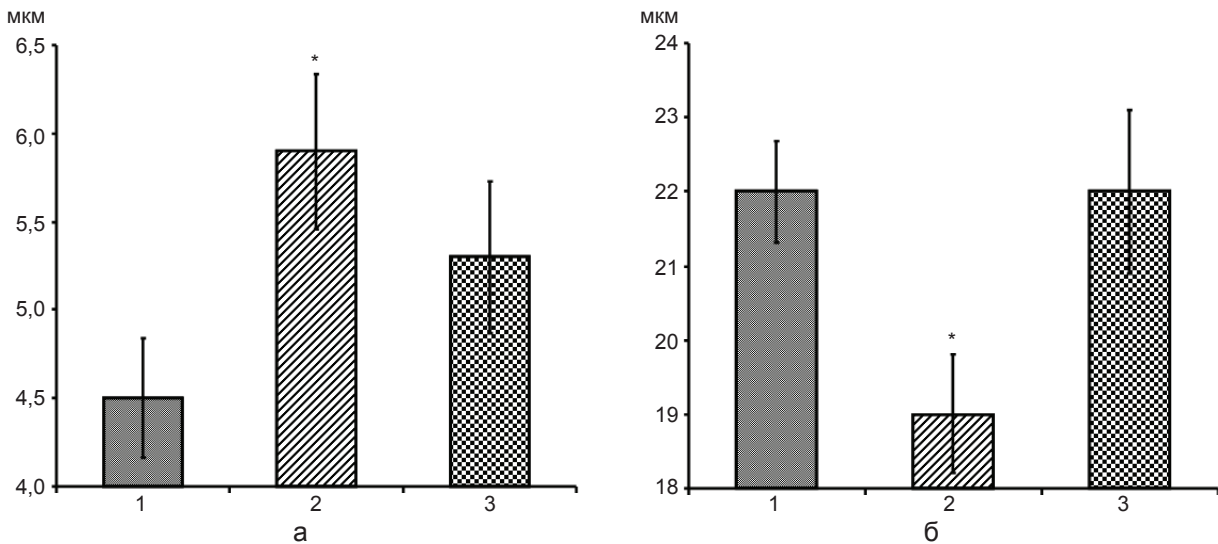


Рис. 2. Висота тироцитів (а) та внутрішній діаметр фолікулів (б) щитоподібної залози щурів: 1 – контроль, 2,3 – гіпоксична газова суміш I та II режимів відповідно. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

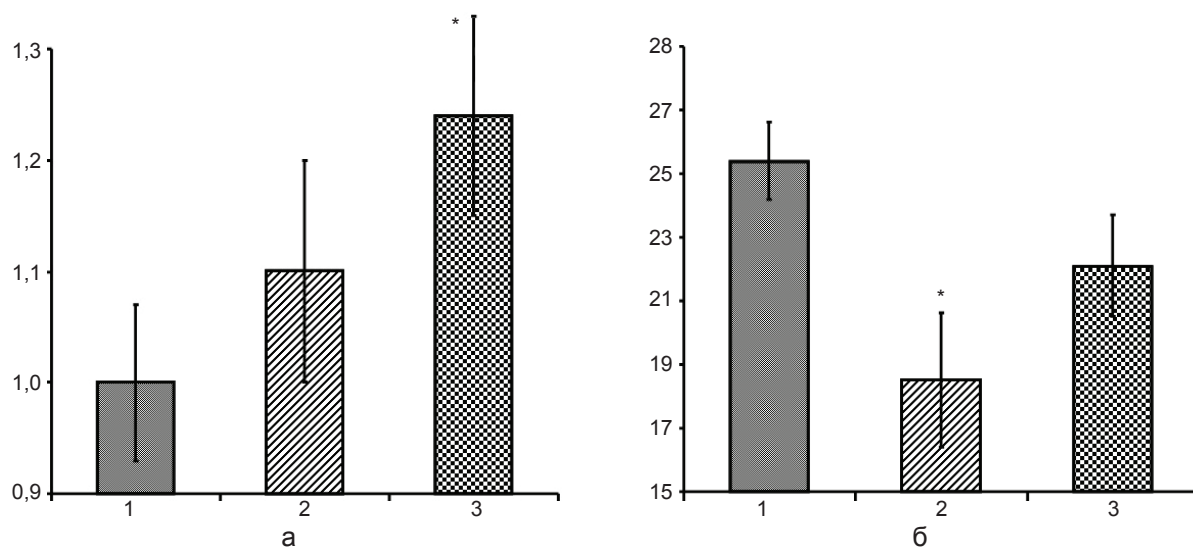


Рис. 3. Фолікулярно-колоїдний індекс – ФКІ (а) та індекс накопичення колоїду – ІНК (б) щитоподібної залози щурів: 1 – контроль, 2,3 – гіпоксична газова суміш I та II режимів відповідно. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

збільшується маса сполучної тканини (через розростання сполучнотканинних трабекул і міжфолікулярної сполучної тканини) [9]. У 3-місячних щурів, які зазнавали впливу ГГС I та II режимів, виявлено зниження середньої товщини сполучнотканинних трабекул на 41 і 26 % (P<0,05) відповідно порівняно з контролем (рис. 4). Це може вказувати на відносно збільшення маси паренхіми ЩЗ відносно маси сполучної тканини, що є показником інтенсифікації як функціональної, так і регенераторної активності залози.

Часто вплив гіпоксії розглядають як стимул до розвитку сполучнотканинних елементів в органах. Вірогідно, що гіпоксія високого ступеня може створювати такі ефекти, які спричиняють склерозування тканин. В нашому експерименті застосовувався саногенний рівень гіпоксії, який зменшив частку сполучнотканинних утворень у структурі ЩЗ.

Більшість дослідників вивчали стан ЩЗ під впливом гіпобаричної гіпоксії. Показано, що в умовах середньогір'я збільшується активність ЩЗ, а на великих висотах над рівнем моря і при більшому ступені кисневої недостатності її секреторна функція пригнічується [1, 8]. Виявлено, що після впливу пе-

реривчастої гіпобаричної ГГС підвищується функціональна активність залози внаслідок збільшення кількості функціонуючих капілярів, висоти тиреоїдного епітелію, вироблення тиреоїдних гормонів тощо [3, 15, 16]. Показано, що при диханні ГГС посилюється синтез гіпоксііндукованого фактора в ЩЗ, який стимулює утворення тиреоїдних гормонів. А останні беруть безпосередню участь в

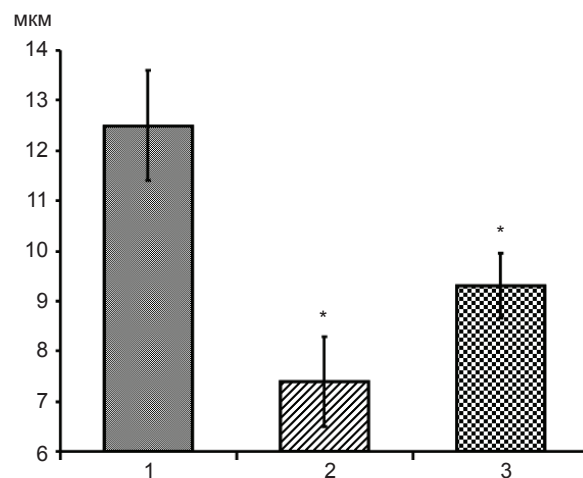


Рис. 4. Товщина сполучнотканинних трабекул щитоподібної залози щурів: 1 – контроль, 2,3 – гіпоксична газова суміш I та II режимів відповідно. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

індукції експресії гена еритропоетину [17].

Таким чином, проведене дослідження структури ЩЗ після впливу нормобаричних ГГС виявило морфологічні ознаки підвищення рівня її функціонування: зменшення середньої площі поперечного перерізу фолікулів і колоїду; зниження внутрішнього діаметра фолікулів і збільшення висоти тироїдного епітелію; зростання кількості тироцитів у фолікулі, резорбційних вакуолей та інтерфолікулярних острівців; підвищення ФКІ та зниження ІНК. Більшість показників активності функціонального стану паренхіми ЩЗ виразніше проявляються при I режимі подачі ГГС. ФКІ при цьому зростає лише на 10 %, а при II режимі ГГС підвищення ще більше – на 24 %. Тобто дозована нормобарична ГГС саногенного рівня посилює функціональну активність та процеси фізіологічної регенерації ЩЗ молодих тварин. Ці результати можуть мати не тільки теоретичне значення, але й становити певний практичний інтерес за потреби стимуляції функціональних процесів при гіпофункції ЩЗ.

Р.В. Янко

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МОЛОДЫХ КРЫС ПРИ ВЛИЯНИИ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Исследовали влияние гипоксической газовой смеси (ГГС; 10% кислорода в азоте) разных режимов на морфометрические показатели функциональной активности паренхимы щитовидной железы 3-месячных крыс. Показано уменьшение средней площади поперечного сечения фолликулов и коллоида, снижение внутреннего диаметра фолликулов и увеличение высоты тироидного эпителия, возрастание количества тироцитов в фолликуле, резорбционных вакуолей и интерфолликулярных островков, повышение фолликулярно-коллоидного индекса и снижение индекса накопления коллоида. Таким образом, дозированная нормобарическая ГГС саногенного уровня усиливает функциональную активность и процессы физиологической регенерации щитовидной железы молодых животных.

Ключевые слова: гипоксическая газовая смесь, щитовидная железа.

R.V. Yanko

THE INFLUENCE OF NORMOBARIC HYPOXIA ON THE MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF THYROID GLAND IN YOUNG RATS

We investigated the influence of hypoxic gas mixture (the different modes) on the morphometric indexes of thyroid gland functional activity in 3-month rats. It was shown a decrease in the size of follicles of middle area and the colloid and an increase in the amount of thyrocytes in a follicle, resorption vacuoles and interfollicular epithelium after exposure to hypoxic gas mixture (10% oxygen). We also detected an increase in a follicle-colloid index and a decrease in the colloid accumulation index. Thus, a dosed normobaric hypoxia intensifies the functional activity and physiological regeneration processes of thyroid gland in the young animals.

Key words: hypoxic gas mixture, thyroid gland.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В.А. Природная и инструментальная оротерапия. – Донецк: Заславский, 2012. – 304 с.
2. Березовський В.Я., Янко Р.В., Літовка І.Г., Заморська Т.М., Чака О.Г. Вплив дозованої нормобаричної гіпоксії на морфологічні показники стану паренхіми щитовидної залози // Укр. морфол. альманах. – 2011. – 9, №3. – С. 38–40.
3. Васильева Е.В. Влияние прерывистой гипобарической гипоксии на морфофункциональные изменения щитовидной железы у крыс в норме и при экспериментальной дисфункции: автореф. дисс. кандидата биологических наук: спец. 03.00.13 – Ульяновск, 2009. – 23 с.
4. Васильева Е.В., Тарарак Т.Я., Васильева Н.А., Балькин Н.В. Влияние прерывистой гипобарической гипоксии на морфофункциональные изменения щитовидной железы // Вестн. Тверского гос. ун-та. Серия: Биология и экология. – 2008. – №8. – С. 8–13.
5. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
6. Забродин В.А. Морфология щитовидной железы и методы ее изучения: методические рекомендации. – Смоленск: СГМА, 2005. – 37 с.
7. Никишин Д.В. Морфология и методы исследования щитовидной железы: методические рекомендации. – Пенза: Информ.-издат. центр ПГУ, 2008. – 64 с.
8. Сабанова Р.К. Изменение ионов йода в щитовидной железе при интервально-ритмической гипоксии // Успехи совр. естествознания. – 2006. – № 3. – С. 43–44.
9. Хем А. Гистология Т. V. – М: Мир., 1983. – 294 с.
10. Buffenstein R., Woodley R., Thomadakis C., Daly T.J., Gray DA. Cold-induced changes in thyroid function in a poikilothermic mammal, the naked mole-rat // Amer.

- J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – 280, №1. – P.149–155.
11. Joe G., Shashank R. J. Drugs and thyroid // JAPI. – 2007. – 55. – P. 215–223.
 12. Kolchinskaya A.Z. Mechanisms of interval hypoxic training effects // Hypoxia Med. J. – 1993. – 1. – P. 5.
 13. Monazani F., Lawler J.M., Powers S.K. Thyroid hormone action on intermediary metabolism // Can. J. Appl. Physiol. – 1998. – 23, № 1. – P. 23–55.
 14. Powell F.L., Garcia N. Physiological effects of intermittent hypoxia // High. Lt. Med. Biol. – 2002. – № 1. – P. 125–136.
 15. Sawhney R.C., Malhotra A.S. Thyroid function during intermittent exposure to hypobaric hypoxia // Int. J. Biometeorol. – 2010. – 34, №3. – P. 161–163.
 16. Tararak T.J., Vasileva V.V., Balykin M.V. Restructuring of the thyroid gland in primary hypothyroidism under the influence of intermittent hypobaric hypoxia // Bul. Exp. Biol. and Med. – 2010. – 145, № 5. – P. 647–649.
 17. Yaluan M, Freitag P., Zhou J. Thyroid hormone induces erythropoietin gene expression through augmented accumulation of hypoxia-inducible factor-1a // Regu Physiol. – 2004. – 287, № 3. – P. 600–607.

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

Матеріал надійшов
до редакції 19.10.12

А.І. Березнякова, О.Д. Жемела

Здатність до деформації мембран еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії

Використовуючи сучасні та класичні методи вивчення осмотичної резистентності еритроцитів і білків мембрани червоних клітин крові встановлено, що здатність до деформації еритроцитів в умовах гемічної гіпоксії змінюється залежно від віку тварин: максимальна здатність спостерігається у щурят передпубертатного періоду (40,2 %), мінімальна – в групі старих щурів (19,7 %). Вікові зміни фізико-хімічних показників мембран еритроцитів полягають у збільшенні в'язкості ліпідного бішару (індекс мікров'язкості знижується у старих щурів порівняно з молодими статевозрілими тваринами на 69,5 %) і підвищенні вмісту скелетних білків (спектрину на 53,0 %), що є визначальним для зниження здатності еритроцитів деформації. Встановлено взаємозв'язок вікових змін деформації мембран еритроцитів і стану регіонарної мікроциркуляції: у старих щурів порівняно з молодими знижується об'єм перфузії на 43,8 %, об'єм фракції еритроцитів, які проходять в одиницю часу через мікросудини – на 59,3 %, індекс питомого поглинання кисню в тканинах на 6,6 %, а індекс перфузійного насичення киснем на 50,0 %.

Ключові слова: мембрана еритроцитів, гіпоксія, здатність до деформації.

ВСТУП

Гіпоксія – це унікальний патологічний процес, який супроводжує та визначає розвиток багатьох патологій. Незважаючи на явні відмінності пускових механізмів формування гіпоксії екзогенного та ендogenous походження, метаболічні зсуви в умовах нестачі кисню стереотипові [1, 15]. Вони пов'язані з енергодефіцитом і посиленням генерації активних форм кисню (АФК), які в подальшому призводять до мембранодеструкції, надлишкової ліпопероксидації, окисної модифікації білків, запуску запрограмованої смерті тощо [4]. Гіперпродукція АФК зумовлює порушення гомеостазу організму, пошкодження цитоскелета, деградацію мембранних фосfolіпідів [9]. Деструктивні процеси в мембранах еритроцитів призводять до порушення їх проникності, стійкості до кислотного гемолізу, розвитку аутогемолітичних процесів і виходу еритроцитарних ферментів у плазму крові [7].

Однією із найважливіших властивостей еритроцита є його здатність до деформації. Ця властивість допомагає йому під час проходження крізь капіляри не змінювати об'єму та площі поверхні. Здатність еритроцитів до деформації має важливе значення для підтримки оптимальних процесів дифузії газів в усьому мікроциркуляторному руслі різних органів. При цьому велике значення для цієї характеристики еритроцитів мають в'язкоеластичні властивості мембрани, які визначають стан спектринно-активного комплексу та його взаємодію з іншими структурними елементами мембрани [2, 3, 17]. Підмембранна сітка, яка складається з довгих та відносно гнучких ниток білка спектрину й актину, забезпечує стійкість мембрани, а розчин гемоглобіну (вміст цитоплазми, який подібний до рідини), не перешкоджаючи деформації [12]. З віком деформація еритроцитів у нормальних фізіологічних умовах зменшується, збільшується їх здатність до агрегації, знижується функція дихання, що,

за даними деяких авторів [10], впливає на стан системи мікроциркуляції. Останнім часом широко обговорюються механізми деформації еритроцитів, оскільки кров чутливо реагує на зміни будь-якого метаболічного процесу в організмі: еритроцити першими відповідають порушенням здатності до деформації своєї мембрани під впливом факторів зовнішнього та внутрішнього середовища [7], особливо під впливом ксенобіотиків різної природи, насамперед нітритів. Проникаючи через мембрану еритроцитів, вони викликають метгемоглобінемію, яка супроводжується розвитком гемічної та гістотоксичної гіпоксії [13]. Нітри-ти ініціюють процеси вільнорадикального окиснення із залученням білкових і ліпідних компонентів клітинних мембран [5, 9].

Мета роботи – вивчити морфофункціональний стан мембран еритроцитів та їх здатність до деформації у щурів різного віку при гіпоксії.

МЕТОДИКА

Експерименти проведені на білих нелінійних щурах-самцях різного віку. 1-ша група – щурята передпубертатного періоду масою 50–60 г, 2-га – молоді щури масою 100–120 г, 3-тя група – зрілі тварини масою 200–220 г та 4-та – старі щури масою 350–400 г. Досліджували кров та еритроцити щурів різних вікових груп. Тварин утримували в умовах раціону віварію. Забір крові проводили пункцією хвостової вени через 10–12 год після останнього прийому їжі. Як антикоагулянт використовували K_2EDTA у дозах, розрахованих для різних вікових груп за Риболовлевим [11] (6,17, 11,31, 20,57, 36,0 мг). Еритроцити відмивали розчином низької іонної сили Liss (виробник ТОВ «Гематолог») і розводили у співвідношенні 1:2000.

Здатність деформації еритроцитарної мембрани визначали за методикою «лазерний пінцет» [8] за допомогою вимірювання відносного подовження еритроцитів під впливом лазерного пучка з довжиною хвилі опромінювання 1,08 мкм та максимальною

вихідною потужністю близько 200 мВт. Обрана довжина хвилі давала змогу потрапити в смугу прозорості еритроцитів і мінімізувати негативний вплив випромінювання на об'єкт. Швидкість пересування плями оптичної пастки становила 15–20 мкм/с. Пучок від лазера проходив через коліматор і спрямовувався в об'єкти мікроскопа МІН-8 (збільшення в 100 разів). Результати експериментів фіксували на ПМЗ-камеру, підключену до комп'ютера. Розмір еритроцитів визначали за тіньовим контуром, їхню деформацію – за допомогою програми контурного аналізу клітин.

Мікров'язкість мембран досліджували на спектрофлуориметрі «СМ-22» (Білорусь) за флуоресценцією зонда пірену [2]. Індекс мікров'язкості мембран розраховували як співвідношення флуоресценції пірену при довжині хвилі 480 і 390 нм [6, 14]. Осмотичну резистентність еритроцитів визначали за допомогою модифікованого методу Петрова (1985) з використанням антибіотика амфотерицину Б (АМТБ). Проби інкубували протягом 15 хв при 37°C, потім центрифугували при 3000 об/хв 5 хв, в супернатанті визначали концентрацію гемоглобіну при довжині хвилі 540 нм, розраховували відсоток гемолізованих еритроцитів.

Для проведення досліджень білків мембрани еритроцитів відмивку тіней червоних клітин крові здійснювали за методом Tannert [16]. Електрофорез білків мембран проводили в присутності додецилсульфату натрію (ДДС-Na) в градієнті щільності поліакриамідного гелю від 13,5 до 5 % упродовж 5,5 год. Гелі фарбували КумассіG 250 бриліантовим блакитним, вимочуючи протягом 12 год в розчині барвника-фіксатора, що містив 45 % метанолу і 25 % оцтової кислоти; диференціювали 10%-ю оцтовою кислотою та денситометрували («DM 2120»; Білорусь). Кількісно оцінювали вміст окремих білкових фракцій методом зважування піків. Гемічну гіпоксію викликали внутрішньоочеревинним введенням нітриту натрію в дозі 5 мг/100 г [13].

Усі дослідження проводили згідно з національними «Загальноетичними принципами

експериментів на тваринах» (Україна, 2011), узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та схваленими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Усі маніпуляції, які викликали біль, проводили під барбаміловим наркозом [13].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6.0 з використанням критерію t Стьюдента та кореляційного аналізу. Результати вважали дійсними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що еритроцити, які здатні до деформації понад 40 % від початкового діаметра, значно ефективніше беруть участь у газообміні та не погіршують реологічні властивості крові (плинність, в'язкість), що дало змогу нам вважати еритроцити, котрі збільшують свій діаметр понад 40 % при їх деформації в лазерній пастці вважати «еластичними», а ті, що не мають подібного ефекту – «ригідними». Аналіз отриманих результатів показав, що з віком у щурів знижується ступінь деформації мембран еритроцитів. Так, у щурів усіх груп до 90 % від свого початкового діаметра при деформації змінювали свій діаметр 88,0; 84,5; 65,7 і 50,2 % клітин відповідно. Водночас паралельно зі збільшенням віку тварин у пробах крові підвищувалася кількість більш «ригідних» еритроцитів. Наприклад, кількість червоних клітин, які давали приріст діаметра до 40 % від початкового, збільшувалася і становила 12,0; 15,5; 34,3 і 49,8 % відповідно для 1–4 груп, а тих, що дають збільшення до 50 % – від 5,2 до 19,6 %. Таким чином, у периферичній крові щурів містяться еритроцити з різною здатністю до деформації. Зі збільшенням віку тварин знижується ступінь деформації мембран еритроцитів.

Як видно з табл. 1, у тварин 1-ї групи зафіксовані найбільш низькі значення індексу перфузійного насичення киснем в мікрокро-

вотоці – 4,8 ум. од., що свідчать про активне засвоєння кисню з їхньої перфузійної крові. Це підтверджується високими значеннями індексу питомого споживання кисню тканинами – 1,28 ум. од. та перфузії (M) і відносного об'єму фракції еритроцитів, що проходять через мікросудини (Vr).

Аналогічні показники відмічені нами і у щурів 2-ї групи. На відміну від них у дорослих тварин 3-ї групи виявлено значне (на 21,2 %, $P < 0,05$) зниження середнього рівня перфузії. При цьому достовірно зменшувався об'єм фракції еритроцитів, які проходили через мікросудини (на 35,0 %, $P < 0,05$). Ці зміни супроводжувалися зниженням ефективності газообміну у цієї групи щурів: на 24,5 % ($P < 0,05$) збільшувався індекс перфузійного насичення киснем у мікрокровотоці і на 3,3 % ($P < 0,05$) знижувався індекс питомого споживання кисню у тканинах. У щурів 4-ї групи об'єм перфузії зменшувався порівняно з показниками 1 та 2-ї груп на 43,8 % ($P < 0,05$), об'єм фракції еритроцитів, які проходили через мікросудини, на 59,3 %, а індекс питомого споживання кисню в тканинах на 6,6 % ($P < 0,05$). При цьому, так само як і у тварин 3-ї групи, у них збільшувався індекс перфузійного насичення кисню в мікрокровотоці на 50,0 % ($P < 0,05$).

Методом ЛФД було встановлено, що у щурів, зі старінням, особливо 4-ї групи була значно підвищена (на 21,9 %, $P < 0,05$) порівняно з 1-ю групою «червона» ендогенна флуоресценція при $\lambda = 600\text{--}800$ нм ($\lambda = 630$ нм), що відповідає ендогенним порфіринам та/або їх комплексам з білками. Деякий внесок у сумарний сигнал ендогенної флуоресценції можуть робити також і ліпофусцини, які мають у цій ділянці тривалий «шлейф» спектра люмінесценції. Ліпофусцин часто вважають індикатором старіння клітин організму людини. Крім того, як порфірини, так і ліпофусцин є маркерами наявності хронічної гіпоксії. Отримані результати свідчать, що зміни структурно-функціональних властивостей еритроцитів можуть мати важливе значення

Таблиця 1. Стан периферичної мікроциркуляції у щурів різних вікових груп при гіпоксії ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Групи			
	1-ша, щурята передпубертатного періоду	2-га, молоді щури	3-тя, зрілі щури	4-га, старі щури
Середнє значення перфузії (M), перф. од.	16,1 \pm 0,5	16,0 \pm 0,6	13,2 \pm 0,4*	11,2 \pm 0,4**
Насиченість киснем артеріальної крові (SO ₂), %	77,6 \pm 1,1	78,3 \pm 1,2	80,2 \pm 1,3	80,6 \pm 1,4
Насиченість киснем венозної крові (SpO ₂), %	99,9 \pm 0,1	99,8 \pm 0,2	98,3 \pm 0,1	97,1 \pm 0,1
Відносний об'єм фракції еритроцитів (Vr), %	19,6 \pm 0,3	19,3 \pm 0,4	14,3 \pm 0,3**	12,3 \pm 0,3**
Індекс перфузійного насичення киснем в мікрокровотоці (SOM=SO ₂ /M), ум.од.	4,8 \pm 0,1	4,9 \pm 0,3	6,1 \pm 0,1*	7,2 \pm 0,1**
Індекс питомого споживання кисню в тканині (U=SpO ₂ /SO ₂), ум.од.	1,28 \pm 0,01	1,27 \pm 0,02	1,23 \pm 0,02*	1,20 \pm 0,01*
Показник шунтування, ум.од.	1,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2

*P < 0,05 порівняно з показниками 1–2-ї групи; **P < 0,05 – 1–3-ї групи.

в транспорті газів і є одним із факторів, що впливають на газообмін на рівні мікрогемодинаміки в залежності від віку.

Відома залежність здатності до деформування еритроцитів від в'язкості цитоплазми та стану мембрани. Про стан в'язкості ліпідного бішару судили за змінами індексу мікров'язкості, що визначали за допомогою ліпідного зонда пірену:

1-ша група	0,88 \pm 0,02 ум.од.
2-га група	0,84 \pm 0,03 ум.од.
3-тя група	0,62 \pm 0,01* ум.од.
4-та група	0,52 \pm 0,02* ум.од.

*P < 0,05 порівняно з 1-ю групою.

Було зареєстровано достовірне (P<0,05) зменшення індексу мікров'язкості мембран еритроцитів, що корелює ($r=0,97$) з віком щурів та динамікою зниження здатності деформування червоних клітин крові. Слід зазначити, що статистично значиме зниження мікров'язкості ліпідів мембран еритроцитів відбувалося саме у групі 3 – на 35,5 % (P<0,0001), а в групі 4 – це зниження становило 19,2 % (P<0,05).

Як додатковий критерій стану ліпідного бішару визначали ступінь гіпотонічного

гемолізу еритроцитів за наявності антибіотика АМТБ. Останній викликав достовірно (P<0,05) більший ступінь гемолізу еритроцитів у 3-й і 4-й групах тварин порівняно з 1-ю:

1-ша група	16,9 \pm 0,2 %
2-га група	24,3 \pm 0,1 %
3-тя група	49,9 \pm 0,3 %
4-та група	62,2 \pm 0,7* %

*P < 0,05 порівняно з 1-ю групою.

Між чутливістю еритроцитів до АМТБ і індексом мікров'язкості встановлений негативний кореляційний зв'язок ($r=-0,94$), тобто чим більша мікров'язкість ліпідного бішару, тим нижча осмотична резистентність.

Крім ліпідної складової, нами було вивчено вікові кількісні зміни білкової складової мембран еритроцитів. Результати дослідження наведені в табл. 2.

Відносний вміст високомолекулярних скелетних білків спектринів (фракція 13) в 2-й віковій групі статистично не відрізнявся від 1-ї. Достовірне підвищення вмісту на 20,5 % (P<0,05) порівняно зі щурами 1-ї групи було відмічено у тварин 3-ї групи, у тварин 4-ї групи порів-

Таблиця 2. Вміст білків у мембранах еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії (M±m, n=10)

Групи	Вміст білкових фракцій у мембранах еритроцитів, %			
	глутатіон-S-трансфераза	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа	актин	спектрин
1-ша	4,26±0,1	4,36±0,2	8,45±0,2	24,61±0,5
2-га	4,11±0,3	3,81±0,2	8,43±0,3	25,35±0,4
3-тя	2,32±0,1*	2,75±0,5*	8,36±0,6	29,65±0,8*
4-та	1,32±0,3*	2,37±0,2*	6,34±0,6*	38,13±0,6*

няно зі щурами 1-ї та 2-ї груп це збільшення було в середньому 52,7 % ($P<0,05$). Відносний вміст білкових фракцій з молекулярною масою менше, ніж 50 кДа у щурів 3-ї та 4-ї груп, навпаки, знижувався. Так, зниження вмісту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, важливого ферменту енергетичного обміну еритроцитів, у 1,6 і 1,8 раза ($P<0,05$) у щурів 3- та 4-ї груп відповідно порівняно з показниками 1-ї групи може порушити енергетичний обмін еритроцитів. Аналогічно знижувався вміст ферменту глутатіон-S-трансферази. Непряме підтвердження цього – збільшення відсотка гемолізованих еритроцитів за наявності АМТБ. Вміст актину був достовірно зниженим ($P<0,05$) тільки у щурів 4-ї групи. Одночасне зниження вмісту білкових фракцій з відносно низькою молекулярною масою та локалізованих на внутрішньому боці мембрани еритроцитів може бути однією з причин структурно-функціональних вікових змін мембран червоних клітин крові.

Таким чином, отримані результати свідчать, що при старінні зменшується здатність мембран еритроцитів до деформації, що викликається збільшенням їхньої в'язкості, зниженням осмотичної резистентності на тлі збільшення вмісту високомолекулярних білків спектринів і зменшення низькомолекулярних білків цитоскелета та порушення білково-ліпідних взаємозв'язків.

ВИСНОВКИ

1. Здатність еритроцитів до деформації в умовах гемічної гіпоксії змінюється в залежності від віку тварин: максимальна спостерігається

у щурят предпубертатного періоду (40,2 %), мінімальна – в групі старих щурів (19,7 %).

2. Вікові зміни мембран еритроцитів в умовах гемічної гіпоксії полягають у збільшенні в'язкості ліпідного бішару (індекс мікров'язкості знижується у старих щурів порівняно з молодими статевозрілими тваринами на 69,5 %) і підвищенні відсотка скелетних білків (спектрину на 53,0 %), що визначає зниження здатності еритроцитів до деформації.

3. Встановлено взаємозв'язок вікових змін здатності мембран еритроцитів до деформації та стану регіональної мікроциркуляції: у старих щурів порівняно з молодими знижується об'єм перфузії на 43,8 %, об'єм фракції еритроцитів, які проходять в одиницю часу через мікросудини, на 59,3 %, індекс питомого поглинання кисню в тканинах на 6,6%, а індекс перфузійного насичення киснем на 50,0 %.

А. И. Березнякова, О.Д. Жемела

СПОСОБНОСТЬ К ДЕФОРМАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Используя современные и классические методы изучения осмотической резистентности эритроцитов и белков мембраны красных кровяных клеток установлено, что деформируемость эритроцитов в условиях гемической гипоксии изменяется в зависимости от возраста животных: максимальная способность наблюдается у крысят предпубертатного периода (40,2 %), минимальная – в группе старых крыс (19,7 %). Возрастные изменения мембран эритроцитов в условиях гипоксии заключаются в увеличении вязкости липидного бислоя (индекс микровязкости снижается у старых крыс в сравнении с молодыми половозрелыми животными на 69,5 %) и повышении процентного содержания скелетных белков (спектрин на 53,0 %), что определяет снижение деформируемости

эритроцитов с возрастом. Установлена взаимосвязь возрастных изменений деформируемости мембран эритроцитов и состояния регионарной микроциркуляции: у старых крыс в сравнении с молодыми снижается объем перфузии на 43,8 %, объем фракции эритроцитов, проходящих в единицу времени через микрососуды, на 59,3 %, индекс удельного потребления кислорода в тканях на 6,6%, а индекс перфузионного насыщения кислорода на 50,0 %.

Ключевые слова: мембрана эритроцитов, гипоксия, способность к деформации.

A. I. Bereznyakova, O.D. Jemela

DEFORMABILITY OF THE ERYTHROCYTES MEMBRANE IN RATS OF DIFFERENT AGE IN HYPOXIA

Using modern ("laser tweezers", low ionic strength Liss, definition of microviscosity of erythrocyte membranes by fluorescence probe pyrene) and classical methods of investigation the osmotic resistance of red blood cells and protein membrane of red blood cells, the authors have established that deformation of the red blood cells in hemic hypoxia varies depending on the animals' age. The maximum capacity of red blood cells to deform was detected in rats of prepubertal period (40.2%). In the group of old rats this parameter reached the minimum level (19.7%). Age changes in erythrocyte membranes during hypoxia are manifested in an increase in the viscosity of the lipid bilayer (microviscosity index reduced in old rats compared with young adult animals by 69.5%) and an increase in the percentage of skeletal protein spectrin (by 53.0%). These changes determine the reduction in deformation capacity of red blood cells. The relationship between the age-related changes of erythrocyte membrane deformation and the state of regional microcirculation has been determined. In old rats a perfusion volume is reduced by 43.8%, the fractional volume of red blood cells passing per unit time through microvessels reduced by 59.3%, the proportion of oxygen consumption in tissues decreased by 6.6% and the perfusion of oxygen saturation decreased by 50.0%.

Key words: the membrane of red blood cells, hypoxia, deformability.

National Pharmaceutical University, Kharkiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Архипенко Ю.В., Сазонова Т.Г. Патофизиологические аспекты новых форм адаптации к гипоксии // Клінін. та експерим. патологія. – 2004. – 3, № 2. – С. 94.
- Белкин А.В., Марьянских В.В. Исследование вязко-эластических свойств мембран эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности и их реакция на стрессы различной этиологии // Вестн.

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

- Тюмен. гос. ун-та. – 2007. – № 3. – С. 234–239.
- Бобынцева О.В. Количественное содержание липидов и белков клеточных мембран эритроцитов и их корреляционные взаимосвязи у человека : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Курск, 2006. – 163 с.
- Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клеток // Соросов. образоват. журн. Биология. – 2000. – № 9. – С. 2–9.
- Горис А.П. Морфофункциональные особенности эритроцитов у лиц различных возрастных групп : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2012. – 16 с.
- Добрецов Г.Е. Физико-химические исследования компонентов крови с помощью специальных флуоресцентных зондов // Вестн. Рос. академии мед. наук. – 2009. – № 10. – С. 15–19.
- Коркушко О. В., Иванов Л. А., Шатило В. Б. Особенности тканевого кислородного обмена и окислительных процессов у долгожителей // Успехи геронтологии. – 2012. – № 2. – С. 255–266.
- Коробцов А.В., Котова С.П., Лосевский Н.Н. Применение лазерного пинцета для изучения механических свойств эритроцитов // Известия Самар. науч. центра Рос. академии наук. – 2009. – 11, № 3. – С. 76–81.
- Лесникова Л.Н. Стрессорные изменения физиологических свойств эритроцитов и их коррекция с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2006. – 22 с.
- Михайлов П.В., Муравьев А.А., Масленникова Ю.Л., Круглова Е.В. Микроциркуляция и реологические свойства крови у лиц с разным уровнем аэробной работоспособности // Ярослав. пед. вестн. – 2010. – № 3. – С. 66–70.
- Рыболовлев Ю.П., Сидяров Д.П., Афонин Н.И. Перерасчет активности константы биологической активности. – В кн.: Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм. – М. : Мед. книга, 1981. – С. 9.
- Свербиль В.П., Захаров С.Д. Эритроциты в сдвиговом потоке: механизмы деформируемости, методы изменений, медицинские применения // Математика. Компьютер. Образование: Сб. трудов XV междунар. конф., под. общей ред. Г.Ю. Ризниченко. – Ижевск : Науч.-изд. центр «Регулярная и хаотическая динамика». – 2008. – Т. 3. – С. 123–130.
- Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – 352 с.
- Федорова З.Д., Котовщикова М.А., Бессмельцев С.С., Попова Т.И. Об определении индекса деформируемости эритроцитов // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 732–735.
- Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia // Amer. J. Pathol. – 2010. – 162, № 5. – P. 1865–1872.
- Tanner T.C., Lux K. Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple test of cell deformability // Acta boil. med. germ. – 1981. – 40, № 2. – P. 739–742.
- Ward A. D., Berry M. G. Optical sculpture: controlled deformation of emulsion droplets with ultralow interfacial tensions using optical tweezers // Chem. Commun. – 2006. – 12, № 5. – P. 4515–4517.

Матеріал надійшов до редакції 18.03.2013

Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, І.Є. Юрчук

Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату

досліджували зв'язок між змінами функціонального стану клубової кишки, складом її мікрофлори та секреторною активністю клітин Панета. Введення лінкоміцину спричиняло зменшення загальної кількості бактерій-симбіонтів і появу представників умовно-патогенної мікрофлори. Відмічалися статистично незначущі зміни швидкості транзиту кишкового вмісту та порушення бар'єрної функції кишкового епітелію. Останній характеризувався наявністю ознак запалення. Введення індометацину та метотрексату призводило до суттєвих змін показників функціонального стану тонкої кишки щурів. Швидкість транзиту кишкового вмісту при введенні індометацину зростала на 30 %, а при введенні метотрексату, навпаки, зменшувалася на 90 %. Здатність адсорбувати вітальний фарбник епітелієм клубової кишки в обох випадках посилювалася на 32 та 51 % відповідно, що свідчить про погіршення його бар'єрної функції. При цьому відбувалися суттєві зміни у складі мікрофлори клубової кишки: зменшення кількості симбіонтної та появу умовно-патогенної мікрофлори, транслокація бактерій до поверхні клітин слизової оболонки, про що можна судити за бактеріологічними посівами зіскрібків слизу та гомогенатів тканини кишки. Було встановлено, що в тварин усіх трьох дослідних груп зменшувався вміст у секреторних гранулах клітин Панета катіонних білків і цинку. Отримані результати можуть свідчити про те, що зміни балансу між симбіонтною та умовно-патогенною мікрофлорою є фактором, який робить суттєвий внесок в ушкодження тканини кишки, а також викликає активацію секреторної функції клітин Панета.
Ключові слова: дисбактеріоз, ентерит, катіонні білки, клітини Панета, цинк.

ВСТУП

Дослідження останніх років показали, що клітини Панета – це важлива ланка місцевого неспецифічного імунітету, оскільки їх секреторні гранули містять значну кількість катіонних білків (дефенсинів), які відіграють ключову роль у забезпеченні антимікробних властивостей гранулоцитів та епітеліальних тканин [10, 13, 25]. Продукція дефенсинів значною мірою підвищується у відповідь на дію різноманітних стимулів, у тому числі бактерій і прозапальних цитокінів (інтерлейкінів – ІЛ – ІЛ-1 β , ІЛ-6 і фактора некрозу пухлин α – ФНП- α). Останнім часом також

з'явилися свідчення про наявність двонаправленого зв'язку між клітинами імунної системи та клітинами Панета. Оскільки в останніх окрім α -дефенсинів, які до того ж є хемоатрактантами для лейкоцитів та індукують експресію прозапальних генів, синтезуються такі регулятори запалення, як секреторна фосфоліпаза А2 і ФНП- α [25, 32], а також ціла низка інших біологічно активних молекул, зокрема епідермальний фактор росту, α -1 антитрипсин, простагландини [10, 25, 26]. Це дає змогу зробити припущення про багатофункціональну роль клітин Панета, які можуть не тільки забезпечувати антимікробний захист слизової оболонки, а

© Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, І.Є. Юрчук

ще й впливати на розвиток та функціонування стовбурових клітин тонкої кишки.

Також характерною ознакою клітин Панета є те, що їх секреторні гранули містять велику кількість цинку [2–4, 9], де він бере участь у депонуванні протеїнів. Однак подальша доля цинку, що звільняється у позаклітинний простір з гранул клітин Панета, не встановлена. Варто зауважити, що поза клітинами він може чинити пряму антимікробну дію або виступати сигнальною молекулою, оскільки в деяких працях показана роль цинку як вторинного посередника [37].

У зв'язку із доведеною роллю клітин Панета у антимікробному захисті тонкої кишки актуальною науковою проблемою, на нашу думку, є дослідження їх функціонального стану та стану кишки в цілому, із врахуванням змін складу кишкової мікрофлори. Саме це визначило мету нашої роботи: дослідження функціонального стану клубової кишки та клітин Панета, а також змін мікрофлори кишки при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату. Для досягнення поставленої мети нами були сформульовані наступні завдання: дослідити рухову та бар'єрну функції тонкої кишки, мікроморфометричні показники кишкового епітелію, вміст катіонних білків і цинку в секреторних гранулах клітин Панета на фоні змін у складі мікрофлори тонкої кишки щурів після введення зазначених вище речовин.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використано 56 щурів обох статей віком 3–4 міс, масою 240–260 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію, доступ до води та їжі не обмежували. Перед початком експериментів досліджень тварини були розділені на чотири групи: контрольну та три дослідні, по 14 тварин у кожній. При проведенні досліджень дотримувались усіх правил і норм роботи із лабораторними тваринами [1].

Щури першої контрольної групи отримували антибіотик лінкоміцину гідрохлорид

у дозі 60 мг/кг із питною водою протягом 5 днів [6, 22]. Щури другої групи отримували індометацин у дозі 2,5 мг/кг, підшкірно, третьої групи – метотрексат в дозі 20 мг/кг, внутрішньоочеревинно [21, 36]. Тварин, які отримували лінкоміцин виводили із дослідження через одну на 6-ту добу, а тварин, що отримували індометацин і метотрексат – на 2-гу добу після введення препаратів.

Функціональний стан кишки оцінювали за допомогою трьох показників. По-перше, досліджували швидкість транзиту кишкового вмісту із застосуванням методики, запропонованої Hui-Bin із співавт. [20]. Щурам інтрагастрально вводили 10%-ву суспензію активованого вугілля у 1%-му розчині желатину в об'ємі 1,5 мл. Через 30 хв тварин виводили з дослідження та виміряли дистанцію, яку пройшло активоване вугілля від пілоричного сфінктера шлунка до більш каудального відділу кишки. Отримані результати виражали як відсоткове відношення до загальної довжини тонкої кишки.

По-друге, оцінювали бар'єрну функцію кишкового епітелію за допомогою методу, основанийого на його здатності адсорбувати вітальні фарбники [24]. Щурам під ефірною анестезією робили лапаротомію, виділяли ізольовану кишкову петлю, в яку за допомогою шприца вводили 0,3 мл 2%-го розчину нігрозину. Стан анестезії підтримували протягом 60 хв, після чого тварин виводили з дослідження. Відрізок кишки вивертали та промивали у 6 ммоль/л розчині ацетилцистеїну для повного видалення слизу та зв'язаного із ним фарбника. Відміту тканину висувували при 37 °С, зважували та екстрагували нігрозин за дистильованою водою (3 мл) на водяній бані із температурою 50 °С протягом 15 хв. Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв упродовж 10 хв, супернатант фотометрували за допомогою фотоколориметра КФК-3 при довжині хвилі 750 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см проти холостої проби, якою був екстракт незабарвленого відрізка кишки,

отриманий у тих самих умовах. Одночасно проводили калібрувальну пробу (0,002%-й розчин нігрозину). Розрахунок вмісту фарбника в екстракті кишки знаходили за методом пропорцій. Результат вимірювань виражали у мікрограмах екстрагованого нігрозину на грам сухої тканини кишки.

По-третє, досліджували мікроморфометричні показники кишкового епітелію: висоту та ширину кишкових ворсинок, глибину кишкових крипт, наявність морфологічно змінених ворсинок (на основі аналізу 100 ворсинок, що найменше у 10 полях зору несуміжних зрізів), кількість келихоподібних клітин і клітин Панета. Також підраховували кількість лейкоцитів у полі зору мікроскопа.

Для цитохімічного визначення вмісту катіонних білків і цинку в клітинах Панета тканину кишки фіксували у нейтральному формаліні та холодному ацетоні протягом 24 год. Після цього її заливали у парафін за стандартною гістологічною методикою. З блоків робили зрізи 2 мкм завтовшки, депарафінували та забарвлювали бромфеноловим синім для дослідження катіонних білків та дитизоном, цинку. Вміст вказаних речовин визначали за площею забарвлених гранул на цифрових зображеннях препаратів за допомогою програми для аналізу біомедичних зображень ImageJ, версія 1.41.

Для оцінки змін кількісного та якісного складу мікрофлори клубової кишки в щурів брали в асептичних умовах відрізок клубової кишки 5 см завдовжки, відбирали її вміст, який висівали на селективні середовища для визначення видового складу бактерій [5]. Також робили посіви зіскрібків слизу, відібраного з поверхні слизової оболонки кишки за допомогою стерильного предметного скельця [12]. Для визначення бактерій у гомогенатах тканини кишки порожнину кишки промивали стерильним ізотонічним розчином, вивертали назовні та гомогенізували; гомогенати також висівали на селективні середовища [18].

Статистична обробка результатів полягала у використанні методів варіаційної статис-

тики (розрахунок середнього арифметичного, стандартного відхилення) та порівняння груп (U критерій Мана-Уїтні). Усі розрахунки проводили із використанням пакету прикладних програм Statistica 6.1 [7].

РЕЗУЛЬТАТИ

На початку нашого дослідження ми провели оцінку рухової функції тонкої кишки, оскільки відомо, що порушення перистальтики є характерною ознакою дисфункції кишечника, викликану в тому числі дією мікроорганізмів. Так, при кишкових інфекціях швидкість транзиту кишкового вмісту зростає, що на фоні підсилення секреції електролітів сприяє “вимиванню” патогенів із порожнини кишки; з іншого боку, атонія кишки може призводити до більш тривалого контакту мікрофлори зі слизовою оболонкою і бути причиною дисбіотичних розладів.

Було встановлено (табл. 1), що у щурів при введенні лінкоміцину швидкість транзиту кишкового вмісту суттєво не відрізнялася від контролю. Але при введенні індометацину та метотрексату спостерігалися значні зміни цього показника: так, у щурів, яким вводили індометацин він збільшувався на 30%, а у щурів, які отримували метотрексат, навпаки, був значно меншим за показник контрольної групи і становив лише 10 % від норми.

Наступним етапом нашого дослідження була оцінка функціонального стану кишкового бар'єра. За нормальних умов він повинен виконувати взаємовиключні функції (з одного боку, бути проникним для поживних речовин та електролітів, а з іншого, протистояти дії патогенних бактерій, токсинів і харчових алергенів). Ця функція забезпечується завдяки синхронізації низки факторів, а саме швидкому відновленню клітин епітелію, секрецію слизу та деяких антимікробних поліпептидів. При порушенні будь-якої зі згаданих ланок бар'єрна функція кишкового епітелію може порушуватися. Нами було встановлено, що в усіх щурів із трьох

Таблиця 1. Швидкість транзиту кишкового вмісту у щурів контрольної та дослідних груп ($X \pm S_x$; $n = 4$)

Група тварин	Довжина тонкої кишки, см	Міграція активованого вугілля, см	Показник швидкості транзиту кишкового вмісту, %
Контроль	92,5±4,01	44,2±6,47	47,7±5,47
Лінкоміцин	92,0±4,17	45,3±3,75	49,4±6,21
Індометацин	95,5±3,82	61,4±5,00	64,4±4,94*
Метотрексат	91,8±3,55	4,5±0,92	4,9±1,08*

* $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

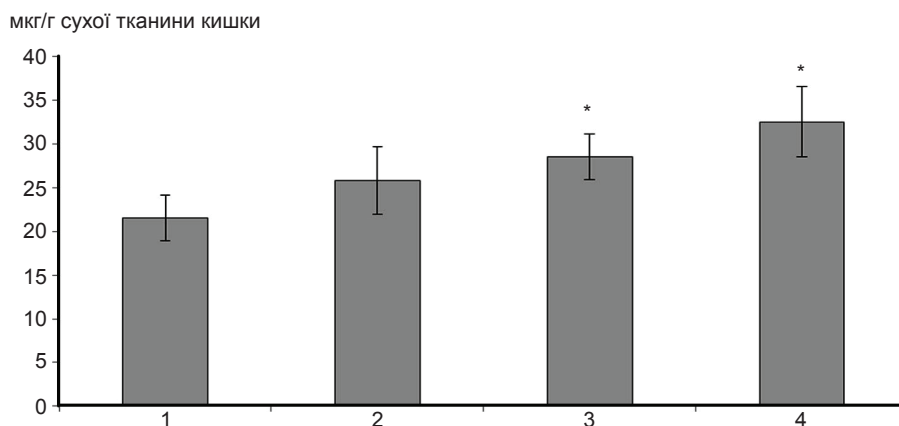
дослідних груп спостерігалось зміни цього показника (рисунок).

Слід відмітити, що у щурів, які отримували лінкоміцин, кількість адсорбованого нігрозину була підвищеною на 20 % у порівнянні з контрольною групою, але ця різниця виявилася статистично незначущою. У щурів при введенні індометацину цей показник був більшим за значення у тварин контрольної групи на 32 %, а при введенні метотрексату на 51 %.

Нормальне здійснення бар'єрної функції кишки є результатом узгодженої дії низки механізмів, в яких головні ролі відіграють тісні контакти ентероцитів, слиз, котрий секретується келихоподібним клітинам та антимікробні пептиди клітин Панета. Тому ми більш ретельно дослідили ступінь ураження слизової оболонки клубової кишки щурів, використавши для цього методи мікроморфометричного аналізу тканини кишки (табл. 2).

У щурів усіх дослідних груп слизова оболонка характеризувалася наявністю ознак

ураження різного ступеня тяжкості. Найменше ці зміни були виражені у щурів при введенні лінкоміцину. Часто зустрічались деформовані ворсинки, але без ерозій та десквамації епітеліальних клітин. Кількість келихоподібних клітин і клітин Панета була збільшеною у порівнянні з контролем (на 45 та 50 % відповідно). Виявлялись ознаки інфільтрація тканини кишки лейкоцитами. У щурів при введенні індометацину ці зміни були виражені більшою мірою: так, на відміну від щурів із дисбактеріозом у ворсинках окрім деформацій, була наявна ерозія їх апікальних відділів, також були виявлені очагові виразкові ураження слизової оболонки. Кількість келихоподібних клітин та клітин Панета не відрізнялася від контрольних значень. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була більш вираженою. У слизовій оболонці кишки щурів, що отримували метотрексат, був явно виражений набряк власної пластинки кишки, майже всі ворсинки були з ознаками некротичних змін,



Кількість адсорбованого вітального фарбника (нігрозину) в ізольованій кишковій петлі щурів контрольної та дослідних груп ($n = 4$): 1 – контроль, 2 – лінкоміцин, 3 – індометацин, 4 – метотрексат. * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Таблиця 2. Мікроморфометричні показники та ступінь інфільтрації лейкоцитами епітелію клубової кишки щурів контрольної та дослідних груп ($X \pm S_x$)

Морфометричний показник	Група тварин			
	Контроль (n=5)	Лінкоміцин (n=6)	Індометацин (n=6)	Метотрексат (n=6)
Довжина ворсинок, мкм	320,3±4,82	273,2±14,38**	269,8±20,35**	275,2±6,21**
Ширина ворсинок, мкм	68,9±2,79	88,9±6,31**	94,4±7,6**	105,6±4,25**
Кількість морфологічно змінених ворсинок, %	4,5±1,93	16,5±1,43**	37,3±4,40**	100±0,00**
Середня кількість келихоподібних клітин у ворсинці	12,2±1,78	17,5±2,17**	10,2±4,24	3,7±1,49**
Глибина крипт, мкм	168,1±8,82	128,2±14,38**	183,9±18,54**	185,5±12,23**
Ширина крипт, мкм	41,9±2,74	48,4±7,85*	45,9±3,25	35,7±2,45*
Кількість клітин Панета в крипті	4,6±0,32	6,7±0,27**	4,9±0,24	4,8±0,49
Кількість лейкоцитів в полі зору	9,6±1,70	15,2±3,11**	23,3±1,78**	30,5±2,41**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ у порівнянні з контролем.

відмічалася масивна десквамація кишкового епітелію. Кількість келихоподібних клітин у ворсинках була зменшеною і становила лише 30 % щодо контролю, кількість клітин Панета не відрізнялась від контролю. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була максимальною з усіх досліджених груп.

Таким чином, на основі аналізу обраних нами критеріїв оцінки стану кишки можна констатувати, що у тварин усіх дослідних груп спостерігалися певні порушення її функціонального стану, які були найменше вираженими у разі введення лінкоміцину, а найбільше – при введенні метотрексату.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження змін мікрофлори клубової кишки. Встановлено, що склад мікрофлори у щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату суттєво відрізняється від контрольних значень (табл. 3). Також зауважимо, що у одного щура з контрольної групи були ознаки ентериту (набряк кишки, ерозії слизової оболонки), тому він був виключений із дослідження.

У тварин контрольної групи у кишковому вмісті виявлено бактерії чотирьох родин. Найбільше було лактобацил, найменше ентерококів, а кишкова паличка та біфідобактерії займали проміжне положення. На посівах зіскрібків пристінкового слизового шару росту визначалися лактобактерії,

кишкова паличка та дріжджоподібні гриби роду *Candida*. У посівах гомогенатів тканини були наявні лактобацили та гриби роду *Candida*.

На фоні введення лінкоміцину суттєво зменшувалася кількість бактерій у кишковому вмісті: так, для лактобацил цей показник зменшувався у 18333 рази, для біфідобактерій у 31 раз, кишкової палички у 36 разів, а для ентерококу майже не змінювався. Також з'являлися представники алохтонної флори: бактерії родин *Enterobacter* та *Citrobacter*, а також дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизу та гомогенатах тканини росту мікроорганізмів не відмічалось. При введенні індометацину зміни у складі бактеріальної флори кишкового вмісту були менш виражені: так, кількість лактобацил зменшувалася у 637 разів, біфідобактерій – у 31 раз; збільшилося число кишкової палички у 1,8 раза, а ентерококу у 4,7 раза відповідно. Були виявлені умовно-патогенні бактерії: гемолітична кишкова паличка та бактерії родини *Enterobacter*. У посівах зіскрібків пристінкового слизу були виявлені лактобацили, кількість яких була у 2,1 рази нижчою, ніж у контролі, а також біфідобактерії. Із умовно-патогенної мікрофлори визначалася гемолітична кишкова паличка. У гомогенатах тканини була встановлена наявність лактобацил (у 2 рази менше, ніж у контролі), біфідо-

Таблиця 3. Кількість бактерій у кишковому вмісті, зіскрібках слизу та гомогенаті тканини клубової кишки шурів, log КУО/г ($X \pm S_x$)

Представники бактеріальної флори клубової кишки шурів	Група тварин											
	Контроль (n=5)			Лінкоміцин (n=6)			Індометацин (n=6)			Метотрексат (n=6)		
	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини	Кишковий вміст	Зіскрібок слизу	Гомогенат тканини
Lactobacillus spp.	6,5±0,45	2,1±0,37	2,6±0,37	1,1±0,51**	-	-	3,8±0,16**	1,8±0,16	2,3±0,38	2,8±0,16**	1,5±0,36*	2,3±0,38
Bifidobacterium spp.	2,9±0,16	-	-	1,3±0,38**	-	-	1,3±0,38**	2,2±0,36*	1,5±0,42	2,0±0,39	1,4±0,45	1,4±0,45
Escherichia coli	4,4±0,38	1,9±0,13	-	2,2±0,45**	-	-	4,8±0,16	-	-	6,3±0,45**	2,3±0,45	2,6±0,46
Enterococcus faecalis	1,7±0,43	-	-	1,8±0,16	-	-	2,3±0,38*	-	-	3,3±0,45**	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9±0,16	2,3±0,31
E. coli (гемолітична)	-	-	-	-	-	-	5,0±0,64	2,5±0,36	2,6±0,46	2,3±0,38	-	-
Enterobacter gergovie	-	-	-	2,1±0,46	-	-	1,7±0,37	-	-	2,5±0,42	1,9±0,55	1,6±0,33
Citrobacter freundii	-	-	-	2,2±0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	1,3±0,38	1,1±0,31	1,8±0,16	-	-	-	-	-	2,0±0,39	1,2±0,36	1,1±0,29

*P<0,05; **P<0,01 у порівнянні з контролем.

бактерій та гемолітичної кишкової палички.

При введенні метотрексату у складі кишкової флори знижувалася кількість лактобацил та біфідобактерій (у 6268 та 31 раз відповідно; кількість кишкової палички та ентерококу навпаки, збільшувалась у порівнянні з контролем (у 105 та 35 разів відповідно). Із умовно-патогенних мікроорганізмів були виявлені *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter gergovie*; а також визначалися дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизового шару та гомогенатах тканини відмічався ріст типової мікрофлори (лактобацил, біфідобактерій, кишкової палички) та умовно-патогенної (*Staphylococcus epidermidis*, *E. gergovie*) мікрофлори.

Слід відмітити, що погіршення функціонального стану кишки тісно пов'язане зі змінами мікробіоценозів. Причому у разі

введення лінкоміцину саме зміни складу мікрофлори є вірогідною причиною змін функціонального стану кишки, оскільки цей препарат є нетоксичним у дозі, яку отримували шури в нашому дослідженні, тому можна виключити його дію на епітелій кишки [16]. З іншого боку, для індометацину та метотрексату невідомі будь-які ефекти, що безпосередньо впливають на активність бактерій, тобто можна констатувати, що зміни мікрофлори в цих випадках є вторинними, та виникли на фоні змін кишкового епітелію, викликаних введенням цих препаратів.

Клітини Панета є важливою місцевою ланкою антимікробного захисту тонкої кишки, можуть брати участь у регуляції запалення, тому заключним етапом нашого дослідження була оцінка їх функціонального стану за такими показниками, як вміст катіонних білків та цинку (табл. 4).

Таблиця 4. Вміст катіонних білків та цинку в клітинах Панета щурів із дизбактеріозом та ентеритами ($X \pm S_x$)

Група тварин	Площа секреторних гранул, мкм ²	
	Бромфеноловий синій	Дитизон
Контроль (n=5)	79,7±7,47	99,5±3,72
Лінкоміцин (n=6)	58,0±5,75**	80,6±6,85**
Індометацин (n=6)	54,3±4,29**	65,8±5,90**
Метотрексат (n=6)	42,7±1,80**	48,9±2,75**

**P<0,01 у порівнянні з контролем.

У щурів усіх дослідних груп у порівнянні з контрольними тваринами вміст катіонних білків та цинку в клітинах Панета зменшується, що свідчить про значну активацію їх секреторної функції, особливо при тяжкому метотрексатовому ентериті.

ОБГОВОРЕННЯ

Нами було встановлено, що після введення індометацину швидкість транзиту кишкового вмісту зростала, а при введенні метотрексату, навпаки, зменшувалася. Це можна пояснити тим, що будь-які запальні зміни викликають збільшення синтезу простагландинів. При цьому відомо, що простагландини E та I пригнічують рухову функцію кишки, що і спостерігалось при ентериті, викликано-му метотрексатом, який характеризувався найбільш вираженими ознаками запалення [34]. З іншого боку, індометацин – потужний інгібітор їх синтезу, тому його введення може підсилювати рухову функцію ШКТ [17]. Затримку транзиту кишкового вмісту можна віднести до несприятливих факторів при запаленні та дисбактеріозі, оскільки за цих умов відбувається більш тривалий контакт умовно-патогенної флори з поверхнею слизової оболонки. Варто зазначити, що слиз, який вкриває поверхню ШКТ складається з двох шарів: зовнішнього, який легко виділяється, та внутрішнього, міцно прикріпленого до поверхні слизової оболонки. Якщо зовнішній шар слизу в здоровому організмі переважно заселений бактеріями-симбіонтами, то внутрішній – залишається стериль-

ним [23, 28]. При патологічних процесах умовно-патогенна мікрофлора, що синтезує протеолітичні ферменти, здатна призводити до деградації внутрішнього слизового шару та міграції як патогенної, так і симбіонтної мікрофлори безпосередньо до клітин епітелію кишки. Потрапивши до поверхні слизової оболонки патогенні бактерії поглинаються дендритними клітинами або потрапляють у власну пластинку кишки, що призводить до гіперактивації імунної відповіді, та ще більшого ураження тканини кишки під впливом антимікробних поліпептидів нейторофілів, які у значних кількостях мігрують до ділянок ураження. Саме ці явища і спостерігались в нашому дослідженні, особливо у разі введення метотрексату.

Існують певні ефективні механізми адаптації тканини кишки до умов збільшеного тиску умовно-патогенної флори на фоні зменшення кількості бактерій-симбіонтів, які за нормальних умов виконують захисні функції. Так, у щурів при введенні лінкоміцину, на фоні запалення виявлялися добре виражені компенсаторні явища на рівні тканини кишки. До них можна віднести, по-перше, збільшення келихоподібних клітин, та відповідно, гіперсекрецію слизу, який виконує бар'єрну функцію, особливо відносно аеробних бактерій, а по-друге, це збільшення кількості клітин Панета, що повинно призводити до посилення секреції антимікробних пептидів у відповідь на дію бактерій. У щурів, які отримували індометацин та метотрексат, явища компенсації не спостерігались, а ступінь ураження кишки був значно більшим,

з ознаками некрозу тканини. Здійснення компенсаторних явищ на рівні тканини кишки забезпечується збільшенням швидкості оновлення клітин кишкового епітелію, тобто повинна відбуватися активація сигнальних шляхів, які прискорюють проліферацію та диференціацію стовбурових клітин. Однією з таких сигнальних молекул є простагландин E2, який важливий для регуляції росту та диференціації гемопоетичних і мезенхімальних стовбурових клітин [24, 29]. Більше того, нові дані свідчать про те, що простагландин E2 є частиною головного механізму регуляції диференціації загального пулу соматичних стовбурових клітин [15, 19, 31]. Вплив умовно-патогенної мікрофлори індукує процес запалення і, відповідно, збільшення рівня синтезу простагландинів та інших факторів, що скеровують і прискорюють проліферацію та диференціацію клітин кишкового епітелію. Непрямі ознаки прискорення кругообігу клітин кишкового епітелію спостерігались у тварин при введенні лінкоміцину (зменшення глибини кишкових крипт, які є зоною диференціації та росту клітин кишкового епітелію, що свідчить про активну міграцію клітин у напрямку кишкових ворсинок), а при введення індометацину та метотрексату, навпаки, затримувалася проліферація та диференціація.

При введенні індометацину синтез простагландинів пригнічується, тому проліферативна здатність кишкового епітелію може знижуватися. Збільшення глибини кишкових крипт у цьому разі може свідчити про затримку диференціації та міграції клітин у напрямку ворсинок, і відповідно, погіршення репаративних процесів епітелію та зниження його компенсаторних властивостей. Метотрексат є антиметаболітом-антагоністом фолієвої кислоти, в зв'язку із антифолієвими ефектом пригнічує клітинний мітоз, і ріст активно проліферуючих тканин. Тому він блокуючи проліферативну здатність стовбурових клітин кишки, суттєво знижує або зовсім унеможлиблює здатність епітелію до

регенерації, навіть при підвищеному рівні синтезу простагландинів. Результати нашого дослідження свідчать саме про це, оскільки спостерігалось значне зменшення кількості келихоподібних клітин, число клітин Панета не збільшувалося, а також збільшення глибини кишкових крипт.

Зменшення секреції слизу, відсутність компенсаторного збільшення кількості клітин Панета може сприяти активній експансії умовно-патогенної мікрофлори як у слизовий шар, так і у слизову оболонку. Саме на цьому фоні суттєво підсилюється секреторна активність клітин Панета, яке можна пояснити наступним чином. По-перше, викид великої кількості катіонних білків у ділянках запалення та некрозу запобігає інфікуванню тканини кишки патогенними мікроорганізмами, а також сприяє міграції лейкоцитів до ділянок ураження. По-друге, виділення клітинами Панета секреторної фосфоліпази A2 та ФНП- α може призводити до індукції процесів запалення та регенерації тканини кишки; так, наприклад, секреторна фосфоліпаза A2 впливає на активацію циклооксигенази-2 та збільшує цитокінопоередкований синтез простагландинів [11, 24, 26, 35]. У свою чергу, виділення лейкоцитами цитокінів може паракринним шляхом стимулювати синтез і секрецію антимікробних пептидів клітинами Панета.

Відносно подальшої долі цинку, який вивільняється у позаклітинний простір у великих кількостях разом із секреторним матеріалом клітин Панета, не існує загальноприйнятої думки. Але правомірним здається припущення про те, що він може реабсорбуватися, розташованими поряд з клітинами Панета, стовбуровими клітинами кишки, здійснюючи при цьому антиапоптотичну функцію в умовах оксидативного стресу, зумовленого активацією нейтрофілів під час запалення та підвищеного вмісту бактеріальних ліпополісахаридів, що утворюються внаслідок загибелі бактерій [33].

ВИСНОВКИ

1. Рухова функція тонкої кишки щурів при введенні лінкоміцину суттєво не відрізняється від значень у тварин контрольної групи; при введенні індометацину – збільшується, а метотрексату, навпаки, – зменшується.

2. Бар'єрна функція кишкового епітелію та цілісність слизової оболонки кишки у щурів при введенні вищевказаних речовин знижується; на цьому фоні спостерігаються ознаки запалення різного ступеня тяжкості.

3. Кількість бактерій-симбіонтів і комменсалів при введенні лінкоміцину зменшується і з'являються представники умовно-патогенної флори; при ін'єкції індометацину та метотрексату зменшується кількість бактерій симбіонтів, збільшується кількість бактерій комменсалів і спостерігається поява представників умовно-патогенної мікрофлори; також відбуваються міграція симбіонтної і патогенної мікрофлори до поверхні кишкового епітелію.

4. При зазначених вище змінах у складі мікрофлори клубової кишки вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета зменшується, що свідчить про значну активацію їх секреторної функції.

Е.Ю. Гороховский, Ю.В. Ещенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко, И.Е. Юрчук

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ, СОДЕРЖАНИЕ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ И ЦИНКА В КЛЕТКАХ ПАНЕТА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИНКОМИЦИНА, ИНДОМЕТАЦИНА И МЕТОТРЕКСАТА

Исследовали связь между изменениями функционального состояния подвздошной кишки, составом ее микрофлоры и секреторной активностью клеток Панета. Введение линкомицина приводило к уменьшению общего количества бактерий-симбионтов и появлению представителей условно-патогенной микрофлоры. Отмечались статистически незначимые изменения скорости транзита кишечного содержимого и нарушения барьерной функции кишечного эпителия. Последний характеризовался наличием признаков воспаления. Введение индометацина и метотрексата приводило к существенным изменениям

показателей функционального состояния тонкой кишки крыс. Скорость транзита кишечного содержимого при введении индометацина увеличивалась на 30 %, а при введении метотрексата, наоборот, уменьшалась на 90 %. Способность эпителия подвздошной кишки адсорбировать витальный краситель в обоих случаях увеличивалась (на 32 и 51 % соответственно), что свидетельствует о нарушении его барьерной функции. При этом происходили существенные изменения в составе микрофлоры подвздошной кишки: уменьшение количества симбионтной и появление условно-патогенной микрофлоры, транслокация бактерий к поверхности клеток слизистой оболочки, о чем можно судить по бактериологическим посевам соскобов слизи и гомогенатов ткани кишечника. Было установлено, что у животных всех трех экспериментальных групп происходило уменьшение содержания в секреторных гранулах клеток Панета катионных белков и цинка. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что изменения баланса между симбионтной и условно-патогенной микрофлорой являются фактором, который оказывает существенное влияние на повреждение ткани кишечника, а также вызывает активацию секреторной функции клеток Панета.

Ключевые слова: дисбактериоз, энтерит, катионные белки, клетки Панета, цинк.

Ye.Ju. Horokhovskiy, Ju.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko, I.Ye. Yurchuk

FUNCTIONAL STATE OF THE ILEUM, CATIONIC PEPTIDS AND ZINC CONTENT IN THE PANETH CELLS OF THE RATS DOLLING LINCOMYCIN, INDOMETHACIN AND METHOTREXATE ADMINISTRATION

In the paper the relation between the changes of a functional condition of ileum, composition of its microflora and secretory activity of Paneth cells has been investigated. Administration of lincomycin led to a reduction of total of symbiotic bacteria and appearance of opportunistic microflora. Statistically insignificant changes of speed of transit of intestinal contents and damage of barrier function of an intestinal epithelium were noted. The intestinal epithelium was characterized by signs of inflammation. Administration of indomethacin and methotrexate led to significant changes of a functional state of a small intestine of rats. The speed of transit of intestinal contents following indomethacin administration increased by 30 %, and, on the contrary, decreased by 90 % following administration of methotrexate. The ability of epithelium of ileum to adsorb vital dye in both cases increased (by 32 and 51%, respectively) indicating the damage of barrier function. Thus there were significant changes in structure of microflora of ileum: reduction of quantity symbiotic and emergence of opportunistic microflora, a translocation of bacteria to a mucous wall. It was concluded that animal of all three experimental groups had a reduction of the contents of cationic proteins

and zinc in the secretory granules of Paneth cells. These results can testify that balance changes between simbiotic and opportunistic microflora are a factor which has an impact on intestine damage and also causes activation of secretory function of Paneth cells.

Key words: dysbacteriosis, enteritis, cationic proteins, Paneth cells, zinc.

Zaporozhye National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Денисов С.Д., Морозкина Т.С. Требования к научному эксперименту с использованием животных // *Здравоохранение*. – 2001. – № 4. – С. 40–42.
- Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів. – Запоріжжя: Вид-во Запорізь. нац. ун-ту, 2010. – 258 с.
- Єщенко Ю.В., Єщенко В.А., Бовт В.Д. Вміст цинку, що утворює хелаги, та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**, № 5. – С. 40–44.
- Єщенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // *Цитология*. – 1978. – **20**, № 8. – С. 927–933.
- Знаменский В.А., Дегтяр Н.В., Кузьминский С.Н. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика дисбактериозов. – К.: Изд-во Киев. гос. ун-та усовершенствования врачей, 1986. – 27 с.
- Пат. № 31012, UA. МПК (2006) A61P31/00. Спосіб моделювання дисбіозу (дисбактеріозу) / Левицький А.П., Селиванська І.О., Цісельський Ю.В., Почтар В.М., Розсоханова Л.М., Гулавський В.Т. – 2008, Бюл. № 6.
- Ряброва О.Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях. – В кн.: Рекомендации по подготовке научных медицинских публикаций / Под ред. С.Е. Башинского, В.В. Власова. – М.: МедиаСфера, 2006. – С. 94–105
- Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., Ouellette, A. J. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria // *Nat. Immunol.* – 2000. – **1**, № 2. – P. 113–118.
- Bevins C. L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34**. – P. 263–266.
- Bidgood M.J., Jamal O.S., Cunningham A.M., Brooks P.M. Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes // *J. Immunol.* – 2000. – **165**, № 5. – P. 2790–2797.
- Cohen P.S., Laux D.C. Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro // *Methods Enzymol.* – 1995. – № 253. – P. 309–314.
- Ergun E., Ergun L., Asti R.N., Kurum A. Light and electron microscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine // *Rev. Med. Vet.* – 2003. – **154**, № 5. – P. 351–355.
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – № 3. – P. 710–720.
- Goessling W., North T.E., Loewer S., Lord A.M., Lee S. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration // *Cell*. – 2009. – № 136. – P. – 1136–1147.
- Greenlees K.J., Anadon A. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Lincomycin // *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: (15-20 February 2000, Geneva)*. – Geneva: WHO, 2000. – P. 13–29.
- Gustafsson B.I., Delbro D.S. Effects of indomethacin on non-adrenergic, non-cholinergic motility of stomach and small intestine // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. – 147, № 1. P. 67–72.
- Herias M.V., Midtvedt T., Hanson L.A., Wold A.E. Escherichia coli K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat // *Infect. Immun.* – 1997. – **65**, №2. – P. 531–536.
- Honda A., Sugimoto Y., Namba T., Watabe A., Irie A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype // *J. Biol. Chem.* – 1993. – № 268. – P. 7759–7762.
- Beregova T.V., Eshchenko Y.V., Bovt V.D., Eshchenko V.A. Zinc and the Secretory Material Content in Blood Granulocytes and in the Basal Parts of Intestine Crypts during Stress // *Int. J. Physiol. and Pathophysiol.* – 2011. – №3. – P. 211–216.
- Hui-Bin Q., Jin-Yan L., Xin L. Effect of enterokinetic prucalopride on intestinal motility in fast rats // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – **9**, № 9. – P. 2065–2067.
- Jahovic N., Sener G., Cevik H., Ersoy Y., Arbak S., Yeğen B.C. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats // *Cell. Biochem. Funct.* – 2004. – **22**, №3. – P. 169–178.
- Jingyun Y., Xinjun H., Xiangcai M., Yu-Ming K. Effects of Portulaca polysaccharide on the dysbacteria in intestinal tract of mice // *FASEB J.* – 2010. – № 24 (Suppl. Abstr. Meeting).
- Johansson M.E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria // *PNAS*. – 2008. – **105**, № 39. – P. 15064–15069.
- Kleiveland C.R., Kassem M., Lea T. Human mesenchymal stem cell proliferation is regulated by PGE2 through differential activation of cAMP-dependent protein kinase isoforms // *Exp Cell Res.* – 2008. – № 314. – P. 1831–1838.
- Lange S., Delbro D.S., Jennische E. Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1994. – **29**, № 1. P. 38–46.
- Lin P.W., Simon P.O., Gewirtz A.T., Neish A.S. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, № 19. – P. 19902–19907.
- Liu A.Y., Destoumieux D., Wong A.V., Park C.H. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation

- // J. Invest. Dermatol. – 2002. – 118, № 2. – P. 275–281.
28. McGuckin M.A., Lindyn S.K., Sutton P., Florin T.H.. Mucin dynamics and enteric pathogens // Nat. Rev. Microbiology. – 2011. – № 9. – P. – 265–278.
29. North T.E., Goessling W., Walkley C.R., Lengerke C., Kopani K.R. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis // Nature. – 2007. – № 447. – P. – 1007–1011.
30. Oppenheim J., Biragyn A., Kwak L., Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – 62, № 2. – P. 17–21.
31. Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium // Genes & Development. – 2003. – 17, №14. P.–1709–1713.
32. Seong J.S., Seung W.A., Chang K.H., Byung I.R. Expressions of β -defensins in human keratinocyte cell lines // J. Dermatol. Sci. – 2001. – 27, № 3. – P. 183–191.
33. Thambiayya K., Kaynar A M., Croix C., Pitt B.R. Functional role of intracellular labile zinc in pulmonary endothelium / Pulm. Circ. – 2012. – 2, №4. – P. 442–451.
34. Thor P., Konturek J.W., Konturek S.J., Anderson J.H. Role of prostaglandins in control of intestinal motility // Amer. J. Physiol. – 1985. – 248, № 3 (Pt 1). – P. G353–G359.
35. van Deventer S. J. Review article: targeting TNF- α as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease – the mechanisms of action of infliximab // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1999. – 13, № 4. – P. 3–8.
36. Yamada T., Deitch E., Specian R.D., Perry M.A. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin // Inflammation. – 1993. – 17, № 6. – P. 641–662.
37. Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A. Zinc is a novel intracellular second messenger // J. Cell Biol. – 2007. – 177, № 4. – P. 637–645.

Запоріз. нац. ун-т
E-mail: Yehor.horokhovski@gmail.com

Матеріал надійшов
до редакції 24.04.2012

Л.Г. Коробейнікова, М.Ю. Макаrchук

Сприйняття та переробка зорової інформації і стресостійкість до психоемоційних навантажень у спортсменів різного віку

Серед численних досліджень, присвячених вивченню сприйняття і переробки інформації в умовах екстремальної напруженої м'язової діяльності спортсменів високої кваліфікації, відсутні дані про вплив на ці процеси вікового компоненту. У роботі вивчався вплив психоемоційного навантаження і різних рівнів стресостійкості на психічні процеси сприйняття і мислення у спортсменів високої кваліфікації (члени збірної команди України з греко-римської боротьби) двох вікових груп. Молодшу групу склали 12 спортсменів віком від 19 до 24 років, а старшу – 7 спортсменів віком від 27 до 31 року. Виявлено, що у спортсменів молодшої вікової групи вище продуктивність зорового сприйняття і краща ефективність переробки зорової інформації в порівнянні зі спортсменами старшої вікової групи. Це свідчить про наявність залежності когнітивного компонента сприйняття і переробки інформації від віку у спортсменів високої кваліфікації. Оскільки спортсмени старшої вікової групи порівняно із молодшою мають більшу високу стресостійкість, їм властива більша здатність утримувати високу прецедатність зорової сенсорної системи в умовах психоемоційного напруження. У спортсменів старшої вікової групи психоемоційне напруження викликає значні зміни у регуляції варіабельності ритму серця, що вказує на стресовий характер навантаження. У спортсменів молодшої групи спостерігається лише зміни показника вегетативного балансу (LF/HF), що говорить про посилення симпатичної активації регуляції ритму серця. Це свідчить про оптимальну реакцію системи регуляції ритму серця на психоемоційне навантаження.

Ключові слова: стресостійкість, психоемоційне напруження, особливості сприйняття, переробка інформації, вікові особливості.

ВСТУП

Сучасний розвиток фізіології спорту здебільшого спрямований на вивчення різних властивостей, які впливають на прояв максимальних можливостей спортсменів в умовах змагальної діяльності [3, 8, 9, 10]. При цьому було з'ясовано, що спорт вищих досягнень як екстремальний різновид діяльності людини завжди пов'язаний зі значним психоемоційним напруженням, а здатність його витримувати в більшості випадків прямо впливає на результат спортивного змагання [1, 2, 5].

Враховуючи те, що формування психоемоційних реакцій в умовах екстремальних видів діяльності визначається станом пси-

хофізіологічних функцій у спортсмена, слід очікувати, що індивідуальний рівень стресостійкості може бути охарактеризований здатністю до сприйняття і переробки зорової інформації за таких умов [17]. Слід зазначити, що стан психофізіологічних функцій не є сталим навіть у однієї і тієї самої людини. Доведеним є факт закономірних змін його змін з віком.

В останнє десятиріччя професійний та олімпійський спорт характеризується зростанням віку учасників змагань, які досягли високих світових досягнень, наприклад, вік чемпіонів і призерів на провідних міжнародних змаганнях, в тому числі і Олімпіадах, сягає від 36 до 42 років (серед єдиноборств),

а іноді, навіть до 52 років (кінний, вітрильний спорт) [1, 4]. Тому в сучасній фізіології спорту вивчення вікових особливостей сприйняття та переробки інформації у спортсменів в умовах психоемоційних навантажень є вкрай актуальним.

Метою нашої роботи було з'ясування вікових особливостей сприйняття та переробки зорової інформації у спортсменів із різним рівнем стресостійкості до психоемоційного навантаження.

МЕТОДИКА

Обстеженими були члени чоловічої збірної України з греко-римської боротьби, яких за віковим показником розділили на дві групи. До молодшої вікової групи ввійшли 12 спортсменів віком від 19 до 24 років, а до старшої – 7 спортсменів віком від 27 до 31 року.

У всіх спортсменів здатність до сприйняття та переробки зорової інформації вивчали за комплексною методикою, що отримала загальну назву «Перцептивна швидкість». Методика реалізована в апаратно-програмному психодіагностичному комплексі «Мультитсихометр-05» [12]. Під час обстеження у всіх спортсменів оцінювали швидкість і точність зіставлення тестового сигналу з певною геометричною фігурою, коли після її пред'явлення, тестовий сигнал містив 75 чи 50 % зображення цієї фігури. Структурність зорового сприйняття оцінювали як здатність людини відображати загальну структуру предмета, сформовану в певний проміжок часу. Для цього в середній частині зорового поля розміщували 4 пронумеровані еталонні геометричні фігури, які склалися з 4 рівних відрізків, а над ними, у верхній частині монітора – фрагмент фігури (тестовий сигнал), який складався з 2–3 відрізків. Завдання обстежуваного полягало в тому, аби визначити частиною якої з 4 еталонних фігур міг би бути даний фрагмент. Обстежуваний мусив натиснути відповідну номеру еталона цифрову клавішу апаратно-програмного пси-

ходіагностичного комплексу.

На основі отриманих результатів тестування у всіх обстежуваних визначали інтегральні показники: продуктивність, швидкість, точність та ефективність.

Врівноваженість (баланс) процесів збудження та гальмування у центральній нервовій системі (ЦНС) у кожного із обстежуваних оцінювали за результатами тесту «Реакція на рухомий об'єкт». Цей тест являє собою різновид складної сенсомоторної реакції, яка дає змогу визначити період складної обробки сенсорного сигналу в ЦНС, а також сенсорні та моторні періоди. Суть завдання полягала в тому, що в кожній окремій пробі (всього 27) обстежуваному на моніторі комп'ютера пред'являли 2 сигнали у вигляді маркерів на колі, один з яких статичний і динамічний, другий кожного разу мав різну відстань від першого та різне положення на колі і рухався у різні боки. При збіганні динамічного і статичного сигналів спортсмену потрібно було якомога швидше натиснути на кнопку на робочій панелі. У кожного обстежуваного фіксували кількість випереджень і запізень, розраховували їхнє співвідношення та середню похибку. За цими результатами тестування визначали точність, стабільність, збуджуваність і тренд (за збудженням).

Теоретично постулюється, що переважання збуджувальних (активаційних) процесів над гальмівними проявляється в тенденції до виконання обстежуваним випереджуючих натискань, тоді як переважання гальмівних процесів (зниження рівня активації) призводить до більшої кількості натискань із запізненням [12, 17, 18].

Рівень психоемоційної стійкості (стресостійкості) всіх обстежуваних визначали за результатами «Стрес-тесту» на основі переробки інформації при позиційному виборі об'єктів у відповідних клітинах, за певного ліміту часу, для здійснення такої кількості подразників, що моделювало стан психоемоційного інформаційного навантаження. За результатами тестування визначали такі

показники, як стресостійкість, пропускну здатність та імпульсивність [2, 7, 15].

У всіх обстежуваних за допомогою комп'ютерної методики «Кардіо+» (Україна) оцінювали стан вегетативної регуляції ритму серця, визначаючи статистичні параметри кардіоінтервалів у динаміці адаптації до напруженої м'язової діяльності: середню тривалість RR-інтервалів, середнє квадратичне відхилення, мода, амплітуда моди, варіаційний розмах, індекс напруження (за Р.М. Баєвським, 1979). Одночасно реєстрували показники спектрального аналізу серцевого ритму: дуже низькочастотного спектра (VLF), низькочастотного (LF), високочастотного (HF) та відношення низькочастотного спектра до високочастотного спектра LF/HF. При аналізі нестационарних перехідних процесів системи регуляції ритму серця в умовах ортостатичного навантаження застосовували скатерограму як непараметричний метод аналізу. Визначали параметри: відображення аперіодичних коливань серцевого ритму (SD1) і характеристику повільних коливань ритму серця (SD2).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програмного пакету Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc.). У зв'язку з тим, що отримані в цьому дослідженні їхні вибірки не мали нормального розподілу, для оцінки достовірності різниці було застосовано методи непараметричної статистики на основі критерію знакових рангових сум Вілкоксона [16]. Для демонстрації розподілу результатів використовували інтерквартильний

розмах, вказуючи першу (25 % перцентиль) і третю квартиль (75 %) [18]. Для встановлення зв'язку між певними змінними та індивідуально-типологічними характеристиками обстежуваних використовували коефіцієнти рангової кореляції Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів тесту перцептивної швидкості показав, що обстежувані молодшої вікової групи мали достовірно вищі значення продуктивності та ефективності обробки зорової інформації ніж спортсмени старшої вікової групи (табл. 1). Продуктивність вказує на швидкість процесів сприйняття та мислення і залежить від рухливості нервових процесів. Чим вища продуктивність, тим вища рухливість нервових процесів і тим вища швидкість сприйняття та мислення. Відносна частота помилкових відповідей діагностує ефективність сприйняття і мислення: чим менший цей показник, тим ефективніші ці процеси. Загалом отримані результати можуть свідчити про більш високий рівень переробки інформації у першій групі і вказувати на кращі можливості когнітивних функцій. При цьому у спортсменів обох груп швидкість обробки інформації була приблизно однаково високою. Швидкість роботи є інтегральним показником швидкості та ефективності процесів мислення та сприйняття. Високе значення швидкості означає, що ці процеси сприйняття та переробки інформації рухливі та ефективні [14, 17].

Таблиця 1. Середні значення показників тесту «Перцептивна швидкість» у спортсменів різних вікових груп

Показники, ум.од.	Молодша вікова група (n=12)			Старша вікова група (n=7)		
	Медіана	Нижній квартиль	Верхній квартиль	Медіана	Нижній квартиль	Верхній квартиль
Продуктивність	21,50	18,50	22,00	19,00*	14,00	20,00
Швидкість	4,39	3,91	5,10	4,00	3,17	4,98
Точність	0,88	0,79	0,92	0,88	0,75	1,00
Ефективність	72,84	54,49	82,80	66,95*	47,36	74,80

Примітка. Тут і в табл. 2: * $P < 0,05$, порівняно із молодшою віковою групою.

Достовірних відмінностей між показниками загальної інтенсивності та імпульсивності у спортсменів обстежуваних вікових груп не виявлено. Водночас за стресостійкістю (рисунк), який визначається за відношенням середньої пропускної здатності зорового аналізатора на початку і наприкінці, у спортсменів двох вікових груп достовірно відрізняються. Іншими словами, висока стресостійкість вказує на можливість утримання достатнього рівня пропускної здатності зорової сенсорної системи в умовах психоемоційних навантажень. Таким чином, оскільки спортсмени старшої вікової групи порівняно з молодшою мають більшу стресостійкість, у них краща здатність утримувати високу працездатність зорової сенсорної системи в умовах психоемоційного напруження.

Разом з тим кореляційний аналіз між віком і показниками перцептивної швидкості показав існування зв'язку. Так, у молодшій групі спортсменів спостерігається достовірний кореляційний зв'язок між віком і швидкістю ($r=-0,37$, $P<0,05$), а серед спортсменів старшої групи – між віком і точністю ($r=-0,31$, $P<0,05$) [11]. В обох випадках такий зв'язок, мабуть, вказує на те, що в різні вікові періоди змінюються не одні і ті самі компоненти здатності до обробки зорової інформації.

Аналіз результатів оцінки стану врівноваженості нервових процесів (табл. 2) не виявив достовірної різниці за точністю та стабільністю між групами спортсменів різного віку. Цей факт може вказувати на те, що ефективність моторних реакцій на зовнішні подразники в умовах психоемоційного на-

пруження у всіх спортсменів, не залежно від віку, не змінюється або змінюється незначно.

Разом з тим за збудженням нами виявлена достовірна різниця між спортсменами різних вікових груп (див. табл. 2). Згідно з наявною шкалою, середнє значення збудження у молодшій віковій групі відповідає балансу процесів збудження та гальмування, тоді як у старшій віковій групі воно вказує на наявність переважання процесів збудження над процесами гальмування. Особливістю при проведенні цього тесту було те, що впродовж усієї роботи місцеположення обох сигналів знаходилося під постійним зоровим контролем обстежуваного.

Таким чином, у спортсменів молодшої вікової групи баланс нервових процесів збудження і гальмування можуть деякою мірою, пояснювати наявністю більшої продуктивності зорового сприйняття та ефективності переробки зорової інформації порівняно зі старшою віковою групою. Відповідно, переважання процесів збудження нервових процесів у останніх, як наслідок, може призводити до погіршення процесів сприйняття та переробки зорової інформації.

Проведений кореляційний аналіз між віком і балансом нервових процесів показав, що у спортсменів старшої вікової групи такий зв'язок сильніший, ніж у молодшій віковій групі. Так, у останній коефіцієнт кореляції між віком і стабільністю становив $r=0,52$, $P<0,05$, а у спортсменів старшої вікової групи $r=0,87$, $P<0,05$. Аналогічно, коефіцієнт кореляції між віком і збудженням у спортсменів молодшої і старшої вікових груп становив

Таблиця 2. Середні значення показників за тестом «Баланс нервових процесів» у спортсменів різних вікових груп

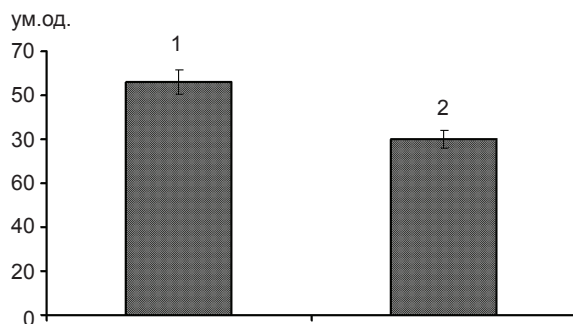
Показники, ум.од.	Перша вікова група (n=12)			Друга вікова група (n=7)		
	Медіана	Нижній квантиль	Верхній квантиль	Медіана	Нижній квантиль	Верхній квантиль
Точність	2,76	2,41	3,04	3,97	2,86	4,85
Стабільність	3,28	3,02	3,96	3,00	2,55	4,57
Збудження	-0,28	-1,10	0,37	-1,27*	-3,60	0,01

$r=0,43$, $P<0,05$ і $r=0,65$, $P<0,05$ відповідно.

Загалом, підсумовуючи наші результати, можна думати, що у спортсменів високої кваліфікації вікове погіршення стану нейродинамічних функцій в умовах психоемоційного напруження є не стільки послабленням аферентної системи сприйняття, аналізу та переробки інформації, як саме еферентної, моторної частки. Доказом цього може бути і те, що зі збільшенням віку у спортсменів зростає зв'язок між ефективністю зорового сприйняття та переробки інформації із процесами вікової інволюції [6,13].

Як видно з результатів, представлених на рисунку за тестом, що визначає рівень стресостійкості, достовірних відмінностей між загальною інтенсивністю та імпульсивністю у спортсменів обстежених вікових груп нами не виявлено. Водночас за стресостійкістю, яка визначається за відношенням середньої пропускної здатності зорового аналізатора на початку тесту і наприкінці, спортсмени цих вікових груп достовірно відрізняються.

Іншими словами, висока стресостійкість вказує на можливість утримання достатнього рівня пропускної здатності зорової сенсорної системи в умовах психоемоційних навантажень. Оскільки спортсмени молодшої вікової групи, порівняно із старшою, мають нижчу стресостійкість, їм властива більша здатність утримувати високу працездатність зорової сенсорної системи в умовах психоемоційного напруження.



Стресостійкість у спортсменів молодшої (1) та старшої (2) вікових груп спортсменів ($n=19$). * $P<0,05$

Проведений кореляційний аналіз між віком обстежених і показниками тесту на стресостійкість вказує на наявність достовірних коефіцієнтів кореляції у спортсменів молодшої групи ($r=0,42$, $P<0,05$). Отриманий факт підтверджує зв'язок віку зі зростанням значення цього показника, що вказує на погіршення стресостійкості до психоемоційних навантажень. Серед спортсменів старшої вікової групи не виявлено достовірних зв'язків віку зі стресостійкістю.

Таким чином, проведені дослідження засвідчили наявність вікового покращення здатності зорового аналізатора до стресостійкості в умовах психоемоційного навантаження у спортсменів високої кваліфікації.

У табл. 3 представлено середні значення спектральних характеристик варіабельності ритму серця у спортсменів двох вікових груп на початку та в кінці психоемоційного навантаження. Слід відмітити, що між групами спортсменів різного віку на початку психоемоційного навантаження існують достовірні розбіжності за показниками варіабельності ритму серця: HF і LF/HF. Достовірно вищі значення HF свідчать про переважання парасимпатичної активації регуляції ритму серця у спортсменів молодшої групи. Знижені значення LF/HF у молодих спортсменів вказують на оптимізацію вегетативного балансу симпатичних і парасимпатичних впливів на синусовий вузол серця.

Психоемоційне навантаження призводить до прискорення ритму серця (Mean RR), зростання VLF та HF коливань серцевого ритму у спортсменів старшої вікової групи. Це вказує на вплив центрального контуру регуляції ритму серця в умовах психоемоційного навантаження з одночасною активацією парасимпатичної ланки вегетативної регуляції та ренин-ангіотензин-альдостеронової системи. Одночасно виявляється зміщення вегетативного балансу (LF/HF) у бік симпатичної активації вегетативної регуляції кардіоінтервалів. Таким чином, для спортс-

Таблиця 3. Середні значення спектральних характеристик варіабельності ритму серця у спортсменів різних вікових груп у динаміці психоемоційного навантаження

Показники	Молодша вікова група (n=12)			Старша вікова група (n=7)		
	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль
Середнє значення кардіоінтервалів, мс						
початок	1034,25	455,18	1202,70	1009,50	1008,70	1156,60
кінець	901,15	469,90	995,25	781,40**	781,40	871,70
Дуже низькочастотний спектр, (VLF) мс ²						
початок	4285,00	1396,50	10839,50	9239,00	4802,00	10398,00
кінець	3262,00	2598,50	8553,50	1722,00**	1722,00	1977,00
Низькочастотний спектр, (LF) мс ²						
початок	2405,00	1785,50	2591,00	2474,00	2428,00	3906,00
кінець	1924,00	1558,50	3359,50	2843,00	1400,00	2843,00
Високочастотний спектр, (HF) мс ²						
початок	2166,00	1358,00	2697,00	1428,00*	1276,00	2586,00
кінець	1199,50	517,00	2808,00	2843,00***	1400,00	2843,00
Загальний спектр, (Total) мс ²						
початок	11856,00	4483,00	19317,00	14103,00	11294,00	14853,00
кінець	5257,00	4430,00	20228,00	4887,00**	3849,00	4887,00
Відношення LF/HF, мс ²						
початок	1,21	0,70	2,30	1,73*	1,51	1,90
кінець	2,38**	1,29	3,96	8,811***	2,96	8,81

*P<0,05 порівняно із першою віковою групою спортсменів; **P<0,05 порівняно із початком навантаження.

менів старшої вікової групи психоемоційне напруження викликає значні зміни у регуляції варіабельності ритму серця, що вказує на стресовий характер навантаження. У спортсменів молодшої групи спостерігається лише зміни показника вегетативного балансу (LF/HF), що говорить про посилення симпатичної активації регуляції ритму серця, але абсолютні значення змін порівняно зі спортсменами старшої вікової групи вдвічі менші (див. табл. 3). Це свідчить про оптимальну реакцію системи регуляції ритму серця на психоемоційне навантаження.

ВИСНОВКИ

1. Продуктивність зорового сприйняття та ефективність переробки зорової інформації у спортсменів вікової групи від 19 до 24 років є вищими, ніж у спортсменів віком від 27 до 31 років, що загалом може свідчити про залежність сприйняття та переробки інформації у спортсменів високої кваліфікації від віку.

2. Психоемоційне напруження у спортсменів старшої вікової групи викликає значні зміни у регуляції варіабельності ритму серця, тоді як у спортсменів молодшої вікової групи за таких самих умов системи регуляції

ритму сердца на психоемоційне навантаження працюють зі значно меншим напруженням.

Л.Г. Коробейникова, М.Ю. Макаrchук

ВОСПРИЯТИЕ, ПЕРЕРАБОТКА ЗРИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ К ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫМ НАГРУЗКАМ У СПОРТСМЕНОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Среди многочисленных исследований, посвященных изучению восприятия и переработки информации в условиях экстремальной напряженной мышечной деятельности спортсменов высокой квалификации, отсутствуют данные о влиянии на эти процессы возраста. В работе изучалось влияние психоэмоциональной нагрузки и разных уровней стрессоустойчивости на психические процессы восприятия и мышления у спортсменов высокой квалификации (члены сборной команды Украины по греко-римской борьбе) двух возрастных групп. Младшую группу составили 12 спортсменов в возрасте от 19 до 24 года, а старшую – 7 спортсменов в возрасте от 27 до 31 года. Выявлено, что у спортсменов младшей возрастной группы выше производительность зрительного восприятия и лучшая эффективность переработки зрительной информации по сравнению со спортсменами старшей возрастной группы. Это свидетельствует о наличии зависимости когнитивного компонента восприятия и переработки информации от возраста у спортсменов высокой квалификации. У спортсменов старшей возрастной группы выявлено более высокую стрессоустойчивость.

Ключевые слова: стрессоустойчивость, психоэмоциональная нагрузка, особенности восприятия, переработка информации, возрастные особенности.

L.G. Korobeynikova, M.Y. Makarchuk

PERCEPTION, PROCESSING OF VISUAL INFORMATION AND RESISTANCE TO EMOTIONAL STRESSES IN ATHLETES OF DIFFERENT AGES

Among the numerous studies devoted to the study of perception and information processing, no data available on the effects of age on these processes. In this paper we studied the influence of psycho-emotional stress and different levels of stress on the mental processes of perception and information processing in highly skilled athletes divided into two groups. The first group included the athletes aged 19-24 years (12 athletes, members of the Ukrainian team in Greco-Roman wrestling), the second group included the athletes aged 27-31 years (7 highly skilled athletes, members of the Ukrainian team in Greco-Roman wrestling). We revealed that the athletes of the first group had higher productivity and better visual perception and visual information processing efficiency, compared with athletes from

the second group. This observation suggests a dependency of cognitive component of perception and information processing on the age of the athletes. Sportsmen from the second group had higher stress resistance compared to the older age group. Key words: stress, psycho-emotional stress, especially perception, information processing, age-specific features.

Kyiv National Taras Shevchenko University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баевский Р.М. Классификация уровней здоровья с точки зрения теории адаптации // Вестн. РАМН СССР. – 1989. №8. – С. 73–78.
2. Зильберман П.Б. Эмоциональная устойчивость оператора // Очерки психологии труда оператора / Под ред. Е.А. Милеряна. – М.: Наука, 1974. – С.138–172.
3. Ильин Е.П. Психфизиология состояний человека. – СПб.: Питер, 2005. – 412 с.
4. Коробейников Г.В. Физиологические механизмы мобилизации функциональных резервов организма человека при напряженной мышечной деятельности // Физиология человека. – 1995. – 21, № 3. – С. 81–86.
5. Коробейников Г.В. Психфизиологические механизмы умственной деятельности человека. – К.: Укр. фітосоц. центр, 2002. – 123 с.
6. Макаренко Н.В., Лизогуб В.С. Комп'ютерна система «Діагност-1» для визначення нейродинамічних властивостей вищої нервової діяльності – В кн.: Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій в онтогенезі / Матеріали V наукового симпозиуму (23–25 травня 2012). – Черкаси, 2012. – С.60.
7. Макаренко Н.В., Пухов В.А., Кольченко Н.В. Основы профессионального психофизиологического отбора. – К.: Наук. думка, 1987. – 244 с.
8. Мищенко В.С., Лысенко Е.Н., Виноградов В.Е. Реактивные свойства кардиореспираторной системы как отражение адаптации к напряженной мышечной деятельности. – К.: Наук. світ, 2007. – 351 с.
9. Павлик А.И. Эффективность соревновательной деятельности велосипедистов высокой квалификации в зависимости от уровня функциональной подготовленности // Наука в олимп. спорте. – 2002. – № 3-4. – С. 127–134.
10. Платонов В.Н. Общая теория подготовки спортсменов в олимпийском спорте. – К.: Олимп. лит-ра, 1997. – 583 с.
11. Реброва О.Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях // Междунар. журн. мед. практики. – 2000. – № 4. – С.43–46.
12. Korobeynikov G., Mazmanian K., Jagello W. Psychophysiological states and motivation in elite judokas // Archives of Budo J. – 2010. – 6. – P. 129–136.
13. Brisswalter J., Collardeau M., Arcelin R. Effects of acute physical exercise on cognitive performance // Sports Medicine. 2002. – №32. – P. 555–566.
14. Collardeau M., Brisswalter J., Vercauysen F. Single

- and choice reaction time during prolonged exercise in trained subjects: influence of carbohydrate availability // Eur. J. Appl. Physiol. 2001. – № 86. – P. 150–156.
15. Dornic S., Dornic V. A high-load information-processing task for stress research // Percept. & Mot. Skills. – 1987. – 65, №.3. – P.712–714.
16. Drummond M.J., Vehrs P.R. Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption // J. Strength. and Condit. Res. – 2005. – №19, 2. –P. 332–377.
17. Van der Molen M.W. Energetics and the reaction process: Running threads through experimental psychology. – In: Handbook of perception and action / Eds.O. Neumann & A.F. Sanders. – 1996. – 3. – P. 229–276.
18. Shannon C.E. A mathematical theory of communication // Bell.System.Tech.J. – 1948. – №27. – P. 379.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: lesia.66@mail.ru

Матеріал надійшов до
редакції 26.10.2012

А.Г. Ященко, О.М. Вдовиченко

Особливості фазової структури серцевого циклу у дітей молодшого шкільного віку

За допомогою методу тетраполярної імпедансної реоплетизмографії вивчали фазову структуру серцевого циклу у дітей молодшого шкільного віку. Показано, що скорочення тривалості серцевого циклу у дітей зумовлене насамперед зменшенням тривалості загальної діастолі, яка становить у шестирічних дітей 48 %. З віком тривалість серцевого циклу зростає. У дітей 6 років середнє значення цього показника становить $0,636 \pm 0,017$ с, у 12 років – $0,702 \pm 0,020$ с. Найменше значення тривалості серцевого циклу виявлене у дітей 10 років ($0,617 \pm 0,018$ с). У дітей 9–11 років спостерігається також погіршення скоротливої функції серцевого м'яза.

Ключові слова: фазова структура серцевого циклу, діти молодшого шкільного віку.

ВСТУП

Перші дослідження процесів, які зумовлюють діяльність серця – скорочення (систолу) та розслаблення (діастолу) пов'язують з ім'ям Гарвея [3]. В його роботі «Анатомическое исследование о движении сердца и крови у животных», опублікованої у 1628 р., говориться про поділ скорочення серцевого м'яза на окремі фази – період напруження та викиду крові з шлуночків серця до судин.

Подальший етап досліджень у цьому напрямку – XIX століття – характеризується використанням серії різних методичних підходів (динамо-, електро- та фоно-, полікардіографія, електрокімографія), які дали змогу вимірювати окремі короточасні фази скоротливого процесу серця [11, 12, 15, 18].

Найбільший внесок у формування сучасних уявлень про тривалість окремих фаз серцевого циклу внесли Wiggers [8], Blumberger [10], Hollback [14], Карпман [5]. Завдяки даним досліджень цих авторів вивчення фазової структури серцевого циклу по праву зайняло своє місце в арсеналі фізіологічних досліджень серцево-судинної системи [6, 18]. Разом з тим дотепер структура серцевого ци-

клу дитини досліджена недостатньо. Окремі публікації [1, 2, 4, 7, 13, 16], проведені з використанням різних методик, не дають змоги однозначно оцінювати тривалість окремих фаз серцевого циклу у дітей різного віку.

Мета нашого дослідження - вивчення тривалості середніх значень основних фаз серцевого циклу у дітей молодшого шкільного віку (6–12 років).

МЕТОДИКА

У дослідженні, яке проводили вранці у положенні сидячи, брали участь 128 учнів київських міських шкіл віком від 6 до 12 років.

Абсолютні і відносні значення тривалості окремих фаз серцевого циклу вивчали за допомогою методу імпедансної тетраполярної реоплетизмографії (реоаналізатор «ReoCom ХАІ»). Реєстрували тривалість серцевого циклу (ТСЦ), загальної та механічної систоли (ТЗС і ТМС), періоду напруження (ПН) та його складових – фази асинхронного та ізометричного скорочення (ФАС та ФІС), а також періоду викиду крові (ПВ) та його фаз – швидкого та повільного (ФШВ та ФПВ). Вимірювали абсолютні значення вищезна-

чених складових і розраховували відносні: 1) відношення тривалості окремого складника до значення ТСЦ; 2) щорічні зміни значень тривалості окремого складника серцевого циклу до ТСЦ; 3) аналізували вираженість щорічних змін кожного складника серцевого циклу відносно відповідних значень у 6-річної дитини.

Отримані кількісні характеристики обробляли за допомогою математичної статистики – обраховували середньоарифметичні абсолютні значення кожного складника (\bar{x}), помилку середнього ($\pm m$), квадратне відхилення від середнього (σ) та вірогідність змін досліджуваних показників за критерієм t Стьюдента (Statistika 6).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що ТСЦ у дітей менша, ніж у дорослої людини ($0,811 \pm 0,020$ с), що зумовлено істотним зменшенням тривалості загальної діастолі (ТЗД). За нашими результатами у дітей 6 років остання становить 47,49 %, тоді як у дорослої людини вона перевищує 50,00 % (до 74,07 %). Незважаючи на те, що ТСЦ у дітей 6 років приблизно на 21,58 % менша за таку у дорослої людини, ТЗС у шестирічної дитини менша всього на 2,91 %, ніж у дорослої людини.

Ми вивчали значення ТСЦ у дітей від 6 до 12 років та проаналізували вираженість

їх змін (табл. 1).

Найбільш виражено змінюється абсолютне та відносне значення ТСЦ у дітей 12 років. Слід відмітити зменшення вираженості зростання ТСЦ у дітей 9, 10 та 11 років. У віці 10 років цей показник стає навіть меншим, ніж у 6-річних дітей.

Нами також визначені абсолютні значення ТЗС, ТМС та проаналізовано щорічні зміни цих показників у дітей молодшого шкільного віку (табл. 2).

Слід відмітити, що абсолютні середні значення ТЗС і ТМС з віком зростають, але питома маса тривалості цих складників відносно ТСЦ при цьому зменшується, найбільше значення спостерігається у дітей 10 років. Подібний характер щорічних змін значень ТМС виявлено також у дітей 9–11 років.

Як відомо, систола шлуночків складається із 2 складників – ПН та ПВ. У свою чергу у ПН розрізняють 2 фази, а саме ФАС та ФІС [5, 14].

За даними багатьох авторів тривалість ПН не залежить або мало залежить від ритму скорочень серця, тому вивчення її щорічних змін у дітей молодшого шкільного віку надає більш широкі можливості для оцінки виявлених відмінностей порівняно зі здоровою дорослою людиною.

Як видно з результатів, тривалість абсолютного середнього значення ПН у дітей молодшого шкільного віку здебільшого пе-

Таблиця 1. Середні значення тривалості серцевого циклу та щорічні зміни у дітей 6–12 років

Вік, роки	Тривалість серцевого циклу		
	$\bar{x} \pm m, c$	%	$\Delta, \%$
6 (n=10)	0,636 \pm 0,017	78,42	21,58
7 (n=20)	0,674 \pm 0,022	83,11	16,89
8 (n=13)	0,684 \pm 0,031	84,34	15,66
9 (n=13)	0,652 \pm 0,017	80,39	19,61
10 (n=10)	0,617 \pm 0,018	76,08	23,92
11 (n=13)	0,642 \pm 0,024	79,16	20,84
12			
хлопчики (n=24)	0,702 \pm 0,020*	86,56	13,44
дівчатка (n=25)	0,702 \pm 0,019*	86,56	13,44

*P < 0,05 порівняно з шестирічними.

Таблиця 2. Середні значення тривалості (с) загальної та механічної систоли у дітей молодшого шкільного віку

Вік, роки	Загальна систола		Механічна систола	
	$\bar{X} \pm m, c$	%	$\bar{X} \pm m, c$	%
6 (n =10)	0,334±0,008	52,51	0,267±0,011	41,98
7 (n =20)	0,339±0,005	50,29	0,269±0,005	39,91
8 (n =13)	0,305±0,017	44,59*	0,230±0,017	33,62*
9 (n = 13)	0,348±0,004	53,37	0,275±0,005	42,18
10 (n = 10)	0,340±0,006	55,10	0,277±0,007	44,89
11 (n = 13)	0,343±0,010	53,42	0,261±0,009	40,05
12				
хлопчики (n =24)	0,361±0,017	51,42	0,271±0,004	38,61
дівчатка (n = 25)	0,360±0,019	51,28	0,265±0,016	37,75

*P = 0,03; **P = 0,01.

ревищує таку у дорослих; лише у віці 6, 8 та 12 років (хлопчики) вони збігаються. Деякі автори [5, 10, 14, 17] визначали значення ПН у межах від 0,081 до 0,097 с.

Нами показано, що тривалість ПН з віком зменшується, але у 9–12-річних дітей знову зростає. Подовження тривалості ПН багатьма дослідниками розцінюється як погіршення функціональної здатності серцевого м'яза. Тому що цей період є лише підготовчим для наступного періоду систоли, під час ПН не реалізується корисна енергія його скорочення, а саме не відбувається викид внутрішньошлуночкового об'єму крові до судин. Таким чином, очевидно, що значне збільшення тривалості ПН у дітей 9–11 років, слід розцінювати як ознаку певної функціонального напруження в діяльності серця.

Відносне подовження тривалості ПН у дітей 9–11 років порівняно зі школярами 6–8 та 12 років зумовлене збільшенням тривалості переважно ФІС.

На думку Карпмана [5] середнє значення ФІС у здорової дорослої людини в стані спокою не перевищує 0,05 с і знаходиться в межах від 0,02 до 0,05 с. Як видно з результатів, наведених у табл. 3, тривалість ФІС у дітей молодшого шкільного віку знаходиться в межах 0,025–0,047 с; окремо слід відмітити відносне збільшення значення цього показника у дітей 9–11 років.

Відповідно до сучасних уявлень про фізіологічне значення тривалості складових серцевого циклу та їх змін, скорочення ФІС розцінюється як реальна ознака збільшення потужності серцевого скорочення.

Таблиця 3. Середні значення тривалості періоду напруження (ПН) та його складових – фази асинхронного та ізометричного скорочення (ФАС, ФІС) у дітей молодшого шкільного віку

Вік, роки	ПН		ФАС		ФАС/ПН · 100 %	ФІС		ФІС/ПН · 100 %
	$\bar{X} \pm m, c$	%	$\bar{X} \pm m, c$	%		$\bar{X} \pm m, c$	%	
6 (n=10)	0,110±0,004	15,72	0,067±0,004	10,53	67,00	0,033±0,004	5,18	33,00
7 (n=20)	0,103±0,003	15,28	0,069±0,005	10,24	66,99	0,032±0,003	4,75	31,06
8 (n=13)	0,100±0,003	14,62	0,075±0,004	10,96	75,00	0,025±0,003*	3,65	25,00*
9 (n=13)	0,112±0,004	17,18	0,073±0,005	11,20	65,18	0,039±0,004	5,98	34,82
10 (n=10)	0,107±0,004	17,34	0,061±0,005	9,89	57,01*	0,047±0,005	7,62	43,92
11 (n=13)	0,112±0,005	17,44	0,082±0,005	12,77	73,21	0,034±0,003	5,29	30,36
12								
хлопчики (n=24)	0,102±0,003	14,53	0,070±0,003	9,97	68,63	0,032±0,002	4,56	31,38
дівчатка (n=25)	0,110±0,002	15,67	0,078±0,002	11,11	70,91	0,032±0,002	4,56	29,09*

P=0,03.

Нами також визначені значення тривалості другого періоду систоли – ПВ. Тривалість ПВ відносно ТСЦ, починаючи з віку 8 років, зменшується. Але враховуючи той факт, що в цьому віці ТСЦ є меншою, ніж у 11 років питома маса тривалості цього показника є різною: у 8 років вона становить 29,97 %, тоді як у 11 років – 35,36 %. Слід зазначити, що тривалість швидкого викиду крові у дітей молодшого шкільного віку змінюється менш виражено, ніж тривалість фази повільного або редукованого викиду крові. Так, у дітей 8, 10, 11 та у дівчаток 12 років абсолютне середнє значення ФПВ знаходиться в межах $0,171 \pm 0,016 - 0,198 \pm 0,006$ с, відповідно питома маса показника у дітей цього віку становить 25–28 % щодо 30 % і більше у дітей іншого віку. Вважається, що зменшення тривалості значень ПВ свідчить про віддзеркалення позитивних хронотропних впливів на серцевий м'яз з боку екстракардіальних нервів.

Останнім часом збільшилося число публікацій, присвячених вивченню тривалості окремих фаз серцевого циклу, що говорить про високу ефективність аналізу цих значень для об'єктивної кількісної оцінки скорочувальної функції серцевого м'яза, тим не

менш, на нашу думку, ця проблема потребує подальшої розробки, особливо щодо вивчення абсолютних значень тривалості окремих фаз серцевого циклу на більших масивах обстежених дітей та їх змін залежно від вимог навколишнього середовища.

ВИСНОВКИ

1. Зменшення ТСЦ у дітей молодшого шкільного віку (6–12 років) відносно значень у здорової дорослої людини зумовлене значним скороченням тривалості діастоли: у дітей 6 років середня ТЗД становить 48,58 % від ТСЦ.

2. З віком ТСЦ зростає. У дітей 12 років цей показник вірогідно перевищує значення у шестирічних дітей ($P=0,03$). Найменша ТСЦ нами виявлена у дітей 10 років, тобто вона на 2,34 % є меншою, ніж у дітей 6 років.

3. У дітей молодшого шкільного віку тривалість ПН перевищує середнє значення у дорослих. Найбільшу тривалість цього показника виявлено у дітей 6, 9, 11 років ($0,110 \pm 0,004; 0,112 \pm 0,004; 0,112 \pm 0,005$ с).

4. Відносно збільшення тривалості ФІС у дітей 9–11 років можна розцінювати як ознаку зменшення потужності скоротливої здатності серця.

Таблиця 4. Середні значення періоду викиду крові (ПВ) та його фаз повільної та швидкої (ФШВ і ФПВ) у дітей молодшого шкільного віку

Вік, роки	ПВ		ФШВ		ФШВ/ПВ · 100 %	ФПВ		ФПВ/ ТСЦ, %	ФПВ/ПВ · 100 %
	$\bar{x} \pm m, c$	%	$\bar{x} \pm m, c$	%		$\bar{x} \pm m, c$	%		
6 (n=10)	0,234±0,010	36,79	0,037±0,004	4,87	15,81	0,203±0,009	5,18	31,92	86,75
7 (n=20)	0,236±0,005	35,01	0,033±0,001	4,90	13,98	0,203±0,005	4,75	30,12	86,02
8 (n=13)	0,205±0,016	29,97	0,034±0,001	4,97	16,58	0,171±0,016	3,65	25,00	83,41
9 (n=13)	0,236±0,004	36,20	0,035±0,002	5,37	14,83	0,201±0,004	5,98	30,83	85,17
10 (n=10)	0,235±0,004	38,09	0,037±0,004	5,99	15,74	0,198±0,005	7,62	32,09	84,25
11 (n=13)	0,227±0,010	35,56	0,032±0,002	4,98	14,09	0,195±0,009	5,29	30,37	85,90
12									
хлопчики (n=24)	0,239±0,004	34,04	0,036±0,001	5,13	15,06	0,204±0,003	4,56	29,05	85,35
дівчатка (n=25)	0,232±0,006	33,05	0,035±0,001	4,98	13,36	0,198±0,005	4,56	28,20	85,34

Примітка. ТСЦ – тривалість серцевого циклу.

А.Г. Ященко, Е.М. Вдовиченко

ОСОБЕННОСТИ ФАЗОВОЙ СТРУКТУРЫ СЕРДЕЧНОГО ЦИКЛА У ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

При помощи метода тетраполярной импедансной реоплетизмографии изучали фазовую структуру сердечного цикла у детей младшего школьного возраста. Показано, что уменьшение продолжительности сердечного цикла у детей обусловлено, прежде всего, за счет уменьшения продолжительности общей диастолы, среднее значение которой у детей 6 лет составляет 48 %. С возрастом продолжительность сердечного цикла ежегодно возрастает, у детей 12 лет она достоверно превышает значения у 6-летних школьников. Наименьшее значение средней продолжительности сердечного цикла выявлено у детей 10 лет ($0,617 \pm 0,018$ с).

Ключевые слова: фазовая структура сердечного цикла, дети младшего школьного возраста.

A.G. Yashchenko, E.M. Vdovitchenko

THE DYNAMIC OF ANNUAL MODIFICATION OF PHASIC STRUCTURE OF CARDIAC CYCLE IN CHILDREN OF JUNIOR SCHOOL AGE

By using of the method of tetrapolar impedance rheoplethysmography we studied the phasic structure of cardiac cycle in children of junior school age. We have shown that a decrease of cardiac cycle duration in children is due to a decrease of the common diastole duration, the mean fraction of which in children of six years is 48,58 % from the cardiac cycle duration. With age the duration of cardiac cycle increases. In 12 y.o. children this parameter is significantly higher ($0,702 \pm 0,020$ s) that that observed in 6 y.o. children ($0,636 \pm 0,017$ s). The shortest duration of cardiac cycle is detected in 10 y.o. children ($0,617 \pm 0,018$ s).

Key words: phasic structure of cardiac cycle, the children of junior school age.

State Scientific Research Institute of Physical Culture and Sports, Kyiv;

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Буртман Р.И. Нормативы динамокардиограммы у детей в возрасте от 7 до 15 лет // Педиатрия. – 1960. - №8. – С. 62–67.
2. Галстян А.А. Определение временных соотношений фаз систолы у детей // Там же. – 1962. - №7. – С. 49–55.

3. Гарвей В. Анатомическое исследование о движении сердца и крови у животных. – М. – Л.: Изд. АН СССР. – 1948. – 149 с.
4. Иваницкая И.Н. Взаимоотношения между электрическими и механическими проявлениями сердечной деятельности человека (научный обзор). – В кн.: Вопросы физиологии и патологии сердца. – М.: Медицина, 1964. – Вып. 1. – С. 72–102.
5. Карпман В.Л. Фазовый анализ сердечной деятельности. – М.: Медицина, 1965. – 285 с.
6. Макаридзе О.В. Фазовая структура сердечного цикла левого и правого желудочков сердца в норме // Физиология человека. – 1998. – 24, № 4. – С. 133–135.
7. Осколкова М.К. Соотношение электрической и механической систолы и ритма сердца у здоровых детей // Педиатрия. – 1964. – С. 45–50.
8. Уиггертс К. Динамика кровообращения. – М.: Медицина, 1957. – 144 с.
9. Яковлева Л.В., Галышева З.К., Бурангулова А.В. Особенности диагностики диастолической функции у детей подросткового возраста с артериальной гипертензией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – 55, № 3. – С. 58–60.
10. Blumberger K. Die Anspannungszeit und Austreibungszeit beim Menschen // Arch. Kreislaufforsch. – 1940. – № 6. - S. 203–292.
11. Chauveau A., Marey E. Memor de l' Acad imper. – 1976. - 26. – S. 268.
12. Henderson Y. The volume curve of the ventricles of the mammalian heart, and the significance of this curve in respect to the mechanics of the heart-beat and the filling of the ventricles // Amer. J. Physiol. – 1906. – 16, № 3. – P. 325–367.
13. Hockerts T. Untersuchungen über die Dauer der isometrische kontraktionsphase des gesunden kindlichen Herzens // Z. Kinderheilkunde. – 1952. – 71, № 3. – S. 216–222.
14. Holldack K. Die Bedeutung der Unformungs and Drückanstiegszeit für die Hemodynamik // Dtsch. Arch. Klin. Med. – 1951. – 198, № 71. – 90.
15. Hürthle K. Beiträge zur Hämodynamic // Pflüg. Arch. – 1891. – 49, № 1–2. – S. 29–104.
16. Keuth U. Zum Ablauf der Herzenkontraktion im Kindesalter // Kinderheilkunde. – 1961. – 86, № 2. – S. 177–183.
17. Nazzi V., Ricco G., Meda A. Considerations sur la dynamique du Coeur (La systole ventriculaire etudiee ou moyen de la methode polygraphique) // Cardiol. – 1954. – 24, № 6. – S. 319–345.
18. Venyovtseva Y.L., Melnikov A.C., Revyakina V.V. Left and right hearth chambers interaction in healthy youth // Rus. J. Biomech. – 1999. - № 1. – P. 47–52.
19. Volkman A. Hämodynamic // Leipzig. — 1950.

*НДІ фіз. культури і спорту, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 23.01.13*

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

Протизапальна дія фулерену C_{60} при ад'ювантному артриті у щурів

Досліджено протизапальні властивості немодифікованого фулерену C_{60} (FC_{60}) при експериментальному ад'ювантному артриті у щурів лінії Вістар. Визначено, що при інтраперитонеальному його введенні (50 нг) виявляються протизапальні та хондропротекторні дії у фазу розвитку системних проявів. Ефект реалізовувався обмеженням локального запалення ураженої кінцівки, нормалізацією маси та зниженням температури тіла. Введення FC_{60} сприяло вірогідному зниженню числа лейкоцитів і швидкості осідання еритроцитів, концентрації сіалових кислот і церулоплазміну, пригніченню процесів дегенерації хрящової тканини суглобів щурів. Зроблено висновок, що терапевтична ефективність немодифікованого FC_{60} при експериментальному ад'ювантному артриті є подібною з дією водорозчинних форм фулеренів. Результати обґрунтовують подальші дослідження немодифікованого FC_{60} для розробки перспективних засобів патогенетичної терапії ревматоїдного артрити у клініці.

Ключові слова: наночастинки, фулерен C_{60} , ад'ювантний артрит.

ВСТУП

Сьогодні фулерен C_{60} (FC_{60}) – перспективний і важливий фармакологічний агент у сучасній наномедицині та може розглядатись як основа для отримання нових високотехнологічних матеріалів і препаратів [12, 23]. Він є алотропною формою вуглецю з унікальною, стабільною хімічною структурою, завдяки якій забезпечується різноманітність радикальних взаємодій, біосумісність, низька імунотоксичність та адресне постачання до різних клітин-мішеней, що значною мірою визначає його широкий спектр застосування в медицині [11].

Найбільш детально досліджено та підтверджено позитивний ефект використання FC_{60} і його модифікованих похідних при різних патологічних станах кісткової тканини, зокрема – при артритах, що зумовлений пригніченням процесів формування матриксу та продукції його металопротеїназ-1, -3, -13, апоптозу і передчасного старіння хондроцитів [34], суттєвим інгібуванням

відповіді попередників остеокластів на ліганд рецептора активатора ядерного фактора транскрипції κB /RANK, включаючи диференціювання остеокластів і резорбцію кістки *in vitro* [32].

Внутрішньосуглобове введення водорозчинного FC_{60} при експериментальному ад'ювантному артриті (АА) у щурів зменшує кількість остеокластів, резорбцію кістки і деструкцію кісткової тканини [32], знижує дегенерацію суглобового хряща при остеоартриті у кролів [34]. Зроблено висновок, що водорозчинний FC_{60} може мати хондропротекторні властивості у пацієнтів з остеоартритом.

Нами в попередньому дослідженні немодифікованого FC_{60} отримані дані про можливість його впливу на активність імунологічних процесів внаслідок пригнічення фагоцитозу, адгезії тощо [3–6].

Мета нашої роботи – вивчення протизапальних властивостей немодифікованого FC_{60} при АА у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 40 щурах-самцях лінії Вістар (250–280 г), які знаходились у стандартних умовах віварію, відповідно до дозволу комісії з етичних питань та біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Тварини були поділені на 5 груп по 8 щурів у кожній. До I групи ввійшли інтактні щури, до II (контрольної) – тварини яким вводили стерильний фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, рН 7,2) одноразово по 100 мкл у праву задню лапу субплантарно. Тваринам III, IV і V – індукували розвиток експериментального АА одноразовим введенням 0,1 мл стерильного повного ад'юванта Фрейнда у праву задню лапу субплантарно [1]. Через 14 діб після індукції АА тваринам III групи вводили по 100 мкл стерильного ФСБ у праву задню лапу (раз на добу, впродовж 15 діб, субплантарно), IV – препарат порівняння – метотрекат (МТХ; “Лахема”, Чехія) в дозі 0,6 мг/кг (раз на тиждень, впродовж 15 діб, внутрішньом'язово); V – водну дисперсію FC_{60} у дозі 50 нг у 100 мкл стерильного ФСБ (раз на добу, впродовж 15 діб, інтраперитонеально) [27]. Водну дисперсію немодифікованого FC_{60} отримували перемішуванням чистого FC_{60} (“Sigma”, США) в стерильній деіонізованій воді за асептичних умов на магнітному змішувачі впродовж 2 міс [18].

Проводили щодобовий моніторинг стану тварин впродовж 30 діб. Розвиток АА оцінювали в динаміці за клінічними ознаками: інтенсивність запалення у правій задній лапі (вимірювання діаметра лапи), зміни середньої маси тіла щурів (контроль зважуванням) і температури тіла (вимірювання ректально електронним термометром у вечірній час) [25]. Евтаназію тварин проводили під тіопенталовим наркозом на 30-ту добу експерименту, кров забирали у стерильні шприци з правого передсердя серця щурів.

Підраховували кількість лейкоцитів і визначали швидкість осідання еритроцитів

(ШОЕ) у крові щурів за загальноприйнятими методами. Концентрацію церулоплазмину і сіалових кислот досліджували колориметричним методом [1, 2].

Для гістологічного дослідження у щурів відбирали колінні суглоби з фрагментами кісток стегна і гомілки, тканини фіксували у 10%-му розчині нейтрального формаліну, декальцинували у 10%-му розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти, заливали у парафін, зрізи забарвлені гематоксилін-еозином оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Leica DM500 (“Leica”, Німеччина) [1].

Статистичну обробку виконували за допомогою програми Statistica 6.0 (“StatSoft”, США) з обчисленням середнього (M) і стандартної помилки середнього (m). Достовірність відмін визначали за допомогою критерію t Стьюдента та тесту Уїлкоксона. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення протизапальних властивостей немодифікованого FC_{60} при АА у щурів нами для приготування розчину FC_{60} була обрана методика Dhavan та співавт. [18], яка дає змогу отримати агрегати наночастинок з діаметром 176–221 нм, концентрацією в розчині 0,18–0,26 мг/л з переважно сферичною або гексагональною формою та багаточисловою будовою [22].

Спостереження за тваринами інтактної і контрольної груп впродовж 30 діб не показало змін у їх стані. У групі тварин з АА знижувалася локомоторна активність, відмічено млявість, запальні зміни великих і малих суглобів передніх і задніх лап: поодинокі, а в деяких випадках невиражені локальні еритемні набряки в ділянці проксимальних фалангових, п'ясних або зап'ясних суглобів лап. Такі ознаки розвивалися поступово, виражені прояви реєструвались у всіх тварин переважно на 13–14 добу після індукції. У групах тварин, яким вводили FC_{60} або МТХ

проявлявся помірний розвиток клінічних ознак АА.

Введення ад'юванта Фрейнда тваринам викликало появу первинної запальної реакції в місці ін'єкції через 3 год у вигляді гіпере-

мії і набряку (рис. 1,а). Значне збільшення діаметра правої задньої кінцівки починалось з 11–14-ї доби і продовжувало зростати всі наступні доби спостереження на відміну від інтактних і контрольних тварин. Введення

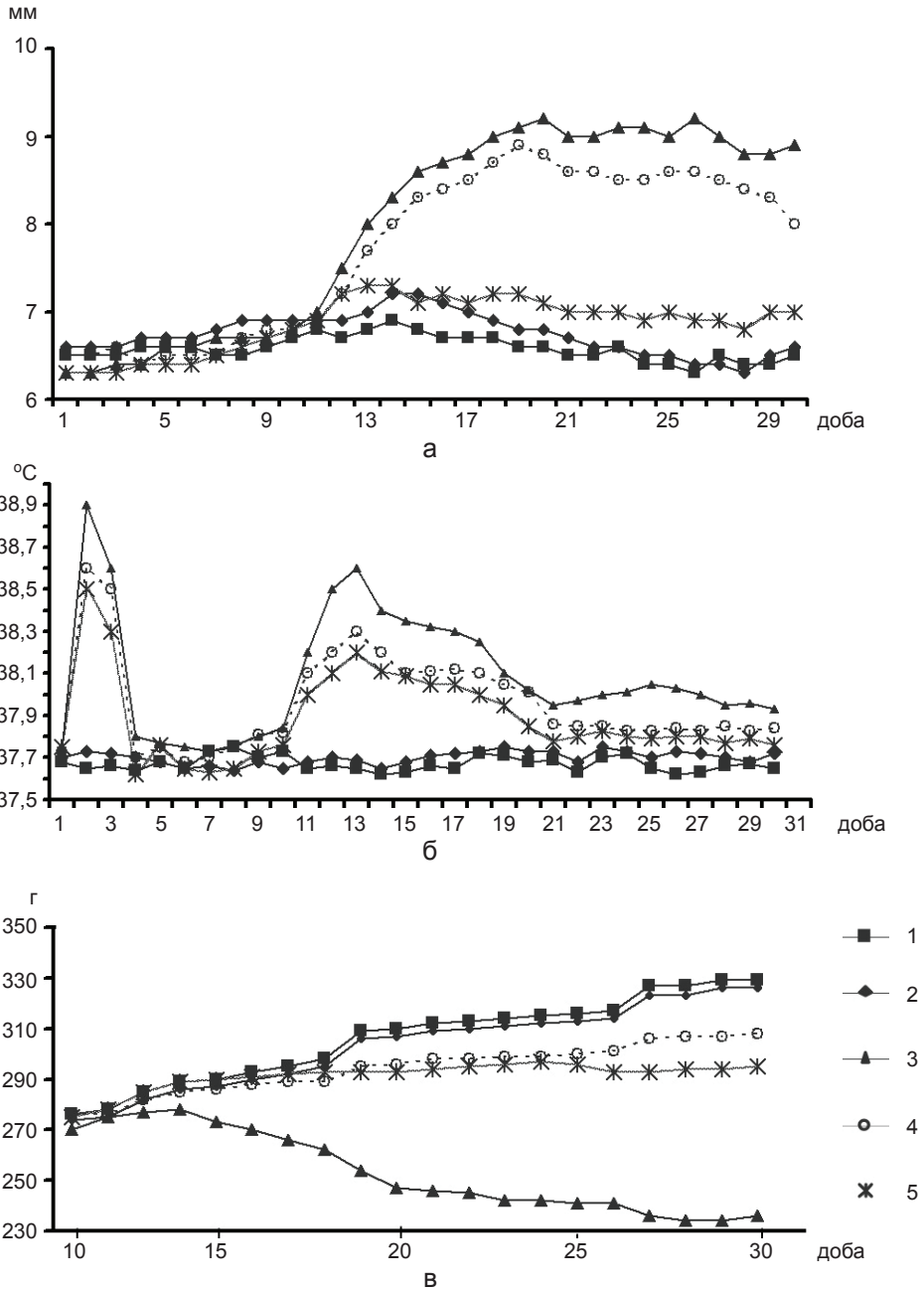


Рис. 1. Середні значення діаметра правої задньої лапи (а), температури (б) і маси тіла (в) щурів під час розвитку ад'ювантного артриту (АА): 1 – інтактні, 2 – контрольні щури, які отримували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 3–5 – дослідні тварини, які під час розвитку АА отримували ФСБ, метотрексат і фулерен C₆₀ відповідно. За віссю абсцис – доби після індукції АА у щурів

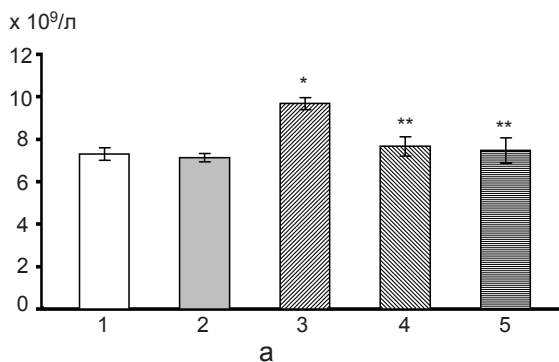
FC₆₀ шурам з АА зменшувало діаметр запальної кінцівки і гіперемію шкіри протягом спостереження. Під впливом МТХ у них незначно зменшувався діаметр запальної кінцівки.

Контроль за температурою тіла шурів виявив два піки: перший пік – на 1-шу добу після введення ад'юванта Фрейнда (розвиток фази локального запалення) з наступним зниженням, і другий – на 12–13-ту добу (розвиток фази системного запалення) з наступним зниженням значень показників до 30-ї доби (див. рис. 1,б). У групах, які отримували FC₆₀ і МТХ, згладжувалися пікові показники температури у порівнянні з хворими тваринами.

Маса тіла тварин з АА поступово знижувалася, починаючи з 14-ї доби, на відміну від тварин інтактної і контрольної груп, у яких відмічено поступове збільшення значень показників (див. рис. 1,в). У тварин, яким вводили FC₆₀ і МТХ, маса тіла підтримувалася на одному рівні без вираженого зниження.

Кількість лейкоцитів у тварин з АА достовірно збільшувалася (рис. 2,а). Введення їм FC₆₀ сприяло зниженню числа лейкоцитів практично до значень інтактних тварин. Препарат порівняння МТХ діяв односпрямовано.

Поява лейкоцитозу у хворих тварин супроводжувалася достовірним збільшенням ШОЕ у порівнянні з інтактною групою (див. рис. 2,б). Використання FC₆₀ і МТХ призводило до однакового зниження цього показника (P<0,05).



Розвиток АА призводив до вірогідного збільшення концентрації маркера запалення церулоплазміну і сіалових кислот (рис. 3). У тварин, які отримували FC₆₀ ці показники знижувалися (P<0,05), а МТХ сприяв достовірному зниженню тільки вмісту церулоплазміну.

При гістологічному дослідженні було відмічено, що у нормальному колінному суглобі синовіоцити розміщені в один шар і неінфільтровані запальними клітинами (рис. 4,а). При АА проліферація синовіоцитів відмічалася від 3 до 8 шарів з утворенням паннуса. Суглобовий хрящ ерозивний і інфільтрований запальними клітинами (зубчаста інфільтрація мононуклеарними клітинами). Спостерігалися дегенерація з частковою ерозією хряща, деструкція кісткового мозку, численна інфільтрація і запальна ексудація у поверхню суглоба (див. рис. 4,б).

Введення тваринам з АА FC₆₀ призводило до зменшення ступеня морфологічних змін суглобів, який був порівняним за ефектом з МТХ (див. рис. 4,в).

Результати проведених досліджень показують наявність виражених протизапальних властивостей у FC₆₀, які проявлялись у зменшенні ознак локальної запальної реакції, стабілізації температури і маси тіла тварин, зниженні числа лейкоцитів і ШОЕ, вмісту церулоплазміну і сіалових кислот.

АА розвивається у шурів як системне аутоімунне захворювання з хронічним запаленням.

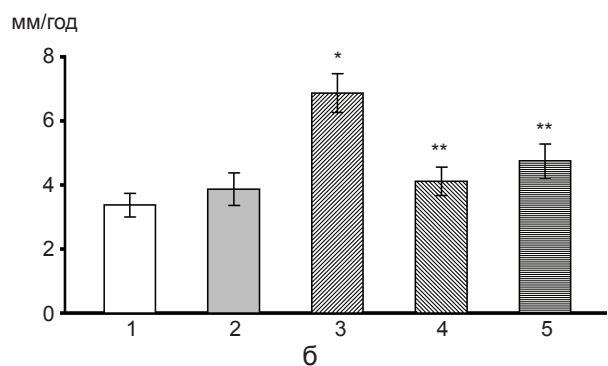


Рис. 2. Середні значення кількості лейкоцитів (а) та швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ; б) у досліджуваних групах шурів: 1 – інтактні, 2 – контрольні шури, які отримували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 3–5 – дослідні тварини, які під час розвитку ад'ювантного артриту отримували ФСБ, метотрексат і фулерен C₆₀ відповідно. *P<0,05 щодо значень інтактних тварин; **P<0,05 щодо значень у тварин, які отримували ФСБ під час розвитку захворювання

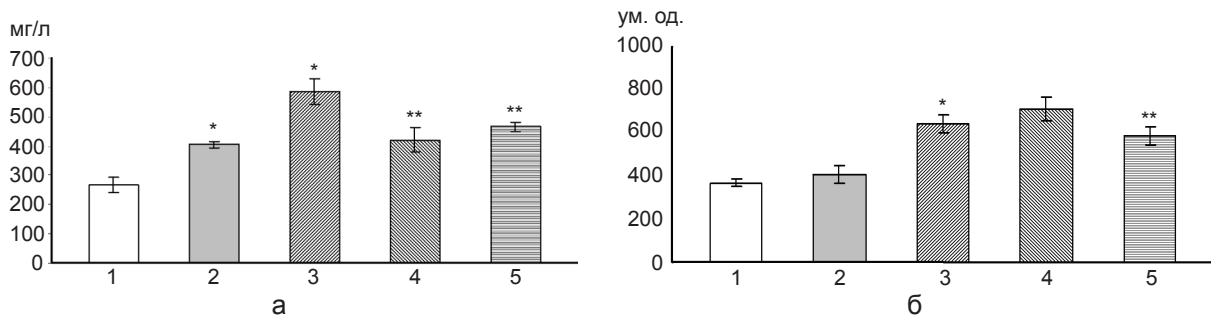


Рис. 3. Середні значення показників концентрації церулоплазміну (а) та сіалових кислот (б) у досліджуваних групах щурів: 1 – інтактні, 2 – контрольні щури, які отримували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 3–5 – дослідні тварини, які під час розвитку ад'ювантного артриту отримували ФСБ, метотрексат і фулерен C₆₀ відповідно. *P<0,05 щодо значень інтактних тварин; **P<0,05 щодо значень у тварин, які отримували ФСБ під час розвитку захворювання

ленням суглобів, деструкцією хрящів, вираженою резорбцією і проліферацією періосту кісток та позасуглобовими ураженнями [13, 31], в патогенезі яких лежать клітинні і гуморальні механізми імунних реакцій.

З одного боку, на 10–14-ту добу АА розвиваються клітинно-опосередковані реакції з переважною активацією Т-хелперів 1-го типу, які у великих кількостях продукують прозапальні цитокіни, зокрема інтерлейкіни (ІЛ): ІЛ-1, ІЛ-6 і фактор некрозу пухлин α (ФНП- α). Цитотоксичними ефектами прозапальних цитокінів, і перш за все ФНП- α , зумовлені основні прояви захворювання – хронічний синовіт, деструктивні ураження хряща і кістки. ФНП- α запускає механізм активації факторів транскрипції (NF- κ B, AP-1, JNK), які регулюють гени, що кодуєть синтез прозапальних цитокінів та інших медіаторів запалення. Зі вмістом прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП- α взаємопов'язаний розвиток структурно-метаболических змін запального характеру, втрата локомоторної активності і підвищення температури, що супроводжують АА [25].

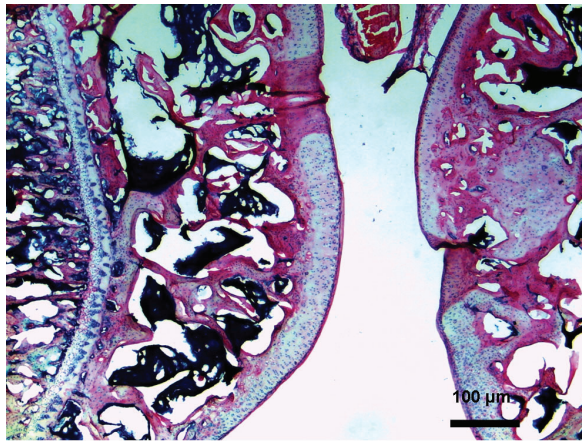
Застосування FC₆₀ на фоні розвитку АА показало зниження гіперемії і набряку лап, нормалізацію маси і температури тіла, стабілізацію таких показників запальної реакції, як число лейкоцитів і ШОЕ. Можливий механізм такого впливу лежить у пригніченні за допомогою FC₆₀ підвищеної продукції прозапальних цитокінів. Це підтверджують

раніше проведені дослідження на кератиноцитах. Відповідно до цих даних FC₆₀ пригнічує запальну реакцію блокуванням синтезу прозапальних цитокінів ІЛ-6, ІЛ-8 та ФНП- α [9, 20].

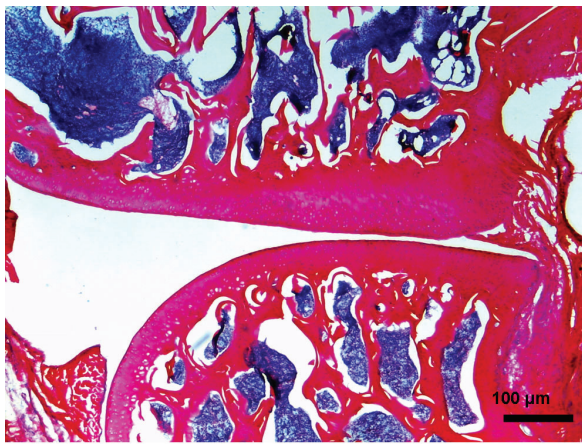
Ще одним аргументом на користь інгібування FC₆₀ синтезу цитокінів стали односпрямовані зміни в групі тварин, які отримували МТХ, що вважається «золотим стандартом» базової терапії ревматоїдного артриту, одним із можливих механізмів реалізації протизапальної дії якого (пригнічення гіперемії і набряку лап, нормалізація маси і температури тіла) [19, 29], є блокування синтезу про- і протизапальних цитокінів, ІЛ-1 β і ІЛ-10, які у свою чергу стимулюють активацію лейкоцитів [17].

Другим, не менш важливим і значущим фактором патогенезу АА є гуморальні механізми імунної відповіді. Вони реалізуються гіперпродукцією аутоантитіл (ревматоїдного фактора або антинуклеарних антитіл), що зумовлюють деструктивний вплив на кісткову та хрящову тканини, відіграючи роль хемоатрактантів нейтрофілів, стимулюють вивільнення фібробластами і хондроцитами ферментів і реакційнодатних метаболітів кисню, запускають активацію остеокластів, що призводить до ураження сполучної тканини суглобів [14].

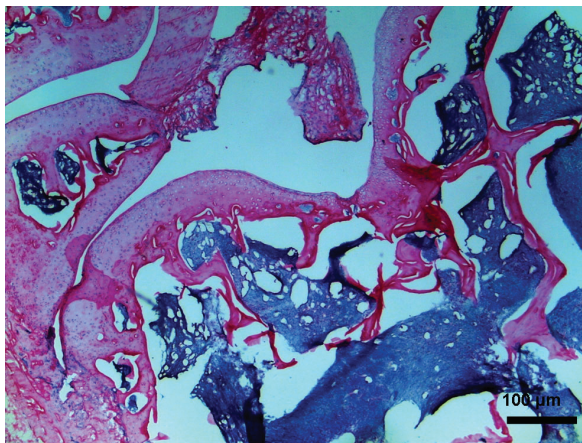
Нами отримані результати про зниження під впливом FC₆₀ концентрації церулоплазміну і сіалових кислот, в основі якого,



а



б



в

Рис. 4. Морфологічні зміни у колінному суглобі щурів: а – інтактні тварини; б – щури, які отримували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) під час розвитку ад'ювантного артриту (АА); в – щури, які отримували фулерен C_{60} під час розвитку захворювання. Шкала – 100 мкм

ймовірно, лежить здатність пригнічувати окисний стрес, як показано дослідженнями *in vitro* [26].

Церулоплазмін, відповідно до сучасних поглядів, є маркером гострої фази запалення [10], синтезується переважно клітинами печінки і ендотеліоцитами легень, де він захищає органи від окисативного ушкодження. Висока концентрація церулоплазміну у тварин з АА узгоджується з сучасними уявленнями про роль мідьвмісних ферооксидаз у механізмах запалення при аутоімунних захворюваннях [7]. За даними Chen і співавт. [16] і Johnston і співавт. [21], водорозчинний FC_{60} і його похідні можуть проявляти антиоксидантні властивості у печінці блокуванням активності цитохрому P450, що дає змогу попередити розвиток запалення і, таким чином, знизити рівень синтезу церулоплазміну. Це спостерігалось і в наших дослідженнях, і, ймовірно, реалізовувалося подібними механізмами.

Розвиток запальних процесів при АА супроводжується порушенням тканинного метаболізму суглобів, деполімеризацією глікопротеїнових комплексів з появою у сироватці крові продуктів розщеплення білково-вуглеводних комплексів і сіалових кислот [8], а також підвищенням рівня синтезу глікопротеїнів – гексоз, гексозамінів, фукоз, нейтральних моноцукрів, в тому числі і сіалових кислот [28].

У раніше проведених дослідженнях показано зниження концентрації сіалових кислот при введенні водорозчинного FC_{60} , що свідчить про його здатність стабілізувати тканинні структури суглобів [33]. Нами також отримані подібні результати при використанні немодифікованого FC_{60} .

Дані про позитивний вплив водорозчинного FC_{60} на експериментальній моделі остеоартриту, викликаного резекцією медіального меніска і медіальної колатеральної зв'язки у кролів [24] та експериментальному АА у щурів [22] дуже подібні до наших результатів дослідження.

Однак в обох експериментальних моделях було використано внутрішньосуглобове введення водорозчинного FC₆₀. У нашій роботі виражений терапевтичний ефект відзначався при інтраперитонеальному введенні немодифікованого FC₆₀. Нещодавно було встановлено, що еритроцити можуть активно поглинати FC₆₀ за допомогою інтерналізації та забезпечувати його транспортування з системним кровообігом до різних органів [24]. Ймовірно, позитивний вплив FC₆₀ при інтраперитонеальному введенні буде посилюватися внаслідок стабілізації мембран еритроцитів на фоні окисного стресу при АА.

Відомо, що вплив наночастинок на розвиток запальної відповіді в організмі значним чином залежить від їх розміру, поверхневої площі молекули і можливості приєднання до неї різних радикалів [15].

У використаній нами експериментальній моделі АА введення немодифікованого FC₆₀ і препарату порівняння МТХ починали через 14 діб після індукції, враховуючи стадійність розвитку запалення, коли з 10–14-ї доби різко загострювалися прояви захворювання, формувалися системні зміни, які з 23-ї доби переходили у хронічну стадію [30]. У ці строки в результаті в основному клітинно-опосередкованих імунологічних реакцій з переважанням Т-хелперів 1-го типу відбувається гіперпродукція прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-6 та ФНП-α (зберігається до 20-ї доби), котра зумовлює основні прояви захворювання – хронічний синовіт, деструктивні ураження хрящової та кісткової тканини суглоба. При цьому, знижується анаболізм протеогліканів у суглобах, яке є відображенням системних змін хряща і відповідає максимальному обмеженню рухливості тварин [25]. FC₆₀ проявляв протизапальну та хондропротекторну дію при АА у фазу розвитку системних проявів, коли відмічаються найбільше виражені зміни у хрящовій тканині. Ефект FC₆₀ проявлявся обмеженням локального запалення ураженої кінцівки, нормалізацією маси та зниженням температури тіла, зменшенням

числа лейкоцитів і ШОЕ, зниженням вмісту церулоплазміну і сіалових кислот, процесів дегенерації хрящової тканини суглобів.

Порівняння властивостей водорозчинної форми FC₆₀, відповідно до літературних даних, і немодифікованого FC₆₀, отриманих у нашому дослідженні, доводить, що його терапевтична ефективність у фазу розвитку системних проявів є подібною до дії водорозчинних форм при експериментальному АА. Одержані результати обґрунтовують подальші дослідження немодифікованого FC₆₀ для розробки перспективних засобів патогенетичної терапії ревматоїдного артриту у клініці.

ВИСНОВКИ

1. Розвиток АА у щурів призводив до запальних змін у суглобах і системних проявів, які мали циклічний характер. Введення МТХ достовірно зменшувало ступінь як локальної запальної реакції, так і системних проявів.

2. Експериментальна терапія щурів із АА за допомогою немодифікованого FC₆₀ обмежує розвиток локального запалення та системної відповіді з ефектом та силою подібним дії МТХ.

3. Протизапальна та хондропротекторна дія немодифікованого FC₆₀ при АА найбільш виражена у фазі розвитку системних проявів.

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

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

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ ПРИ АДЬЮВАНТНОМ АРТРИТЕ У КРЫС

Исследованы противовоспалительные свойства немодифицированного фуллерена C₆₀ (FC₆₀) при адьювантном артрите у крыс линии Вистар. Определено, что при интраперитонеальном его введении (50 нг) проявляются противовоспалительные и хондопротекторные свойства в

фазу розвитку системних проявлень. Ефект реалізовувався обмеженням локального запалення пошкодженої кінечності, нормалізацією маси і зниженням температури тіла. Введення FC_{60} сприяло достовірному зменшенню кількості лейкоцитів і швидкості осідання еритроцитів, концентрації сіалових кислот і церулоплазмина, угнетенню процесів дегенерації хрящової тканини суглобів крис. Сделано висновок, що терапевтична ефективність немодифікованого FC_{60} при експериментальному адьювантному артриті являється сопоставимою з дією водорозчинних форм фуллеренів. Результати обґрунтовують подальші дослідження немодифікованого FC_{60} для розробки перспективних засобів патогенетичної терапії ревматоїдного артрита в клініці.

Ключові слова: наночастинки, фуллерен C_{60} , адьювантний артрит.

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

THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF FULLERENE C_{60} ON ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS

The anti-inflammatory properties of non-modified fullerene C_{60} (FC_{60}) by adjuvant arthritis in Wistar rats have been studied. It was shown that the intraperitoneal introduction of FC_{60} (50 ng) reveals an anti-inflammatory and chondroprotective actions in the phase of systemic manifestation of adjuvant arthritis. The effect was carried out by limitation of inflammation of damaged limb, normalization of body weight, the decrease in body temperature. Introduction of FC_{60} promote the reduction of leukocyte level, the erythrocyte sedimentation rate, concentrations of sialic acids and the ceruloplasmin levels, processes degeneration of cartilaginous tissues of the joint of rats. It has been concluded that the therapeutic effectiveness of non-modified FC_{60} in experimental adjuvant arthritis is comparable with the action of water-soluble forms of fullerenes. The results substantiate the future investigations of non-modified FC_{60} for design of therapeutic agents for treatment of rheumatoid arthritis in clinics.

Key words: nanoparticles, fullerene C_{60} , adjuvant arthritis

Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О., Гейко О.А., Кайдашев І.П., Куценко Л.О., Ножинова О.А., Рябенко В.В., Соколенко В.М., Шинкевич В.І. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Під ред. І.П. Кайдашева. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
2. Биологическая химия. Практикум / Под общ. ред. проф.

3. Я.В. Хмелевского. – К.: Вища шк., 1985. – 207 с.
3. Боброва Н.А., Микитюк М.В., Куценко Л.А., Кайдашев І.П. Влияние фуллерена C_{60} на процессы свободнорадикального окисления липидов при экспериментальной бронхиальной астме // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2012. – № 3. – С. 109–114.
4. Веснина Л.Э., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Куценко Н.Л., Куценко Л.А., Боброва Н.А., Беркало Л.В., Кайдашев І.П. Влияние фуллерена C_{60} на функциональную активность фагоцитарных клеток // Эксперим. и клин. фармакология. – 2011. – 74, № 6. – С. 26–29.
5. Веснина Л.Э., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Боброва Н.А., Куценко Л.А., Ярошенко Г.А., Кайдашев І.П. Фуллерен C_{60} обладает иммуномодулирующей активностью при адьювантном артрите у крыс // Там же. – 2012. – 75, № 8. – С. 15–20.
6. Веснина Л.Е., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Куценко Л.О., Боброва Н.О., Куценко Н.Л., Кайдашев І.П. Стан перекисного окислення ліпідів у мишей лінії Balb/c та вплив фуллерену C_{60} під час імунної відповіді // Фізіол. журн. – 2012. – 58, № 3. – С. 19–26.
7. Коваленко В.М., Хімїон Л.В., Лисенко Г.І., Гармиш О.О. Вплив імунного статусу і ліпідних факторів на прогресування субклінічного атеросклерозу і розвиток серцево-судинних захворювань у пацієнтів із ревматоїдним артритом // Укр. ревматол. журн. – 2011. – 43, № 1. – С. 52–59.
8. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
9. Куценко Н.Л., Микитюк М.В., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. Вплив фуллеренів на розвиток алергічного запалення в експерименті // Проблеми екології та медицини. – 2009. – 13, № 5–6. – С. 7–12.
10. Куценко Л.А., Кайдашев І.П. Место церулоплазмина среди белков острой фазы как маркера системного воспаления // Лаб. диагностика. – 2011. – № 3. – С. 59–68.
11. Матишевська О.П., Прилуцька С.В., Гринюк І.І. Фуллерени C_{60} – біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 3. – С. 18–26.
12. Прилуцька С.В., Кічмаренко Ю.М., Богущька К.І., Прилуцький Ю.І. Фуллерени C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми та перспективи // Там само. – 2012. – 5, № 3. – С. 9–17.
13. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis // J. Musculoskel. Neuron Interact. – 2001. – 1, № 4. – P. 377–385.
14. Bevaart L., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis. How does it relate to rheumatoid arthritis? // Arthritis Rheumatism. – 2010. – 62, № 80. – P. 2192–2205.
15. Card J.W., Zeldin D.C., Bonner J.C., Nestmann E.R. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2008. – 295. – P. L400–L411
16. Chen H.H.C., Yu C., Ueng T.H., Chen S., Chen B.J., Huang

- K.J., Chiang L.Y. Acute and sub-acute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C₆₀ in rats //Toxicol. Pathol. – 1998. – **26**. – P. 143–148.
17. Cutolo M., Sulli A., Pizzorni C., Seriola B., Straub R. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis //Ann. Rheum. Dis. – 2001. – **60**. – P. 729–735.
 18. Dhavan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K., Shan W., Miller S.M., Hashsham S.A., Tarabara V.V. Stable colloidal dispersion of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity //Environ. Sci. Technol. – 2006. – **40**. – P. 7394–7401.
 19. Feketeová L., Jančová P., Moravcová P., Janegová A., Bauerová K., Poništ S., Mihalová D., Janega P., Babál P. Effect of methotrexate on inflammatory cells redistribution in experimental adjuvant arthritis //Rheumatol. Int. – 2011. – **15**. – P. 220–228.
 20. Gao J., Wang H-L., Iyer R. Suppression of proinflammatory cytokines in functionalized fullerene-exposed dermal keratinocytes //J. Nanomaterials. – 2010. – P. 9–15.
 21. Johnston H.J., Hutchison G.R., Christensen F.M et al. Helinor J., Aschberger K., Stone V. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity //Toxicol. Sci. – 2010. – **114**, №2. – P. 162–182.
 22. Markovich Z., Traikovich V. Biomedical potential of reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀) // Biomaterials. – 2008. – № 28. – P. 3561–3573.
 23. Montanez M.I., Ruiz-Sanchez A.J., Perez-Inestrosa E. A perspective of nanotechnology in hypersensitivity reactions including drug allergy //Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – **10**, № 4. – P. 297–302.
 24. Naota M., Shimada A., Morita T., Inoue K., Takano H. Translocation pathway of the intratracheally instilled C₆₀ fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis //Toxicol. Pathol. – 2009. – **37**. – P. 456–462.
 25. Phillipe L., Gegout-Pottie P., Guingamp C. Bordji K., Terlain B., Netter P., Gillet P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats //Amer. J. Physiol. – 1997. – **273**. – P. R1550–R1556.
 26. Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes in vitro // Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostruct. – 2008. – **16**, № 5–6 – P. 698–705.
 27. Rayan J.J., Bateman H.R., Stover A. Gomez G., Norton S.K., Zhao W., Schwartz L.B., Lenk R., Kepley C.L. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response //J. Immunol. – 2007. – **179**. – P. 665–672.
 28. Reddy G.K., Dhar S.C. Studies on carbohydrate moieties of glycoproteins in established adjuvant induced arthritis //Agents Actions. – 1988. – **25**, № 1–2. – P. 63–70.
 29. Rovenský J., Stancíková M., Rovenská E., Stvrtina S., Stvrtinová V., Svík K. Treatment of rat adjuvant arthritis with Flavonoid (Detralex®), Methotrexate, and their combination //Ann. NY Acad. Sciences. – 2009. – **1173**. – P. 798–804.
 30. Tak P.P., Klapwijk M.S. Broersen S.F.M., van de Geest D.A., Overbeek M., Firestein G.S. Apoptosis and p53 expression in rat adjuvant arthritis //Arthritis Res. – 2000. – **2**. – P. 229–235.
 31. van Eden W., Waksman B.H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis //Arthritis Rheumatism. – 2003. – **48**, № 7. – P. 1788–1796.
 32. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene (C₆₀) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis //Int. J. Nanomedicine. – 2009. – **4**. – P. 233–239.
 33. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene (C₆₀) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis //Ibid. – P. 217–225.
 34. Yudoh K., Shishido K., Murayama H., Yano M., Matsubayashi K., Takada H., Nakamura H., Masuko K., Kato T., Nishioka K. Water-soluble C₆₀ fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development //Arthritis Rheum. – 2007. – **56**. – P. 3307–3318.

НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики;

Укр. мед. стомат. академія, Полтава

E-mail: tamontova-tv@rambler.ru

Матеріал надійшов до редакції 15.06.2012

О.Б. Динник, В.Я. Березовський, Н.М. Кобиляк, І.Г. Літовка, Р.В. Янко, Л.М. Плотнікова

Вікові зміни жорсткості тканин печінки щурів за допомогою методу ультразвукової еластографії

Методом ультразвукової еластографії на основі хвиль зсуву (ЕХЗ) досліджено жорсткість тканин печінки (ЖТП) на трьох групах білих щурів різного віку. Вимірювання здійснювали за допомогою УЗ-апарата «Ultima PA» («Радмир», Харків, Україна) лінійним датчиком 10–5 МГц. Для оцінки функціонального стану печінки. Водночас досліджували вікові біохімічні та морфологічні відмінності препаратів органа. Показано, що діагностична доступність методу ЕХЗ сягає 96,6%. Встановлено, що у білих щурів із віком збільшується ЖТП, але її значення в кожній групі не перевищують норми. Обговорюється можливий зв'язок зазначених змін ЖТП зі станом її сполучнотканинних елементів, функціональною активністю, ступенем гідратації тощо. Зроблено висновок, що ультразвукова ЕХЗ може бути новим об'єктивним біофізичним методом отримання інформації про стан ЖТП. Ключові слова: жорсткість печінки щурів, ультразвукова еластографія на основі хвиль зсуву, сполучна тканина, вікові зміни.

ВСТУП

В інструментальних дослідженнях тканини важливу роль відіграє її жорсткість, тобто спроможність структури деформуватися без руйнування або ушкодження. У кардіології найчастіше вимірюють жорсткість стінок аорти або магістральних артерій [18, 20], для чого використовують показники швидкості розповсюдження пульсової хвилі [8].

Для паренхіматозних органів нещодавно розроблено новий спосіб оцінки стану тканин за допомогою ультразвукового дослідження, а саме метод еластографії [2, 4, 16]. Жорсткість тканин печінки (ЖТП) головним чином залежить від співвідношення маси колагенових та еластинових мікрОВОЛОКОН сполучної тканини. Одним із варіантів цього методу є визначення жорсткості на основі хвиль зсуву, зокрема, що може бути показником ступеня розвитку фіброзу та цирозу печінки [5, 13].

До появи ультразвукової еластографії на основі хвиль зсуву (ЕХЗ) не існувало інструментальних засобів для визначення

ЖТП, особливо в експерименті на дрібних лабораторних тваринах [4].

Мета нашого дослідження – визначити вікові зміни ЖТП білих щурів методом ультразвукової ЕХЗ.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 30 щурах обох статей, які були поділені на 3 групи по 10 тварин у кожній. До I групи увійшли щури віком 3 міс, до II – 12 міс, до III – 20 міс. Тварини отримували стандартний корм і дехлоровану водопровідну воду. За добу до початку експерименту щурів позбавляли їжі, але вони мали вільний доступ до води.

Перед гострим дослідом тварин наркотизували уретаном внутрішньоочеревиною в дозі 1 г/кг маси тіла. У кожній тварини здійснювали 4 серії вимірів ЖТП на УЗ-апараті «Ultima PA» («Радмир», Харків, Україна) лінійним датчиком 10–5 МГц у правій і лівій частках печінки щурів. Датчик був ізольований спеціальним акустично прозорим покриттям.

© О.Б. Динник, В.Я. Березовський, Н.М. Кобиляк, І.Г. Літовка, Р.В. Янко, Л.М.Плотнікова

Першу серію проводили транскутанно зі збереженим кровообігом *in vivo*. Після лапаротомії здійснювали другу серію вимірів контактно зі збереженим кровообігом. Для чого УЗ-датчик розташовували безпосередньо на поверхні печінки, з мінімальною компресією тканини органа для забезпечення щільного контакту. Третю серію здійснювали контактно, але після декапітації та повної зупинки кровопостачання, яке контролювали методом ультразвукової доплерографії черевного відділу аорти, ворітної вени та власної артерії печінки. Четверту серію проводили *in vitro* після вилучення печінки з тіла та розміщення її в спеціальному акустичному фантомі. Цей пристрій для дослідження печінки щурів *in vitro* являє собою ванну, що заповнена імерсійною рідиною – фізіологічним розчином. Ванна має дно, що вкрите шаром матеріалу, який забезпечує відсутність відлуння УЗ-хвиль. Розмір ванни фантома 5×5 см, висота – 15 см. Зріз тканин печінки щура на спеціальній акустично прозорій площадці занурювали в імерсійну рідину на глибину 5 см від поверхні, що запобігало компресії.

У кожній серії кількість успішних вимірювань повинна була становити не менше 10 (2 ряди по 5 вимірювань). Після чого визначали медіану, яка характеризувала ЖТП в кілопаскалях, розраховували показник інтерквартильного розмаху (IQR), що характеризує однорідність одержуваних даних і є інтервалом з центром в точці медіани, в який вкладаються результати 50 % вимірів (від 25 до 75 квартильного значення). При цьому однорідним результат вимірювання вважався в тому разі, якщо співвідношення IQR/медіана становило менше ніж 30 %.

Для аналізу внутрішньодослідницької узгодженості порівнювали результатів першого та другого ряду з 5 вимірювань, отриманих в однакових умовах, із розрахунком коефіцієнта внутрішньокласової кореляції (КВК). Значення КВК можуть варіювати від «-1» (повна неузгодженість) до «+1» (повна узгодженість результатів). Узгодженість

розцінювали як слабку при значеннях від 0 до 0,2; як задовільну – від 0,21 до 0,4; як хорошу – в діапазоні значень від 0,4 до 0,75; як відмінну – при значеннях КВК від 0,76 до 1,0 [17].

Кров для біохімічного дослідження забирали у тварин після декапітації. Для морфологічного та морфометричного аналізу відбирали зразки тканини з правої та лівої частки печінки розміром 5×5 мм. Для оцінки вихідного функціонального стану печінки вимірювали концентрацію сироваткових ферментів: аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), загального, непрямого та прямого білірубину, визначали співвідношення АСТ/АЛТ. Вміст АЛТ та АСТ у сироватці крові визначали уніфікованим методом Райтмана–Френкеля відповідно до рекомендацій виробника («ERBA Lachema», Чехія). Для дослідження пігментного обміну використовували метод Йендрашика, Клеггорна і Гроффа, який дає можливість фракційного визначення вмісту білірубину.

Екстракцію ліпідів із зразків тканини печінки проводили за методом Фолча [6]. Після чого вимірювали концентрацію тригліцеридів із загального пулу ліпідів за допомогою реактивів фірми «ERBA Lachema» (Чехія).

Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою. Препарати фарбували гематоксиліном Бемера і еозином та 2%-м кислим пікрофуксином у поєднанні з залізним гематоксиліном Вейгерта (модифікований метод забарвлення сполучної тканини за Ван-Гізеном) [7]. З використанням цифрової фотокамери мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Olympus» (Японія). На цифрових зображеннях мікропрепаратів здійснювали морфометрію за допомогою комп'ютерної програми «IMAGE J». На зрізах печінки підраховували кількість гепатоцитів (у полі зору мікроскопа), ядерець (на 100 ядер), визначали площу гепатоцитів, їх ядер і цитоплазми, вимірювали відстань між суміжними ядрами клітин. Кількість гепатоцитів

підраховували в 10 полях зору мікроскопа, а вимірювання площі здійснювали для кожної клітини з підрахунком середнього значення відносно 100 клітин. Морфометричні виміри гепатоцитів проводили при збільшенні мікроскопа у 400 разів.

Діагностичну доступність методу ЕХЗ визначали на основі відношення числа тварин, у яких вдалося провести дослідження з виконанням 10 вимірювань із значенням співвідношення IQR/медіана $\leq 30\%$ до загальної кількості тварин.

Статистичний аналіз виконували за допомогою стандартного пакета програм SPSS версії 20.0 та Microsoft Excel. Кількісні зміни наведено у вигляді середнього значення та стандартного відхилення середнього значення ($M \pm SD$). ЖТП представлено графічно за допомогою коробчастої діаграми. Верхньому та нижньому рівню діаграми відповідають 25-й та 75-й квартилі, а лінія, що проходить через середину квадрата – значенню медіани (Me). Для оцінки відмінності двох кількісних змінних використовували критерій t Стьюдента для незалежних вибірок, для 3 та більше однофакторний дисперсійний аналіз (One-Way ANOVA) та його непараметричний аналог – Н-тест Крускала–Уолліса. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені експерименти показали, що діагностична доступність методу ЕХЗ у лабораторних щурів становить 96,6 %, тобто задовольняє існуючі вимоги. При аналізі відтворюваності методу ЕХЗ нами констатовано відмінну внутрішньодослідницьку узгодженість результатів, оскільки КВК становив 0,889 (95%-й довірчий інтервал (ДІ) 0,778-0,946).

Аналіз результатів проведених вимірювань показав, що медіана, 25-й та 75-й квартилі величин ЖТП у різних вікових групах були такими: у I групі – 4,3 [4,0–5,0] кПа, в

II – 4,8 [4,4–5,6] кПа та в III – 5,3 [4,9–5,7] кПа (рис.1). При використанні критерію t Стьюдента виявлена статистично вірогідна різниця для значення ЖТП між I та III групою тварин ($P=0,010$).

Отже, у білих щурів з віком збільшується ЖТП, але її значення в кожній групі не перевищують норми. Односпрямовану направленість цих величин можна розглядати як вікові зміни стану тканин печінки, особливо її сполучнотканинних елементів, маса яких значно перевищує масу паренхіматозних елементів. Іншою можливою причиною збільшення ЖТП може бути накопичення в паренхімі органа з віком загальних ліпідів або певних їх підкласів.

Такий біофізичний показник як жорсткість або еластичні властивості тканин печінки в нормі та патології зумовлений багатьма чинниками. ЖТП за даними авторів методу ЕХЗ та наших власних досліджень її варто розглядати як інтегральний показник, який змінюється при розвитку хронічних дифузних захворювань печінки [1, 2, 14, 15]. На ЖТП можуть впливати також ступінь гідратації тканини, внутрішньосудинний тиск крові, співвідношення насичених і поліненасичених ліпідів у тканині.

Порівняння результатів дослідження у різних серіях показує, що ЖТП залежать від

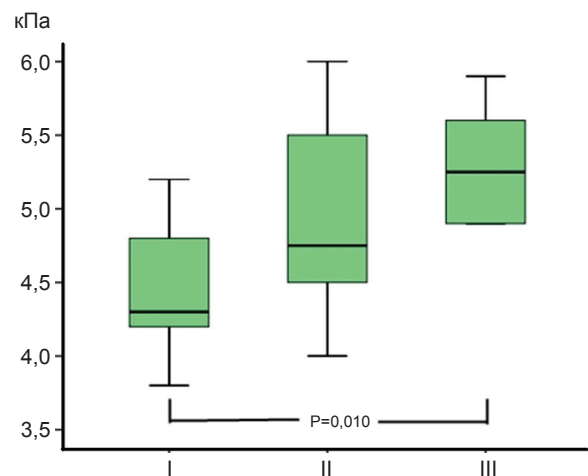


Рис. 1. Жорсткість тканин печінки в лабораторних тварин різного віку

контакту УЗ-датчика з печінкою та наявності або відсутності кровообігу. Медіана, 25-й та 75-й квартиль для ЖТП: *in vivo* транскутанно (серія №1) – 4,9 [4,35 – 5,5] кПа; *in vivo* контактено зі збереженим кровообігом (серія №2) – 5,6 [5,0–6,0] кПа; *in vivo* контактено без кровообігу (серія №3) – 5,8 [5,5–6,3] кПа; *in vitro* безконтактено (серія №4) – 5,0 [4,4–5,6] кПа. Встановлено статистично вірогідну різницю між результатами, одержаними в умовах вимірювання ЖТП контактено, незалежно від наявності кровообігу порівняно із вимірами транскутанно *in vivo* та *in vitro* (рис.2). Статистично вірогідної різниці між контактними вимірами ЖТП залежно від наявності кровообігу не виявлено ($P=0,292$).

Встановлена статистично достовірна відмінність в ЖТП між серіями вимірів може бути пов'язана зі впливом компресії УЗ-датчика на печінку, що призвело до артефактного зростання показників жорсткості тканини. Для фізіологічної інтерпретації одержаних результатів проведено додаткові дослідження з використанням класичних біохімічних і морфометричних методів. Функціональний стан тканин печінки оцінювали за активністю відповідних біохімічних показників. Насамперед це АСТ. За нашими результатами, активність АСТ була найбільш високою у I групі щурів і становила $0,393 \pm 0,039$ мккат/л (табл.1). З віком активність трансамінази статистично достовірно знижувалася. У II групі на 27,5 % ($P<0,001$), а у III на 36,1 %

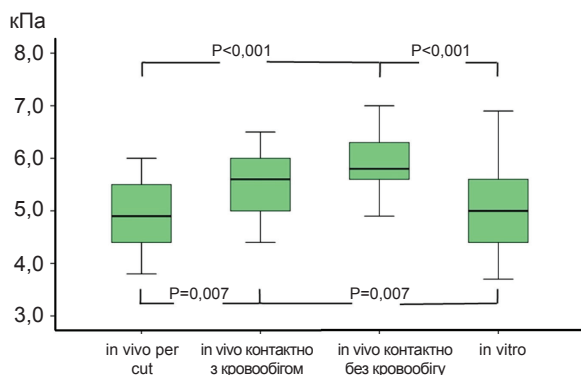


Рис. 2. Жорсткість тканин печінки залежно від способу її вимірювання

($P<0,001$) відповідно порівняно з тваринами I групи. Зниження цього показника у щурів II групи по відношенню до III було статистично недостовірним ($P=0,075$).

Для виявлення хронічних уражень печінки особливу увагу потрібно звертати на співвідношення АСТ/АЛТ, відоме як коефіцієнт де Рітиса. Його зростання може свідчити про фіброз печінки або токсичне (медикаментозного або алкогольного генезу) ураження печінки.

Активність АЛТ у щурів не змінювалася з віком ($P=0,094$). Найбільш виражена різниця між АСТ і АЛТ була у щурів I групи, а коефіцієнт де Рітиса склав 1,63. З віком цей коефіцієнт знижувався і становив у II віковій групі – 1,4 та у III – 1,2 відповідно.

Вважають, що підвищення вмісту білірубину в крові (гіпербілірубінемія) за рахунок прямої фракції (більше ніж 80 % загального білірубину припадає на прямий білірубін) має печінкове походження. Така ситуація характерна для хронічного вірусного гепатиту. Це також може бути пов'язано з порушенням виведення прямого білірубину внаслідок цитолізу гепатоцитів. Зростання концентрації за рахунок вільного білірубину в крові може говорити про холестази чи об'ємні ураження паренхіми печінки.

За нашими результатами концентрація загального ($P=0,599$), а також прямого ($P=0,141$) і непрямого білірубину ($P=0,166$) з віком у досліджуваних щурів статистично достовірно не змінювалася.

Концентрація загальних ліпідів у печінці щурів зростала з віком. Якщо у II групі тварин спостерігали лише тенденцію до її підвищення ($P=0,344$), то у III вона вірогідно збільшувалася на 20,5 % ($P=0,047$). Вміст тригліцеридів у печінці, навпаки, з віком вірогідно знижувалася у II віковій групі на 15,7 % ($P=0,003$), а у III на 27,3 % ($P<0,001$) порівняно з I групою. Знижувалася з віком у щурів і кількість тригліцеридів у загальному пулі ліпідів. Так, для I групи тварин вона була 38,1 %, а для II та III 28,4 і 23,0 % відповідно.

Таблиця 1. Показники функціонального стану печінки та кількість ліпідів в паренхімі печінки у лабораторних тварин різного віку (n=10).

Показник	Щури		
	3- місячні	12-місячні	20-місячні
Аланінамінотрансфераза, мккат/л	0,240±0,042	0,207±0,035	0,209±0,022
Аспартатамінотрансфераза, мккат/л	0,393±0,039	0,285±0,037*	0,251±0,036*
Загальні ліпіди, мг/г тканини печінки	16,92±2,49	19,11±3,68	20,39±2,34*
Тригліцериди, мг/г тканини печінки	6,44±0,45	5,43±0,74*	4,67±0,45*,**
Загальний білірубін, мкмоль/л	12,6±2,36	12,7±2,31	13,6±2,54
Непрямий білірубін, мкмоль/л	7,9±1,96	9,1±2,33	9,7±1,94
Прямий білірубін, мкмоль/л	4,7±0,82	3,6±1,64	3,9±1,1

*P<0,05 – вірогідність порівняно з 3-місячними щурами,

**P<0,05 – з 12-місячними щурами.

При аналізі гістологічних препаратів тканин печінки, залежно від вікової групи щурів, виявлено певну розбіжність в отриманих морфометричних показниках (табл. 2). Так, з віком спостерігали тенденцію до зменшення середньої площі поперечного перерізу гепатоцитів, їхніх ядер та цитоплазми. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у II та III групі щурів було меншим ніж у I на 13 %, що може свідчити про послаблення функ-

ціональної активності клітини, пригнічення її синтетичних процесів.

Зі збільшенням віку у щурів виявлено зниження кількості ядерців в ядрах гепатоцитів. Так, у II та III групах тварин кількість ядерців була вірогідно меншою від цього показника у I на 10 та 13 % відповідно (P<0,05). У III групі щурів спостерігали тенденцію до зменшення і ядерцево-ядерного співвідношення на 8 % порівняно з іншими

Таблиця 2. Морфометричні показники печінки щурів різного віку (n=10)

Показники	Щури		
	3-місячні	12-місячні	20-місячні
Площа, мкм ²			
Гепатоцита	354±17,8	343±8,9	341±12,3
ядра	48±2,4	43±1,0	42±1,7
цитоплазми	306±17,2	300±1,0	299±21
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,16±0,01	0,14±0,01	0,14±0,005
Кількість ядерців	173±2,8	155±3,8*	150±2,5*
Ядерцево-ядерне співвідношення	0,036	0,036	0,033
Відстань між суміжними ядрами, мкм	11,2±0,37	12,5±0,50	12±0,55
Кількість гепатоцитів			
Загальна	133±2,8	125±4,3	109±5*,**
однойдерних	130±2,9	120±4,7	107±5*
двойдерних	3±0,5	4±0,8*,***	2±0,3*,**

*P<0,05 – вірогідність порівняно з 3-місячними щурами,

**P<0,05 – з 12-місячними щурами,

***P<0,05 – з 20-місячними щурами.

досліджуваними групами.

Зниження кількості ядерець та ядерцево-ядерного співвідношення може вказувати на зменшення білоксинтетичної активності гепатоцитів [11].

Кількість гепатоцитів у полі зору мікроскопа з віком знижувалася (особливо це чітко видно у III групі тварин). Кількість двоядерних гепатоцитів в середньому становила: у I групі щурів – $3 \pm 0,5$, у II – $4 \pm 0,8$ та у III – $2 \pm 0,3$ відповідно ($P < 0,05$). Їх біологічний сенс довгий час залишався невідомим. У літературі наявні відомості про збільшення числа двоядерних гепатоцитів у результаті старіння клітини, незакінченого мітозу чи амітозу. Деякі дослідники вважають, що утворення двоядерних гепатоцитів з одноядерних є резервом поліплоїдизації [9]. Проте більшість авторів схиляються до думки, що збільшення кількості двоядерних гепатоцитів свідчить про посилення інтенсивності регенерації паренхіми печінки на внутрішньоклітинному рівні [21]. Відмічено тенденцію до збільшення відстані між ядрами суміжних гепатоцитів у II та III групі щурів, що може бути пов'язане зі зменшенням розмірів ядра клітин та вказує на менш щільне розташування клітин між собою (можливо внаслідок збільшення кількості міжклітинної сполучної тканини) [13].

Наші результати свідчать про підвищення концентрації загальних ліпідів у печінці щурів із віком. Активність АСТ і вміст тригліцеридів у печінці, навпаки, з віком вірогідно знижувалися. Це можна розглядати як певне пригнічення функціональних властивостей паренхіми печінки з віком. Водночас показано певне зменшення площі ядра, кількості ядерець і двоядерних гепатоцитів, ядерно-цитоплазматичного та ядерцево-ядерного співвідношень. Ці зміни узгоджуються з літературними даними про вікову дегідратацію тканин печінки [10, 19].

Відомо також, що з віком відбувається зміна взаємин колагенових і еластинових компонентів міжклітинної грубої волокнис-

тої сполучної тканини з домінуванням перших [3]. Встановлено, що у молодих і тварин старшого віку змінюється співвідношення базальна міжклітинна речовина (матрикс) / волокниста речовина. Зменшення цього показника відбувається як внаслідок підвищення концентрації колагену, так і внаслідок зниження концентрації компонентів матриксу. Встановлено, що при старінні організму зменшується молекулярна розчинність колагенів та еластинів, збільшується кількість поперекових зв'язків у білках матриксу, зменшується вміст протеогліканів і глікозаміногліканів [12]. Все це істотно змінює еластичні властивості тканин, що наочно ілюструється різницею в стані шкіри дитини та осіб похилого віку. Всі ці процеси об'єднуються під терміном «вікова дегенерація». Припускаємо, що ультразвукова технологія визначення жорсткості на ЕХЗ може стати новим діагностичним підходом для оцінки вікової дегенерації тканин, визначення біологічного віку певної тканини або розвитку в ній патологічних процесів.

ВИСНОВКИ

Ультразвукова ЕХЗ є новим об'єктивним біофізичним методом отримання інформації про стан ЖТП лабораторних щурів у різних вікових групах і варіює від 4,0 до 5,7 кПа.

За даними ультразвукової ЕХЗ у білих щурів із віком відбувається зростання ЖТП, проте її значення не перевищує норми. Ми виявили статистично вірогідну різницю між 3- та 20-місячними тваринами ($P = 0,010$).

Збільшення концентрації загальних ліпідів, зниження активності АСТ та вмісту тригліцеридів, площі ядра гепатоцитів, кількості ядерець і двоядерних гепатоцитів, ядерно-цитоплазматичного та ядерцево-ядерного співвідношень, зростання відстані між ядрами суміжних гепатоцитів ми схильні розглядати як вікове пригнічення функціональних властивостей паренхіми печінки у здорових щурів.

**О.Б. Динник, В.А. Березовский, Н.Н. Кобыляк,
И.Г. Литовка, Р.В. Янко, Л.М.Плотникова**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕ- НИЙ ЖЕСТКОСТИ ТКАНЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ЭЛАСТОГРАФИИ

Методом ультразвуковой эластографии на основе сдвиговых волн (ЭСВ) исследованы показатели жесткости тканей печени (ЖТП) на трех группах белых крыс разного возраста. Измерение показателей ЭСВ осуществляли с помощью аппарата «Ultima PA» («Радмир», Харьков, Украина) линейным датчиком 10–5 МГц. Для оценки функционального состояния печени одновременно исследовали возрастные биохимические и морфологические различия препаратов органа. Показано, что диагностическая доступность метода ЭСВ достигает 96,6 %. Установлено, что у белых крыс с возрастом происходит рост ЖТП, но ее значение в каждой возрастной группе не превышает нормы. Обсуждается возможная связь возрастных изменений ЖТП с состоянием ее соединительнотканых элементов, показателями функциональной активности, степени гидратации т.д. Сделан вывод, что ультразвуковая ЭСВ может быть новым объективным биофизическим методом получения информации о состоянии ЖТП.

Ключевые слова: жесткость печени крыс, ультразвуковая эластография на основе сдвиговых волн, соединительная ткань, возрастные изменения, фиброз печени.

**O.B. Dynnyk, V.A. Berezovsky, N.M. Kobyljak,
I.G. Litovka, R.V. Yanko¹, L.N. Plotnikova**

DETERMINATION OF AGE-RELATED LIVER STIFFNESS CHANGES IN RATS ACCORDING TO THE ULTRASONIC SHEAR WAVE ELASTOGRAPHY

We examined by ultrasound shear wave elastography (SWE) changes of liver stiffness (LS) in three groups rats of different ages. LS measurement by SWE was performed on «Ultima PA» equipment (“Radmir”, Kharkov, Ukraine) with a 10–5 MHz linear transducer. To assess the functional state of the liver at the same time we studied age-related biochemical and morphological differences in the liver. A valid LS determination (success rate of at least 60%) was observed in 96,6% animals of different age groups. We observed statistically significant increasing of LS between 3-month and 20-month rats ($p=0.010$), but its value in each group do not exceed normal or reference range. In article discussed possible connection between age-related changes of LS and state of connective tissue elements, functional activity, hydration, etc. It is concluded that shear wave elastography may be a new objective biophysical method for obtaining information about the state of the liver stiffness of the liver tissue.

Key words: liver stiffness in rats, ultrasonic shear wave elas-

tography, connective tissue, age-related changes, liver fibrosis.

*Institute of physiology of the Ukrainian National Academy
of Sciences of Bogomolets;*

National Bogomolets Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабак О.Я., Колесникова Е.В. Цирроз печени и его осложнения. - К.: Здоровье Украины, 2011. – 576 с.
2. Баранник Е.А., Динник О.Б., Линская А.В., Марусенко А.И. Ультразвуковая эластография: вчера, сегодня, завтра // Пром. діагностика, пром. терапія. – 2012. – №1. – С.72–77.
3. Высоцкий Ю.А., Лепилов А.В. Деханд Е.П. Возрастные особенности организации соединительнотканного остова некоторых органов человека // Актуальные проблемы морфологии. – Красноярск, 2005. – С.46.
4. Зыкин Б.И., Постнова Н.А., Медведев В.Е. Эластография: анатомия метода // Пром. діагностика, пром. терапія. – 2012. – №2–3. – С.107–113.
5. Ивашкин В.Т., Павлов Ч.С. Фиброз печени. – М.: ГЭОТАР-Мед., 2011. – 168 с.
6. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
7. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
8. Оценка артериальной жесткости / Под ред. А.В. Линской, О.Б. Динника. – К.: Укр. доплер. клуб, 2012. – 80с.
9. Романова Л.П., Малышев И.И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс // Вестн. Чуваш. ун-та. – 2011. – №3. – С.398–402.
10. Руководство по геронтологии и гериатрии / Под ред. В.Н. Ярыгина, А.А. Мелентьева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003 - Т.4. Клиническая гериатрия. – 520 с.
11. Саркисов Д.С., Втюрин Б.В. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов – М.: Медицина, 1967. – 224 с.
12. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). – М.: Медицина, 1981. – 312 с.
13. Солопаев Б.П. О коррелятивных взаимоотношениях между интенсивностью регенерации паренхиматозных элементов и состоянием соединительной ткани. – Сб. тр. по исследованию обратимости острых и хронических изменений органов. – М., 1962. – С. 172–180.
14. Шифф Ю.Р., Соррел М.Ф., Мэддрей У.С. Болезни печени по Шиффу. Цирроз печени. – М.: ГЭОТАР-Мед., 2011. – 542 с.
15. Эластография в клинической гепатологии (под ред. А.В. Барсукова). – Смоленск: Смолен. город. типография, 2011. – 276 с.
16. Derippe M., Delmas Y., Genisson J., Deminire C., Plasier S., Tanter M. Detection of intrarenal microstructural

- changes with supersonic shear wave elastography in rats// Eur Radiol. – 2012. – **22**, №1. – P.243–250.
17. Fleiss J.L. The design and analysis of clinical experiments. – New York: John Wiley and Sons, 1986. – P.7.
18. Laurent S., Cockcroft J., Van Bortel L. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications // Eur. Heart J. – 2006. – **27**, №5. – P.2588–2605.
19. Mueller S., Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease.// Hepatic Med.: Evid. and Res. – 2010. – №2. – P.49–67.
20. Pannier B., Avolio A.P., Hoeks A. Methods and devices for measuring arterial compliance in humans // Amer. J. Hypertens. – 2002. – **15**, №2. – P.743–753.
21. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration // Nephrol. Dial. Transplant. – 2004. – 19. – P.6–10.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України;
Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця, Київ
E-mail: NazariiKobyliak@gmail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 18.12.2012*

С.Ю. Ціпоренко

Вплив гепатомаксу на фертильність чоловіків

Вивчено особливості морфотипу сперматозоїдів у чоловіків з безпліддям та виявлено певну мономодальність у його відхиленнях. Проведено дослідження продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та ензимів антиоксидантного захисту (АОЗ) крові у чоловіків з малосимптомними формами хронічного запалення уrogenітального тракту, ускладненого безпліддям. Встановлено, що у більшості обстежених чоловіків відмічено активацію пероксидації ліпідів біомембран, що супроводжувалося підвищенням концентрації основних метаболітів ПОЛ – проміжного (дісновий кон'югат) і кінцевого (малоновий діальдегід) у сироватці крові. При вивченні стану системи АОЗ було виявлено, що активність каталази та супероксиддисмутази знижувалися. Інтегративний індекс Φ , який характеризує співвідношення про- та антиоксидантних властивостей крові зменшувався. Це свідчить про дисбаланс показників ПОЛ/АОЗ. Встановлено негативний кореляційний зв'язок між індексом Φ та наявністю мікросоматичних форм сперматозоїдів. Показано позитивний вплив гепатомаксу на процеси відновлення активності оксидативних систем, нормалізації інтегрального показника Φ та зниження кількості патологічних форм генеративних клітин. Враховуючи його антиоксидантні, імуномодулювальні, гепатопротекторні властивості, ми вважаємо за доцільне включати цей препарат у комплексне лікування інфертильних чоловіків із запальними процесами в уrogenітальному тракті.

Ключові слова: чоловіче безпліддя, сперма, сперматозоїди, варіанти морфотипу, продукти перекисного окиснення ліпідів, ензими антиоксидантного захисту, лікування, гепатомакс.

ВСТУП

З'явилось багато повідомлень про зниження кількісних та якісних характеристик сперми та збільшення випадків патології чоловічої статеві сфери наприкінці ХХ – початку ХХІ сторіч [1, 9]. Відсоток позитивних результатів у лікуванні чоловічого безпліддя стабілізувався на рівні 16–32 % [14]. Така низька ефективність є наслідком того, що до теперішнього часу недостатньо вивчено причини чоловічої ін- та субфертильності. Для розробки правильної тактики та оптимальних схем лікування необхідна верифікація різноманітних факторів чоловічого безпліддя. Від точності встановлення його причини залежить подальше вивчення патогенезу порушення репродуктивної функції, що буде сприяти розробці ефективних методів терапії.

Поряд з причинами, котрі порушують репродуктивну здатність – і є складовою

© С.Ю. Ціпоренко

екскреторного безпліддя, існують причини секреторного безпліддя, серед яких запальні захворювання репродуктивної системи, викликані уrogenітальними інфекціями, і становлять від 8,5 до 38,4 % [14, 20].

Морфологічні зміни у гонадах, що виникають внаслідок запальних процесів призводять й до функціональних змін. Останні характеризуються порушеннями багатоступінчастої системи утворення гамет та їх життєзабезпечення, яка включає механізм поділу клітин сім'яного епітелію, їх диференціювання, матурації, селекції, антиімунного, осмотичного та антиоксидантного захисту (АОЗ) сперматозоїдів.

Якщо клас патологічних варіантів порушення репродуктивної функції у чоловіків має диференційне лікувально-діагностичне забезпечення у рамках секреторно-екскреторної концепції їх класифікації, то клас функціональних варіантів не знайшов сво-

го застосування в практичній медицині, у зв'язку з відсутністю діагностичних маркерів для їх виділення. Вони трактуються як "ідіопатичні" і при цьому застосовується емпіричне лікування. Коректно виконані дослідження інституту епідеміології Лідського університету, показали, що останнє зазвичай, призводить до погіршення запліднювальної здатності еякуляту.

Вивчення особливостей морфотипу сперматозоїдів у чоловіків з безпліддям виявляє певну мономодальність в його відхиленнях. Це дає змогу зробити припущення про те, що зміни нейрогормонального контролю різного рівня розвитку гамет залишає свій "відбиток" на їх морфотипі залежно від періоду сперматоутворення.

Запальні захворювання репродуктивної системи, які викликані уrogenітальними інфекціями супроводжуються активацією білих кров'яних клітин сперми, які вивільнюють протеолітичні ензими, цитокіни та реактивні кисневі сполуки (РКС) [19]. Негативна асоціація між надмірною продукцією РКС і чоловічою фертильністю продемонстрована в деяких дослідженнях [10, 12, 13, 15, 18]. Запальний процес спричиняє в основному акумуляцію та активацію лейкоцитів, переважно фагоцитів. Супутній з початком фагоцитозу метаболізм кисню в лейкоцитах прискорюється, що призводить до продукції та вивільненню великої кількості супероксид-аніонів (O_2^-) та пероксиду водню (H_2O_2) [11]. Водночас активуються відповідні рецептори та шляхи сигнальної трансдукції, що супроводжується виходом таких біологічно активних речовин, як прозапальні цитокіни, котрі є наступними медіаторами у відповіді господаря на інфекцію, а вони, в свою чергу, модулюють активацію про- та антиоксидантної систем [16, 17]. У хворих чоловіків з наявністю хронічних інфекційних процесів в уrogenітальному тракті відмічається закономірне збільшення концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ): проміжний – дієновий кон'югат (ДК)

і кінцевий – малоновий діальдегід (МДА) у сироватці крові [6], що ймовірно спричинено також додатковим надходженням лейкоцитів у вогнище запалення, які беруть участь у цій реакції та можуть порушувати баланс в організмі про- та антиоксидантних факторів.

Інтраклітинний контроль за вмістом вільних радикалів забезпечує ферментативна система інактивації активних форм кисню (супероксиддисмутаза (СОД; 1.15.1.1) та каталаза (КТ; 1.11.1.6). Однак до теперішнього часу недостатньо вивчена роль змін показників ПОЛ та активність ферментів системи АОЗ у хворих з малосимптомними формами хронічного запалення уrogenітального тракту (ХЗУТ) у інфертильних чоловіків.

Останнім часом продовжується пошук ефективних препаратів у терапії та медичній реабілітації хворих з хронічною уrogenітальною патологією [8]. Нашу увагу привернув сучасний імуноактивний препарат гепатомакс («Будьте здорові», Україна) у лікуванні пацієнтів з безсимптомними формами хронічної уrogenітальної інфекції, ускладненої безпліддям.

Гепатомакс – комплексний препарат, антиоксидантні та гепатопротекторні властивості якого забезпечуються компонентами: збагаченими фосфоліпідами (лецитин сої), біологічно активною речовиною силімарин (екстракт насіння розторопші плямистої) і екстрактами рослинного походження (екстракт артишоку, цмину і куркуми). Здатність лецитину переривати процес ПОЛ дає змогу блокувати руйнування клітинних структур і витік фосфоліпідів з клітини. Екстракт насіння розторопші плямистої, містить у своєму складі флавоноїд силімарин, який має здатність зменшувати прояви запалень на клітинному рівні, знижуючи синтез цитокінів. Крім того, силімарин має властивість зв'язувати вільні радикали і допомагати виведенню їх з організму. Він позитивно впливає на репаративні процеси в клітинах печінки та інших органів. Екстракт листя артишоку має жовчогінні властивості за рахунок наявності в ньому флавоноїдів ци-

нарину і кофеїлхіннових кислот, а його діуретична дія допомагає виводити з організму екзогенні та токсичні продукти метаболізму. Екстракту коріння куркуми (жовтого імбиру) властиві імуномодулювальні, протизапальні, антиоксидантні властивості, він посилює діяльність органів кровотворення. Екстракт квітів цмину піскового стимулює вироблення жовчі, внаслідок цього нормалізується відтік жовчі. Унікальність препарату гепатомакс полягає не тільки в позитивному сумарному впливі його компонентів на організм, але і їх раціонально скомпонованою пропорцією.

Мета нашого дослідження – вивчити варіанти морфотипу сперматозоїдів у сім'яній плазмі, оцінити стан про- та антиоксидантного захисту у сироватці крові інфертильних чоловіків із малосимптомними формами ХЗУТ та вивчити вплив застосування гепатомаксу на продукти ПОЛ і АОЗ.

МЕТОДИКА

Під нашим наглядом знаходилося 92 хворих віком від 24 до 40 років з малосимптомними формами ХЗУТ, ускладненого безпліддям, яке тривало 3–6 років. На початок обстеження пройшло понад рік після завершення попереднього лікування.

Критерієм відбору пацієнтів у дослідження була відсутність запальної лейкоцитарної реакції та патологічної мікрофлори в сечовидільному каналі, секреті передміхурової залози, в секреті сім'яників і в спермі. Всіх обстежених було розподілено на дві групи: перша (48 осіб) – отримувала в комплексному лікуванні додатково гепатомакс по 1 капсулі тричі на день упродовж місяця і друга (44 особи) – загальноприйняте лікування.

Метод полімеразно-ланцювгової реакції (ПЛР) використовували для виявлення у сім'яній плазмі *Chlamidia trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *V. herpes*.

Аналіз сперми проводили через півгодини після еякуляції та згідно з інструкції ВООЗ [20]. Враховували концентрацію спермато-

зоїдів, рН сім'яної рідини, число лейкоцитів та їх популяцій (гранулоцити, макрофаги, лімфоцити). Для визначення морфології використовували фарбування за Папаніколау. На основі мікрометрії виділяли такі варіанти морфотипу сперматозоїдів [3]: макросоматичний, мікросоматичний, гіпоакросомний, гіперголівчатий, круглоголівчатий.

У всіх хворих додатково спектрофотометрично вивчали біохімічні показники, які характеризували активність ПОЛ, а саме вміст ДК та МДА [2]. Досліджували також перекисну резистентність еритроцитів за показником їхнього перекисного гемолізу (ПГЕ) [6]. Для аналізу стану АОЗ була вивчена активність її ферментів – КТ [4] і СОД [7] спектрофотометрично. Обчислювали інтегративний індекс Ф за формулою $(СОД \cdot КТ) / МДА$, який характеризує співвідношення про- та антиоксидантних властивостей крові [7].

Статистичний аналіз проводили на персональному комп'ютері за допомогою пакета програми «MedStat» [5]. Для перевірки показників на нормальний розподіл використовували критерій W Шапіро-Уїлка, а для порівняння показників – критерій χ^2 , двобічна критична ділянка. Середні значення ознаки для двох незалежних вибірок порівнювали за методом кутового перетворення Фішера з врахуванням поправки Йейтса. Достовірно вважали різницю при $P < 0,01$. Для аналізу наявності та сили зв'язку розраховували коефіцієнт парної кореляції Кендала – τ .

Проводили кількісну оцінку ефекту імунокорекції – обчислювали зниження абсолютного ризику, зниження відносного ризику та кількість хворих, яких потрібно пролікувати.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час мікрометрії встановлено наступні варіанти морфотипу сперматозоїдів. Нормосоматичний варіант спостерігався лише у 19 випадках (20,6 %). Решту випадків склали патологічні форми сперміїв. Серед них гіперголівчаті – у 19 випадках (20,6 %), мікросо-

матичні – 38 (41,4 %), макросоматичні – 10 (10,9 %), гіпоакросомні – 6 (6,5 %). Отже, у інфертильних пацієнтів, незважаючи на нормальну кількість і рухливість сперматозоїдів, залишаються морфофункціональні зміни, які, очевидно, й визначають запліднювальний потенціал. Особливості морфотипу сперматозоїдів зумовлені дисфункцією різних рівнів їх утворення та дозрівання.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у більшості обстежених чоловіків з малосимптомними формами ХЗУТ, ускладненого безпліддям, відмічена активація пероксидації ліпідів біомембран, що супроводжувалося підвищенням концентрації ДК і МДА у сироватці крові. Кратність збільшення ДК коливалася від 1,26 до 1,46 раза ($P < 0,05$). Концентрація МДА була вірогідно вищою від норми в 2,33 раза ($P < 0,01$), становила в середньому $8,4 \pm 0,6$ щодо $3,6 \pm 0,2$ мкмоль/мл.

Для вивчення впливу ПОЛ на стан еритроцитарних біомембран нами проаналізовано вираженість ступеня перекисної резистентності еритроцитів (ПРЕ) за значенням ПГЕ. У обстежуваних хворих останній перевищував норму в 2,23 раза ($6,9 \pm 0,4$ %; $P < 0,01$).

Таким чином, у чоловіків хворих на малосимптомні форми ХЗУТ відмічається зростання вмісту метаболітів ПОЛ, а саме ДК і МДА, що вказує на активацію ПОЛ.

При вивченні стану системи АОЗ було

виявлено, що активність КТ знижувалася до 276 ± 9 мкат/г, що було в 1,3 раза нижче від норми (356 ± 9 мкат/г; $P < 0,05$). Активність СОД була переважно зниженою: $19,6 \pm 0,7$ ум.од./г при нормі $28,2 \pm 0,8$ ум.од./г, тобто кратність різниці була 1,44 раза ($P < 0,01$).

Слід відмітити, що незважаючи на різний ступінь змін активності ферментів системи АОЗ, в обстежених з малосимптомними формами ХЗУТ інтегральний показник Ф мав чітко виражену тенденцію до зниження (при нормі 3217 ± 15 ; $P < 0,01$) в 5 разів ($P < 0,001$), що свідчить про дисбаланс показників ПОЛ/АОЗ.

Під час дослідження кореляційних взаємозв'язків було встановлено наявність негативного зв'язку між індексом Ф і мікросоматичним морфотипом спермограм, коефіцієнт кореляції Кендала, $\tau = -0,51$ (коефіцієнт кореляції відмінний від 0 на рівні $P < 0,01$). Очевидно, надлишок певних цитокінів і низки інших біологічно активних сполук, які виділяються під час інфламаторного процесу скорочують період росту сперматоцитів, проявом чого є мікросоматичний морфотип.

Після проведеного лікування обстеження обох груп хворих встановило зниження продуктів ПОЛ та збільшення ферментів АОЗ крові в пацієнтів, які отримували гепатомас. У групі контролю ці показники мали лише тенденцію до нормалізації й достовірно відрізнялися від нормативних (таблиця).

Вплив гепатомасу на продукти перекисного окиснення ліпідів та ензими антиоксидантного захисту

Показники	Норма	До лікування	Після лікування	
			I група	II група
Дієновий кон'югат, мкмоль/мл	$6,25 \pm 0,12$	$9,1 \pm 0,7^*$	$6,87 \pm 0,23$	$8,45 \pm 0,34^* P < 0,01$
Малоновий діальдегід, ммоль/мл	$3,6 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,6^{**}$	$3,9 \pm 0,15$	$6,5 \pm 0,7^* P < 0,01$
Перекисний гемоліз еритроцитів, %	$3,1 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,4^{**}$	$3,5 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,4^* P < 0,01$
Каталаза, мкат/г	356 ± 15	$276 \pm 9^*$	361 ± 8	$298 \pm 8^* P < 0,01$
Супероксиддисмутаза, ум.од./г	$28,2 \pm 1,2$	$19,6 \pm 1,2^{**}$	$27,9 \pm 1,3$	$22,5 \pm 1,5^* P < 0,05$
Індекс Ф	3217 ± 15	$644 \pm 4^{***}$	2582 ± 142	$1031 \pm 57^{***} P < 0,001$

Примітка: достовірність різниці показників в групі до і після лікування при значеннях P : * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$; P – достовірність різниці між показником I та II групи після лікування.

Як видно з таблиці, показники ПОЛ та ензима АОЗ крові після проведеного лікування у групі, яка отримувала гепатомакс, вірогідно не відрізнялися від норми на противагу групі хворих, котрі не отримували цей препарат. Мікроспермометрія після проведеного лікування показала нормалізацію морфологічних особливостей сперматозоїдів у більшості пацієнтів першої групи (нормоспермія у 85,8 % чоловіків, $P < 0,001$) порівняно з пацієнтами другої групи у яких спостерігалася наявність високого відсотка патологічних форм сперматозоїдів (нормоспермія у 27,8 % чоловіків, $P > 0,05$).

Проводячи кількісну оцінку ефекту фітотерапії безплідних чоловіків із малосимптомними формами урогенітальної інфекції встановлено, що запропонований метод знижує неефективність лікування на 42,2 % (інтервальна оцінка: 39,4–53,4 %, $P = 0,05$) у порівнянні з загальноприйнятими методами. Новий метод лікування понижує ризик неефективності лікування в 3,46 рази (інтервальна оцінка: 2,54–5,64 рази, $P = 0,05$) в порівнянні з контрольним методом лікування, причому число хворих, яких потрібно пролікувати становить 2,3 чоловіка (інтервальна оцінка: 1,6–2,8 чоловіка, $P = 0,05$), тобто слід пролікувати 2–3 чоловік, щоб отримати додаткового вилікованого хворого у порівнянні із загальноприйнятим методом лікування.

Таким чином, отримані результати свідчать про зниження показників АОЗ крові, що узгоджується з літературними даними [6, 10, 17]. Запалення в урогенітальному тракті супроводжується дисбалансом цитокінового профілю. Це призводить не тільки до підвищення концентрації продуктів ПОЛ, а й до зміни мікрооточення генеративних клітин, наслідком чого є зниження запліднювального потенціалу. Про це свідчить збільшена кількість патологічних форм сперматозоїдів. Рослинні компоненти, які входять до складу гепатомаксу, посилюють продукцію факторів природної антиінфекційної резистентності,

оптимізацію синтезу про- та протизапальних цитокінів, нормалізують стан оксидативних систем. Що, зрештою, призводить до підвищення фертильних властивостей сперми.

ВИСНОВКИ

1. В інфертильних пацієнтів, незважаючи на нормальну кількість та рухливість сперматозоїдів, залишаються морфологічно функціональні зміни, які, очевидно, й визначають запліднювальний потенціал.

2. У хворих з малосимптомними формами ХЗУТ, ускладненого безпліддям, спостерігається активація ПОЛ, проявом чого є підвищення вмісту у крові МДА і ДК, а також збільшення ПГЕ. Разом з цим у більшості обстежених хворих знижується антиоксидантний потенціал крові, про що свідчить зменшення активності СОД та пригнічення інтегрального індексу Ф.

3. Наявність негативного кореляційного зв'язку між підвищеним рівнем мікросоматичних форм сперматозоїдів та інтегральним показником Ф говорить про токсичну дію продуктів ПОЛ на процеси матурації.

4. Призначення фітозасобу гепатомакс у комплексному лікуванні хворих з малосимптомними ХЗУТ, ускладненого безпліддям, нормалізує діяльність про- та антиоксидантної систем та усуває патологічні форми сперматозоїдів, що призводить до збільшення фертильності чоловіків.

5. Враховуючи, що пацієнти із ХЗУТ тривало приймають антибіотикотерапію, актуальним є застосування препаратів із гепатопротекторними властивостями.

С. Ю. Ціпоренко

ВЛИЯНИЕ ГЕПАТОМАКСА НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ МУЖЧИН

Изучены особенности морфотипа сперматозоидов у мужчин с бесплодием и выявлена определенная моноmodalность в его отклонениях. Проведено исследование продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) крови у мужчин

с малосимптомними формами хронического воспаления урогенитального тракта, осложненного бесплодием. Установлено, что у большинства обследованных мужчин отмечена активация перекисидации липидов биомембран, что сопровождалось повышением концентрации основных метаболитов ПОЛ – промежуточного (диеновый конъюгат) и конечного (малоновый диальдегид) в сыворотке крови. При изучении состояния системы АОЗ было обнаружено, что активность каталазы и супероксиддисмутазы снижалась. Исчислялся также интегративный индекс Ф, который характеризует соотношение про- и антиоксидантных свойств крови. Установлено угнетение этого индекса, что свидетельствует о дисбалансе показателей ПОЛ/АОЗ. Установлено отрицательную корреляционную связь между индексом Ф и наличием микросоматических форм сперматозоидов. Показано положительное влияние гепатомакса на процессы восстановления активности оксидативных систем, нормализации интегрального показателя Ф и снижение количества патологических форм генеративных клеток. Учитывая антиоксидантные, иммуномодулирующие, гепатопротекторные свойства гепатомакса, мы считаем целесообразным включать этот препарат в комплексное лечение инфертильных мужчин с воспалительными процессами в урогенитальном тракте. Ключевые слова: мужское бесплодие, сперма, сперматозоиды, варианты морфотипа, продукты перекисного окисления липидов, ферменты антиоксидационной защиты, лечение, гепатомакс.

S. Yu. Tsiporenko

INFLUENCE OF HEPATOMAX ON MALE FERTILITY

The features of morphotype sperm in men with infertility and found some monomodal its deviations. The study of products of lipid peroxidation (LPO) and antioxidant enzymes (AOP) levels in men with mild forms of chronic inflammation of the urogenital tract complicated with infertility. The studies found that the majority of men surveyed marked activation of lipid peroxidation of biological membranes, which was accompanied by increased concentrations of the major metabolite of LPO - intermediate (conjugated diene) and final (malondialdehyde) in serum. In the study of the system of AOP was found that the activity of catalase and superoxide dismutase decreased. Was calculated as an integrative index F, which characterizes the ratio of prooxidant and antioxidant properties of blood. Found suppression of the index, which indicates an imbalance indicators LPO / AOP. A negative correlation between the index F and the presence of mikrosomatich form sperm was found. The positive influence of the Hepatomax on the process of recovery oxidative activity systems, normalization of the integral index of F and reduce the number of abnormal forms of generative cells was established. Given antioxidant, immunomodulating, hepatoprotective properties of the Hepatomax, we consider it appropriate to include this drug

in treatment of infertile men with inflammatory processes in the urogenital tract.

Key words: male infertility, sperm, sperm morphotype variants, products of lipid peroxidation, cytokines, treatment, hepatomaks.

Lugansk Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века // Пробл. репродукции. – 2000. – №1. – С. 6–13.
2. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 33–36.
3. Демченко А.Н. Дисфункциональная гипфертильность у мужчин, новейшие подходы к ее классификации, диагностике и терапии // Новости медицины и фармации. – 2004. – № 13. – С. 16–18.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–18.
5. Лях Ю.С., Гурьянов В.Г. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat. – Донецк, 2004. – 212 с.
6. Трифонова Ю.П. Діагностика та корекція порушення чоловічої фертильності в залежності від стану вільнорадикальних процесів : Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.06. – К., 2005. – 18 с.
7. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С.9–13.
8. Юршин В.В. Экскреторна воспалительная форма мужского бесплодия (диагностика, лечение, реабилитация) // Клини. медицина. – 2005. – № 12. – С. 68–70.
9. Comhaire F., Van Waelegheem K., De Clercq N. Declining sperm quality in European men // *Andrologia*. – 1996. – 28. – P. 300–301.
10. Griveau J.F., Dumont E., Renerd P. Reactive oxygen species, lipid peroxidation, and enzymatic defence systems in human spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.* – 1995. – 103. – P. 17–26.
11. Kovalski N., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers // *Fertil. Steril.* – 1992. – 58. – P. 809–816.
12. Kurpisz M., Miesel R., Sanocka D., Jedrzejczak P. Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility // *Hum. Reprod.* – 1996. – 11. – P. 1223–1226.
13. de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes // *J. Androl.* – 1992. – 16. – P. 21–25.
14. Monica H. Vazquez Levin. Response of routine semen Analysis and critical assessment of sperm morphology by Kruger classification to therapeutic varicocelectomy // *J. Urol.* – 1997. – 158 (5). – P. 1804–1807.

15. Ochsendorf F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species // Hum. Reprod. Update. – 1999. – 5. – P. 399–420.
16. Rajasekaran M., Hellstrom W.J., Naz R.K., Sikka S.C. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia // Fertil. Steril. – 1995. – 64. – P.166–171.
17. Sanocka D., Fraczek M., Jedrzejczak P., Szumala-Kakol A., Kurpisz M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen // J. Reprod. Immunol. – 2004. – 62. – P. 111–124.
18. Sanocka D., Miesel R., Jedrzejczak P., Kurpisz M. Oxidative stress and male infertility // J. Androl. –1996. – 17. – P. 449–454.
19. Wang A, Fanning L, Anderson DJ, Loughlin KR. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection // Arch. Androl. – 1997. – 39. – P. 11–17.
20. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. – WHO, 4-th edn.: Cambridge universiti press, 1999. – 128 p.

ДЗ «Луган. мед. ун-т»
E-mail: tsiporenko@ukr.net

Матеріал надійшов
до редакції 14.1.2012

М.І. Лісяний

Мезенхімальні стовбурові клітини та їх імунні властивості

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) наявні в різних тканинах організму, у тому числі і в кістковому мозку, жировій тканині, шкірі. Вони можуть розмножуватися не лише в умовах in vivo, але і in vitro. МСК мають великий регенеративний потенціал і здатні трансформуватися в різні типи тканин організму. Крім того, МСК проявляють виражені імуносупресивні властивості та можуть пригнічувати функції різних імунних клітин, особливо Т-лімфоцитів, кілерних і дендритних клітин. Ці властивості вже використовуються в клініці для гальмування аутоімунних реакцій і реакцій транспланта проти хазяїна. Показано, що імуносупресія МСК досягається завдяки синтезу таких гуморальних факторів, як цитокіни, індоламіно-2, 3-діоксигенази, оксиду азоту тощо. У разі використання МСК при інфаркті міокарда у щурів ці клітини трансформуються в міоцити та змінюють свій антигенний профіль, втрачаючи здатність гальмувати імунні реакції, що призводить до їх відторгнення. Ці факти важливі для з'ясування механізму їх дії та використання в клінічній практиці як для імуносупресії, так і клітинної терапії.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, імуносупресія, цитокіни, HLA-антигени.

Загальна характеристика МСК. Серед нових методів лікування низки складних захворювань чільне місце займає клітинна терапія, яка здатна відновлювати або регенерувати тканини, що змінилися з віком або через хворобу. Зокрема, посилено вивчаються мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (МСК) і апробовані при окремих захворюваннях [18, 42, 55]. Фізіологічна роль МСК пов'язана з їх особливою локалізацією в синусоїдальних судинах дорослого кісткового мозку і здійсненні контролю та регуляції його взаємозв'язку з периферичною кров'ю – це своєрідний “охоронець воріт” кісткового мозку, що підтримує його гомеостаз [45]. При штучній трансплантації в організм реципієнта, МСК проявляють і інші функції в залежності від мікрооточення й експресії генів певних антигенів і поверхневих молекул. Однак відсутність оптимальних клінічних протоколів як отримання та стандартизації цих клітин, так

© М.І. Лісяний

і методів застосування є істотним гальмом до широкого їх клінічного застосування. Залишається до кінця не з'ясованим значення таких явищ, як походження та проліферативна активність МСК, їх регенеративно-диференціальний потенціал, імуносупресивна й антигенна здатність, стан органа-мішені, на яку спрямована терапія цих клітин [45]. Велика увага останнім часом приділяється МСК, що виділені з жирової тканини, тобто жировим мезенхімальним стовбуровим клітинам (ЖМСК), які більш доступні для отримання, ніж кістковомозкові МСК [46].

Відомо, що МСК, як і ЖМСК, здатні до самовідтворення, а також до диференціації в різні типи тканин мезенхімального та іншого походження, включаючи остеоцити, хондріоцити, гепатоцити, адипоцити, нейрони, м'язові, епітеліальні клітини [24, 27, 43] в залежності від мікрооточення або факторів диференціювання. Показано, що МСК мають

значну протизапальну та імуномодулювальну дію [3, 9, 38, 39]. Якщо ж диференціальний потенціал МСК залежить від мікрооточення *in vivo* і проявляється не відразу, то імуносупресивна здатність – негайно після застосування, що є підставою для використання МСК при багатьох аутоімунних і запальних захворюваннях. Більше того, їхню імуносупресивну активність відносять до конституційних, а диференційну – до індукованих, набутих властивостей, яка супроводжується синтезом і секрецією різних факторів, активацією ендогенних прогеніторних клітин і їх диференціюванням [9, 63]. Так, МСК широко почали застосовувати для лікування реакції трансплантат проти хазяїна (РТПХ), системного червоного вовчачка (СЧВ), ревматоїдного артрити (РА), розсіяного склерозу (РС), діабету, гіпертиреозу тощо [5, 6, 8, 13, 62, 58, 61, 62]. Сьогодні визначено необхідний мінімум вимог до МСК як кістково-мозкового, так і жирового походження, який рекомендується Міжнародним товариством клітинної терапії. Серед них такі: 1) здатність прилипати до пластика; 2) відсутність гемопоетичних маркерів (CD-45, 3, 14, 11 в, 79а, 19 і HLA-DR); 3) потрібний потенціал мезодермального диференціювання в остеобласти, хондріобласти, адипоцити 4) імуномодулювальна здатність [16]. Крім мезодермальної спрямованості диференціювання, МСК властивий ектодермальний шлях – у нейрони та ендодермальний – у міоцити та гепатоцити [24, 43, 46].

Імунні властивості МСК. Багатьма дослідженнями показаний різнобічний імуномодулювальний вплив МСК на імунну відповідь, а саме: 1. МСК є імунопривілейованими і слабоімуногенними клітинами через низьку експресію молекул головного комплексу гістосумісності (ГКС-1) та таких коstimулювальних молекул, як В7-1 (CD-80), В7-2 (CD-86), CD-40 [16]; 2. МСК секретують багато таких розчинних імуномодулювальних факторів, як інтерлейкін-6 (IL-6), макрофагопригнічувальний фактор [26], які гальмують активізацію і проліферацію В- і

Т-клітин, а також пригнічують диференціацію та дозрівання і функцію дендритних клітин [24, 43]. Крім того, МСК синтезують апоптотичні й антизапальні молекули і тим самим захищають тканини організму від ушкодження [26, 32]. Враховуючи наявність в МСК імуносупресивних властивостей, їх рекомендують застосовувати для гальмування РТПХ при трансплантації кісткового мозку та лікування аутоімунних захворювань [5, 6, 8, 13, 62]. ЖМСК контролюють летальну РТПХ у мишей при введенні спільно з несингенними гемопоетичними клітинами [61]. У мишей МСК гальмували розвиток експериментального аутоімунного енцефаліту (ЕАЕ), коли вводили МСК до його індукції або на початку хвороби [62]. При колагеновому артриті МСК гальмували розвиток важких його наслідків, що пов'язується з пригніченням ними вмісту сироваткових прозапальних цитокінів [13]. МСК блокували розвиток аутоімунного тиреоїдиту і синтез Th-1 цитокінів [8]. Окрім того, МСК пригнічували відторгнення алотрансплантата та покращували виживання пересаженої шкіри [47]. МСК у різних тестах *in vitro* пригнічували проліферативну активність Т- і В-лімфоцитів, функцію дендритних і кілерних клітин [11, 23, 56]. Імуносупресорний механізм дії МСК полягав у прямій взаємодії з клітинами імунної системи [25, 47] і індукції синтезу цитокінів [48]. Водночас аутологічні МСК, які були отримані від пацієнтів з аутоімунною патологією та введені цим самим хворим, не завжди давали позитивний результат і нині немає єдиної думки про їх ефективність [2]. Так, Рарадукі та співавт. [40] показали, що МСК кісткового мозку від хворих на ревматоїдний артрит були ослаблені і погано відновлювали гемопоез, а взяті від хворих з розсіяним склерозом мали також знижені імуносупресивні властивості [40, 41].

Імунорегуляторні цитокіни МСК. Нині уявлення про механізми імуносупресії МСК суперечливі і немає єдиної думки про їх природу. Показано, що вони виділяють ба-

гато таких гуморальних факторів, як ІЛ-10, трансформуючий фактор росту- β (ТФР- β) простагландин Е-2, оксид азоту (NO), індоламід 2,3-діоксигенази (IDO), гепатотропний фактор росту (HGF) [1, 27, 33, 37, 49, 53]. Встановлено, що МСК стимулюють активацію Т-регуляторних супресорних клітин [12, 42, 54]. Така кількість чинників, які виділяються МСК з імуносупресивними властивостями, є результатом досліджень з використанням нестандартних прийомів і методів, а також способів культивування МСК. Кожний одержаний новий факт може по-різному трактуватися в залежності від методу дослідження та особливостей патології. Уточнення конкретних механізмів імуносупресії МСК людини і визначення провідних її чинників надзвичайно важливо для практичного застосування МСК [15, 49]. Водночас, аналізуючи ці досить суперечливі та різні за своєю природою дані, можна вважати, що МСК не є однорідною за складом популяцією клітин, а складається з кількох субпопуляцій клітин, як це характерно для лімфоцитів. Суперечливим є питання про механізм розвитку імуносупресії, його тривалість і роль цитокінів у цьому процесі. Нещодавно було однозначно встановлено, що мишині МСК відрізняються від людських, і їх імуносупресивна активність пов'язана із індукцією запальними цитокінами та продукцією NO [49, 50]. На різних моделях було показано, що запальні цитокіни індукують значну продукцію NO, яка в свою чергу гальмує проліферацію і синтез цитокінів лімфоцитами. Як відомо, NO є лабільною, біоактивною, газоподібною молекулою [57], а також показано, що NO і його похідний азотистий радикал (NO^-) може порушувати функцію багатьох ферментів, рецепторів та іонних каналів мембрани клітин [17]. У цьому зв'язку важливо те, що NO є вкрай нестабільним радикалом, який діє тільки на дуже коротку відстань від клітини, що зумовлює необхідність тісного контакту МСК з лімфоцитами для прояву своєї імуносупресивної дії [49, 50]. Встановлено, що хемотаксис мишачих МСК

– надзвичайно важливий і критичний момент у прояві NO-індукованої супресії [49]. Якщо для мишиних МСК механізм імуносупресії є доведеним за допомогою NO, то у відношенні МСК людини такої ясності немає, оскільки інгібіція активності NO-синтази призводила до втрати імуносупресивних властивостей МСК мишей і не впливала на активність МСК людини, в той час, як блокада синтезу індол 2,3-діоксигенази (IDO), навпаки, інгібувала імуносупресію МСК людини і не впливала на МСК мишей [34]. З IDO як імуносупресивним фактором пов'язують різні імунні стани організму, зокрема толерантність тканин плоду, імунну ізольованість кристалика, місцеву імуносупресію в злоякісних пухлинах [35, 36]. IDO синтезується за допомогою реакції перетворення триптофану, незамінної амінокислоти, завдяки кіпуреніновому шляху метаболізму. Вважається, що зменшення концентрації триптофану та продукція супресорних триптофанових метаболітів сприяє прояву імуносупресивних властивостей МСК людини. Порівняльні дослідження імуносупресивних властивостей мишиних і людських МСК показали, що для прояву цих властивостей необхідна їх активація прозапальними цитокінами, зокрема γ -інтерфероном і фактором некрозу пухлини α . Ці цитокіни активують МСК, а також стимулюють виділення ними не тільки NO і IDO, але і синтез хемокінів, які викликають міграцію імунних клітин та створюють локальне мікрооточення, необхідне для прояву імуносупресивної дії [17, 49, 50]. Без додаткової стимуляції цитокінами МСК мають слабку імуносупресивну активність *in vitro*. Ці результати дали можливість припустити, що синтез цитокінів і супресивних агентів МСК кісткового мозку людини не є суто конституційною характеристикою цих клітин, а більшою мірою відноситься до індукованих характеристик, які залежать від стимуляції МСК цитокінами [50]. IDO є нормальним фізіологічним ендогенним чинником, що бере участь у формуванні периферичної толерантності та імуносупресії

плода, пухлини тощо [35, 36]. Застосування 1-метил L-триптофану усувало супресивну дію IDO *in vivo* [34], посилювало розвиток аутоімунної патології [22]. Поєднання 1-метил L-триптофану з хіміотерапією дало змогу підвищити ефект у лікуванні пухлин і, навпаки, гіперекспресія IDO гена у клітинах пухлини призводила до супресії імунної системи при її трансплантації [29, 59].

Пряма взаємодія МСК і імунних клітин. Відомо, що МСК експресують CD-90, CD-73 і не експресують антигени класу HLA-I і HLA-II або молекули костимуляції CD-80, 86,40 чи CD-40 протеїн, тому вони не здатні активувати алогенні Т-клітини [63]. Але з іншого боку МСК експресують неklasичні молекули класу ГКГ-I – HLA-G, що мають великий інгібіторний вплив на клітини імунної системи [30, 52, 54]. Так, молекула HLA-G пригнічує різні імунні функції, в тому числі NK і Т-клітинну цитотоксичність [8, 16], алоантигенвикликану проліферацію, дозрівання дендритних клітин [52]. Молекули класу HLA-G експресуються на різних тканинах здорового організму [28]. Спочатку були виявлені на клітинах цитотрофобластів, де вони підтримують толерантність до плоду [57, 28, 11]. Крім того, антигени HLA-G експресуються і при патології, зокрема в пухлинах і на довгоживучих органних трансплантатах [31, 54]. Протеїн HLA-G може експресуватися в різних ізоформах, нині відомо їх декілька: мембранозв'язані HLA-G молекули від HLAG-1 до HLAG-4; розчинні форми від HLAG-5 до HLA-7 [7, 51]. Для цих молекул виявлено 3 види рецепторів на різних типах клітин: кілерний (KIR-2DL-4/CD158a); лейкоцитарний (LILRB1/ILT-2/CD-85J), імуноглобуліноподібні рецептори та (LILRB2/ILT-4/CD-85d) [7, 31, 51]. Показано, що KIR2DL-4-рецептор експресується на NK-клітинах, тоді як ILT-4 – на мієлоїдних клітинах, а ILT-2 на моноцитах і дендритних клітинах, Т- і В-лімфоцитах тощо [10, 26, 48]. Молекули HLA-G були виявлені спочатку на фетальних МСК [25], а пізніше і на

МСК дорослих особин. Так, МСК експресують як мембранні форми, так і секретують HLA-G-білки в живильне середовище при культивуванні, а нейтралізація цих молекул за допомогою антитіл відмінняє їх імуносупресивну дію [54]. Секреція HLA-G-молекул МСК різко посилюється після антигенного стимулу. Одним із ключових чинників, що визначають секрецію МСК HLA-G-молекул, є IL-10, і обробка IL-10-моноцитів різко посилювала виділення розчинної форми – HLA-G-5 [54]. Водночас відомо, що IL-10 є Th-1-інгібіторним цитокином і синтезується Th-2-лімфоцитами, що передбачає наявність певного зв'язку між МСК і Th-2-лімфоцитами [26, 54]. Показано, що HLA-G-5 та IL-10 діють синергічно і доповнюють один одного в реалізації імуносупресивного впливу [54]. Крім імуносупресивного впливу на Т-клітинну відповідь, молекула HLA-G-5 здатна генерувати накопичення Т-регуляторних CD-4⁺, CD-25⁺, Fox P3⁺-клітин і, як стверджує Selmani та співавт. [54], вона дійсно потрібна для формування Т-регуляторних супресорних клітин. Показано, що МСК синтезують в основному розчинну ізоформу HLA-G-5-молекулу, яка експресується на фетальних еритроїдних прогеніторах в кістковому мозку, і передбачається, що в ньому ця молекула якраз і запускає формування Т-регуляторних клітин для стримування імунної атаки організму на прогеніторні клітини, які знаходяться у кістковому мозку [54]. Таке накопичення Т-регуляторних клітин можливе завдяки прямому контакту МСК і Т-лімфоцитів, а також секреції HLA-G-5-молекул [57, 31, 51]. Тільки після прямої взаємодії МСК і Т-клітин збільшувалася секреція в культуральне середовище HLA-G-5-молекул. Ймовірно, й інші цитокини секретуються МСК після прямої взаємодії з лімфоцитами [54]. Сьогодні вже можна стверджувати, що існує пряма взаємодія МСК з різними типами Т-клітин, що супроводжується посиленням синтезу та секреції клітинами HLA-G-5-молекул, яка забезпечує

як мінімум 4 різних механізми імуносупресії: а) пригнічує цитолітичну активність і секрецію γ -інтерферону Т-лімфоцитами і НК-клітинами, б) прямо гальмує проліферативну відповідь алогенних Т-клітин, с) збільшує вміст ІЛ-10 в мікрооточенні МСК, д) викликає накопичення Т-регуляторних CD-4⁺, CD-25⁺, Foxp3⁺-клітин [54]. Все це можливо завдяки прямій взаємодії Т-лімфоцитів і МСК, яка є першим кроком на шляху імуносупресії. Показано, що МСК можуть бути не тільки імуносупресивними, але також і антигенпрезентуючими клітинами та запустити імунну відповідь [10, 54]. Така подвійна роль МСК пов'язана зі змінами експресії HLA-II антигенів і супресорної коstimулювальної молекули B7-H1/ та DR-L1-рецептора після впливу на них γ -інтерферону [54, 60]. Таким чином, МСК, з одного боку, властива, так звана імунна "привілеція" (захищеність) від розвитку імунних реакцій організму, а з іншого, ці клітини мають пряму і непряму (через гуморальні фактори) імуносупресорну активність, яка спрямована на практично всі ланки природженого і набутого імунітету. Хоча ці дві головні властивості МСК не є абсолютними і можливі різні ситуації, коли вони не проявляються повною мірою, а самі алогенні МСК стають об'єктом імунних реакцій організму.

Антигенні властивості МСК. Так, алогенні СМК кісткового мозку широко застосовуються в медицині, особливо в кардіології при лікуванні інфаркту міокарда. Багатьма роботами показано поліпшення функції серця після трансплантації СМК, але водночас дослідники зіткнулися з певною проблемою: так, СМК, отримані від літніх людей з інфарктом міокарда, мали меншу регенеративну здатність, ніж МСК від молодих осіб, тому аутологічні гістосумісні клітини менш придатні, ніж чужорідні СМК молодих людей [4, 21, 60]. Доля алогенних СМК, введених в міокард, остаточно ще не вивчена і є різні, суперечливі дані, як про приживлення, так і їх відторгнення [20, 43]. Деякі автори аргу-

ментували свій висновок про приживлення МСК тим, що ці клітини є імуносупресорними агентами і їх можна застосовувати при різних аутоімунних захворюваннях. Інші автори свідчать, що при диференціюванні СМК можлива втрата супресорних властивостей цих клітин, що може призводити до відторгнення як СМК, так і їх уже диференційованих прогеніторів [20, 21, 43, 60]. Проведені спеціальні дослідження показали, що обидва ці висновки певною мірою правильні і при введенні СМК спостерігається як імуносупресія, так і активація алоімунних реакцій реципієнта, які направлені на відторгнення введених клітин. Порівнюючи диференційовані *in vitro* і недиференційовані СМК щурів, було встановлено, що в перших СМК збільшується експресія імунних антигенів головного комплексу гістосумісності МНС-1а і МНС-II і CD-86 і в той же час знижується вміст імуносупресорного МНС-1в-протеїну, який виражено представлений тільки на недиференційованих клітинах. Цю різницю в експресії вдалося виразити кількісно. Встановлено, що кількість клітин, яка експресує МНС-1а-молекулу, збільшувалася на 30 %, а кількість клітин, що експресують супресивну молекулу МНС-1в зменшилася на 33 % [60]. Ця різниця вказує, що в процесі диференціювання СМК може відбуватися втрата ними імуносупресивних агентів і збільшення антигенів МНС, які індукують реакції відторгнення. Подібні зміни експресії антигенів гістосумісності спостерігалися і при трансплантації *in vivo*. Так, при введенні МСК щурам в ділянках інфаркту міокарда відзначено, що протягом перших 7 діб не збільшується експресія МНС-1а-антигена на МСК, але вже з 14-ї доби виявляється високий його вміст, а також збільшується кількість клітин, що містять МНС-1а-антиген, при цьому паралельно збільшувалася кількість маркерів міогенного диференціювання [4, 21, 60]. Здатність диференційованих СМК експресувати імуногенні антигени показана в тесті змішаної культури лейкоцитів, де

недиференційовані або аутологічні МСК не викликали при культивуванні протягом 3 діб появи цитотоксичних лімфоцитів. За таких умов лише диференційовані МСК викликали проліферацію ефекторних Т-лімфоцитів і різке зростання їх кілерної активності. У ділянці інфаркту збільшувалася кількість лімфоцитів СД-3, СД-4, СД-8, що вказує на розвиток реакції відторгнення, а в сироватці крові були наявні аутоантитіла до алогенних лімфоцитів вже на 2–4-му тижні після трансплантації диференційованих клітин. Функція міокарда поліпшилася протягом 4 міс, але вже з 5-го місяця ефект після введення алогенних МСК клітин не проявлявся, тоді як від введення сингенних МСК позитивний ефект ще зберігався [21]. Таким чином, можна стверджувати, що МСК притаманий біфазний імунний стан, який спочатку проявляється імунопривілейованістю, і вони пригнічують локальну імунну реакцію проти себе. При диференціюванні МСК змінюється експресія генів гістосумісності, зникають супресорні і з'являються стимулювальні імунну відповідь антигени, що розвиває імунну відповідь до цих антигенів і формує реакції відторгнення вже диференційованих клітин. Диференційовані у міоцити або васкулярні клітини міокарда МСК відторгаються за рахунок специфічного імунного цитолізу, а імуносупресивний МНС-1в-антиген зникає з поверхні клітин.

Таким чином, можна виділити три різні функціональні стадії розвитку МСК: незрілі, “наївні”; активовані; МСК, що почали диференціюватися. Якщо в неактивованій “наївній” стадії переважають більше контактні взаємодії МСК і клітин імунної системи, що призводить до первинної імуносупресії реципієнта, то вже після активації МСК (2-га стадія розвитку) прозапальними цитокінами (ФНП, ІЛ-1, 6 та γ -інтерфероном), запускається реакція багаторівневої імуносупресії, спрямованої практично на всі субпопуляції лімфоцитів і синтез ними цитокінів, починаючи від дендритних клітин і закінчуючи

клітинною цитотоксичністю. І, нарешті, на етапі запуску процесів диференціювання МСК (3-тя стадія) змінюють спектр цитокінів та свої антигенні властивості, що призводить до експресії антигена HLA II класу і молекул костимуляції, що є основою для імунного їх розпізнавання і запуску реакцій відторгнення у разі їх гістосумісності. Таким чином, МСК дорослого організму здатні змінювати свої антигенні та імуносупресивні властивості в залежності від стадії розвитку та мікрооточення. Імунна “привілейованість”, імуносупресивна активність МСК є вродженою фізіологічною властивістю, яка відображає перші стадії їхнього розвитку. У МСК, які стали на шляху диференціювання, відбувається перебудова, “перезавантаження” генетичної програми, що проявляється, з одного боку, набуттям нових властивостей клітин прогеніторів (міоцитів, нейронів, гепатоцитів), а з іншого – експресією антигенів, які здатні запускати імунні реакції та призводити до відторгнення цих клітин. Такі відмінності у властивостях МСК мають важливе значення і визначають умови застосування в клініці аутологічних або алогенних МСК. Так, якщо необхідна короткочасна супресія на якийсь певний період, то придатні сингенні та алогенні МСК, якщо ж передбачається тривале їх існування з трансформацією в певний тип тканин (моноцити, нейрони, гепатоцити), тоді перевагу мають аутологічні МСК. Як показують наведені вище дані, імуномодулювальні властивості МСК, їх варіації в залежності від методів культивування, доз і способів застосування вивчені ще недостатньо, і майбутні дослідження дадуть змогу відповісти на багато теоретичних і практичних питань.

Н.И. Лисяный

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ИММУННЫЕ СВОЙСТВА

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) определяют в различных тканях организма в том числе и в костном мозге, жировой ткани, коже. Они могут размножаться в условиях *in vitro*. МСК имеют большой регенеративный

потенціал и способны трансформироваться в различные типы тканей организма. Помимо этого, МСК имеют выраженные иммуносупрессивные свойства и способны подавлять функции разных иммунных клеток, особенно Т-лимфоцитов, киллерных и дендритных клеток. Эти свойства уже используются в клинике для торможения аутоиммунных реакций и РТПХ. Во многих работах показано что иммуносупрессия МСК достигается благодаря синтезу таких гуморальных факторов, как цитокины, индоламино-2,3 диоксигеназа, оксид азота и др. При использовании МСК при инфаркте миокарда у крыс эти клетки трансформируются в миоциты и изменяют свой антигенный профиль, а также теряют способность тормозить иммунные реакции, что приводит к их отторжению. Эти факты важны для понимания механизма их действия и для использования в клинической практике как с целью иммуносупрессии, так и клеточной терапии.

Ключевые слова: мезенхимально стволовые клетки, иммуносупрессия, цитокины, HLA-антигены.

N.I. Lisiany

MESENCHYMAL STEM CELLS AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES

Mesenchymal stem cells (MSC) are found in a variety of tissues, including bone marrow, skin and adipose tissue and can be expanded easily in vitro. MSC are thought to have tissue regenerative properties, in the first place via their multilineage differentiation capacity. In addition, MSC have potent immunomodulatory capacity. They inhibit the proliferation of T cells and inhibit dendritic cell maturation. These properties make MSC promising for a diversity of clinical applications; for example, for the prevention and treatment of autoimmune diseases and bone marrow rejection. Different studies have attributed the immunosuppressive effect of MSC to different immunosuppressive factors. These include indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), HLA-G, nitric oxide, interleukines. The long-term ability of allogeneic MSCs to preserve function in the infarcted heart is limited by a biphasic immune response whereby they transition from an immunoprivileged to an immunogenic state after differentiation, which is associated with an alteration in major histocompatibility complex-immune antigen profile. These findings provide critical information about the immunosuppression of MSCs and for better application of MSCs in treating immune disorders.

Key words: Mesenchymal stem cells; Immunosuppression; Cytokine; HLA-antigens

Institute of Neurosurgery named after acad.A.P.Romodanov of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // *Blood*. – 200. – **105**. – P.1815–1822.
- Al-Refu K., Goodfield M. Hair follicle stem cells in the pathogenesis of the scarring process in cutaneous lupus erythematosus // *Autoimmun. Rev.* – 2009. – **8**. – P.474–477.
- Ankrum J., Karp J.M. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back // *Trends Mol Med.* – 2010. – **16**. – P.203–209.
- Atoui R., Shum-Tim D., Chiu R.C. Myocardial regenerative therapy: immunologic basis for the potential “universal donor cells” // *Ann Thorac. Surg.* – 2008. – **86**. – P.327–334.
- Augello A., Tasso R., Negrini S.M., Cancedda R., Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis // *Arthritis Rheum.* – 2007. – **56**. – P.1175–1186.
- Cai L., Johnstone B.H., Cook T.G., Tan J., Fishbein M.C., Chen P.S., March K.L. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function // *Stem Cells*. – 2009. – **27**. – P.230–237.
- Carosella E.D., Moreau P., Le Maoult J. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance // *Adv. Immunol.* – 2003. – **81**. – P.199–252.
- Choi E.W., Shin I.S., Lee H.W., Park S.Y., Park J.H., Nam M.H., Kim J.S., Woo S.K., Yoon E.J., Kang S.K., Ra J.C., Youn H.Y., Hong S.H. Transplantation of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis // *J. Gene Med.* – 2011 – **13**. – P.3–16.
- Choi Y.H., Kurtz A., Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy // *Hum Gene Ther.* – 2011. – **22**. – P.3–17.
- Colonna M., Navarro F., Bellon T. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells // *J. Exp. Med.* – 1997. – **6**. – P.1809–1818.
- Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions // *Blood*. – 2006. – **107**. – P.367–372.
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // *Ibid.* – 2002. – **99**. – P. 3838–3843.
- Djouad F., Bouffi C., Ghannam S., Noil D., Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2009. – **5**. – P.392–399.
- Djouad F., Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noel D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism // *Stem Cells*. – 2007. – **25**. – P.2025–2032.

15. Djouad F., Plence P., Bony C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals // *Blood*. – 2003. – **102**. – P.3837–3844.
16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – **8**. – P.315–317.
17. Edwards T.M., Rickard N.S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2007. – **31**. – P. 413–425.
18. Garcia-Gomez I., Elvira G., Zapata A.G., Lamana M.L., Ramirez M., Castro J.G., Arranz M.G., Vicente A., Bueren J., Garcia-Olmo D. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications // *Exp. Opin. Biol. Ther.* – 2010. – **10**. – P.1453–1468.
19. Grohmann U., Orabona C., Fallarino F. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo // *Nat. Immunol.* – 2002. – **3**. – P. 1097–1101.
20. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2009. – **54**. – P.2277–2286.
21. Heiss C., Keymel S., Niesler U., Ziemann J., Kelm M., Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction // *Ibid.* – 2005. – **45**. – P.1441–1448.
22. Hulkower K., Brosnan C.F., Aquino D.A. Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis // *J. Immunol.* – 1993. – **150**. – P. 2525–2533.
23. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells // *Blood*. – 2005. – **105**. – P.4120–4126.
24. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature*. – 2002. – **418**. – P.41–49.
25. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide // *Blood*. – 2003. – **101**. – P.3722–3729.
26. Le Blanc K., Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience // *J. Intern. Med.* – 2007. – **262**. – P.509–525
27. Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood // *Blood*. – 2004. – **103**. – P.1669–1675.
28. Lila N., Rouas-Freiss N., Dausset J. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: A CD4⁺ T cell regulatory mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**. – P.12150–12155.
29. Liu H., Liu L., Fletcher B.S. Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis // *FASEB J.* – 2006. – **20**. – P.2384–2386.
30. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // *J. Biomed. Sci.* – 2003. – **10**. – P.228–241.
31. McMaster M.T., Librach C.L., Zhou Y. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts // *J. Immunol.* – 1995. – **154**. – P.3771–3778.
32. Meirelles Lda S., Fontes A.M., Covas D.T., Caplan A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – **20**. – P.419–427.
33. Meisel R., Zibert A., Laryea M. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation // *Blood*. – 2004. – **103**. – P. 4619–4621.
34. Mellor A.L., Munn D.H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – **4**. – P. 762–774.
35. Muller A.J., Prendergast G.C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2007. – **7**. – P. 31–40.
36. Munn D.H., Mellor A.L. IDO and tolerance to tumors // *Trends Mol. Med.* – 2004. – **10**. – P. 15–18.
37. Nasef A., Chapel A., Mazurier C. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells // *Gene Exp.* – 2007. – **13**. – P.217–226.
38. Nauta A.J., Fibbe W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells // *Blood*. – 2007. – **110**. – P.3499–3506.
39. Oh J.Y., Kim M.K., Shin M.S., Lee H.J., Ko J.H., Wee W.R., Lee J.H. The anti-inflammatory and antiangiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury // *Stem Cells*. – 2008. – **26**. – P.1047–1055
40. Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C., Koutala H., Marsh J.C., Boumpas D.T., Eliopoulos G.D. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // *Blood*. – 2002. – **99**. – P.1610–1619.
41. Papadaki H.A., Tsagournisakis M., Mastorodemos V., Pontikoglou C., Damianaki A., Pyrovolaki K., Stamatopoulos K., Fassas A., Plaitakis A., Eliopoulos G.D. Normal bone marrow hematopoietic stem cell reserves and normal stromal cell function support the use of autologous stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis // *Bone Marrow Transplant.* – 2005. – **36**. – P.1053–1063.
42. Parekkadan B., Milwid J.M. Mesenchymal stem cells as

- therapeutics // *Annu Rev Biomed. Eng.* – 2010. – **12**. – P.87–117.
43. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999. – **284**. – P.143–147.
 44. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circulat. Res.* – 2004. – **36**. – P.95–99.
 45. Ra J., Kang S., Shin S. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells // *J. Transl. Med.* – 2011. – **9**. – P.181–198.
 46. Ra J.C., Shin I.S., Kim S.H., Kang S.K., Kang B.C., Lee H.Y., Kim Y.J., Jo J.Y., Yoon E.J., Choi H.J., Kwon E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans // *Stem Cells Dev.* – 2011. – **20**. – P.1295–1296.
 47. Rasmuson L., Ringd N.O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms // *Exp. Cell Res.* – 2005. – **305**. – P.33–41.
 48. Ren G., Zhang L., Zhao X. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Cell Stem. Cell.* – 2008. – **2**. – P. 141–150.
 49. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C., Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Stem Cells.* – 2008. – **2**. – P.141–150.
 50. Ren G., Su F., Zhang L. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression // *Stem Cells.* – 2009. – **27**. – P.1954–1962.
 51. Ristich V., Liang S., Zhang W. Tolerization of dendritic cells by HLA-G // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – **35**. – P.1133–1142.
 52. Rouas-Freiss N., Marchal R.E., Kirszenbaum M. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P.5249–5254.
 53. Sato K., Ozaki K., Oh I. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells // *Blood.* – 2007. – **109**. – P.228–234.
 54. Selmani Z., Naji A., Zidi I., Favier B., Gaiffe E., Obert L., Borg C., Saas P., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., Carosella E.D., Deschaseaux F. Epub 2007 Oct 11. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells // *Stem. Cells.* – 2008. – **26**. – P.212–222.
 55. Si Y.L., Zhao Y.L., Hao H.J., Fu X.B., Han W.D. MSC: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns // *Ageing Res Rev.* – 2011. – **10**. – P.93–103.
 56. Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C., Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2 // *Blood.* – 2008. – **111**. – P.1327–1333.
 57. Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms // *Science.* – 1992. – **258**. – P. 1898–1902.
 58. Togel F., Weiss K., Yang Y., Hu Z., Zhang P., Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2007. – **292**. – P.1626–1635.
 59. Uytendove C., Pilotte L., Theate I. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase // *Nat. Med.* – 2003. – **9**. – P. 1269–1274.
 60. Xi-Ping Huang, Ph.D. Zhuo Sun M.D., Yasuo Miyagi M.D., Heather McDonald Kinkaid, MSc Li Zhang M.D., PhD Differentiation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Induces Immunogenicity and Limits Their Long-Term Benefits for Myocardial Repair // *Circulation.* – 2010. – **122**. – P.2419–2429.
 61. Yasez R., Lamana M.L., Garcta-Castro J., Colmenero I., Ramtrez M., Bueren J.A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease // *Stem Cells.* – 2006. – **24**. – P.2582–2591.
 62. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy // *Blood.* – 2005. – **106**. – P.1755–1761.
 63. Zhang M., Mal N., Kiedrowski M., Chacko M., Askari A.T., Popovic Z.B., Koc O.N., Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction // *FASEB J.* – 2007. – **21**. – P.3197–3207.

Т.В. Рибальченко М.Е. Дзержинський, С.М. Опанасенко, В.К. Рибальченко

Конденсаторна теорія збудження – провісниця мембранології (до 140-річчя Василя Юрійовича Чаговця)

Дія електрики (термін введений У. Гільбертом на початку 17 ст. [9] від древньогрецької назви бурштину – електрон) на живі організми відома з давніх часів. У 1791 р. побачила світ перша наукова книга про «живу електрику» Л. Гальвані «Трактат про сили електрики при м'язових рухах» [4, 9]. А. Вольта першим встановив, що подразнювальна дія при розрядці конденсатора тим слабша, чим менша ємність конденсатора. А чим менша ємність конденсатора, тим більший потенціал повинен мати його заряд, щоб подразнювати [2, 4]. У 1834 р. став відомим феномен Пельтьє, суть якого полягає в тому, що частина органа, через яку входить електричний струм, стає електропозитивною відносно тієї частини, через яку він виходить [3]. У 1848 р. Е. Дюбуа-Реймон, застосувавши вперше неполяризувальні електроди, встановив, що при пропусканні через нерв постійного електричного струму біля електродів змінюється потенціал: там, де струм входить у нерв, з'являється позитивний потенціал, а там, де він виходить, виникає негативний потенціал. Це явище автор назвав фізичним електротонем [3]. Він також показав, що струм тим сильніше подразнює нерв, чим швидше він зростає [2]. Ця його властивість дістала назву закону Дюбуа-Реймона. Пізніше Е. Пфлюгер уточнив, що в дії електричного струму на тканини потрібно розрізняти його силу та напрям не лише в момент замикання та розмикання, а й під час «спокійного» проходження струму

по тканині. Він же звернув увагу на полярну дію струму: подразнення і підвищена подразливість спостерігаються під катодом (місце виходу струму із тканини), а під анодом навпаки, подразливість знижується [2].

Про те, що живі тканини можуть не тільки проводити, а й самі виробляти електрику стало відомо з дослідів Нобілі у 1827 р. А ще через 10 років К. Маттеучі показав, що такий струм при відведенні його, наприклад, від печінки та шлунка, завжди слабшає при припиненні кровопостачання цих органів. Ці відкриття викликали великий інтерес учених. У цьому відношенні важливих успіхів досягли: І. Мюллер, Г. Гельмгольц, Е. Дюбуа-Реймон, Е. Пфлюгер, Ж. Пельтьє та інші дослідники того часу [1, 2, 4], праці яких заслуговують на окремий історико-науковий аналіз. Але лише В.Ю. Чаговцю в кінці позаминулого століття судилося позбавити таємничості біоелектричні явища, відкривши їх матеріальну основу та встановити, що електрорушійні сили у тканинах є наслідком фізико-хімічної дифузії іонів [11–13].

Довівши, що електричні явища у різних організмах можна пояснити з точки зору власної дифузійної теорії походження біоелектричних потенціалів [14, 15], В.Ю. Чаговець намагався застосувати свою теорію для пояснення механізмів виникнення і поширення нервового імпульсу [15]. У другому випуску своєї монографії [15, 30], яка має назву «Електрофізіологія нервного процесу»

© Т.В. Рибальченко М.Е. Дзержинський, С.М. Опанасенко, В.К. Рибальченко

са», та у інших працях [16, 32] автор аналізує важливі фізіологічні процеси з точки зору іонної теорії електрогенезу. Він ставив перед собою мету «проследить, какаая аналогия и зависимость существует между законами, связующими между собой физические процессы, совершающиеся внутри живой ткани при прохождении через нее электрического тока, – с одной стороны, и явления физиологического возбуждения, – с другой».

Пізніше було встановлено, що для подразнення електричним струмом тканини важливим є не тільки різка зміна сили струму, а й час, протягом якого струм проходить по живій тканині. Чим коротший час, тим більша сила струму потрібна для подразнення. А при надзвичайно коротких інтервалах дії струму будь-яка його сила не викликає подразнення. Усі ці закономірності стосуються як постійного струму, так і розряду конденсатора. Проте усі вони були емпіричними, природа ж їх лишалася нез'ясованою аж до перших праць В.Ю. Чаговця, у яких він пов'язав електрофізіологію з фізичною хімією [11–15].

Вихідною концепцією В.Ю. Чаговця стали відомі у фізичній хімії механізми проходження електричного струму через вологі провідники: рух катіонів до катода й аніонів до анода та їх концентрування на відповідних полюсах [13, 14, 26]. На цій підставі вчений вважав, що такі процеси обов'язково повинні бути пов'язані з фізіологічним збудженням. Таке концентрування іонів на відповідних полюсах викликає виникнення поляризаційних струмів, що мають зворотний напрямок порівняно з тими струмами, які проходять через провідник. Ці поляризаційні явища, за В.Ю. Чаговцем, і пояснюють різні фізіологічні феномени, які відбуваються в тканинах (що є різновидом вологого провідника) під впливом електричного струму – універсального подразнювача збудливих тканин [24, 26]. На відміну від своїх сучасників (Ж. Леб, В. Нернст, А. Гілл), які вважали головним подразнювальним фактором зміну концентрації іонів на границях фаз у тканинах, В.Ю.

Чаговець визнавав подразнювальну дію за електричними зарядами, які поляризують мембрани та втрачають вільне проходження за тими самими законами, як і заряди конденсатора.

В.Ю. Чаговець наголошував, що, на відміну від гомогенних вологих провідників, у яких іони вільно рухаються вздовж шляху від одного електрода до іншого, у живих тканинах такому рухові «заважають» напівпроникні мембрани. Тому на мембранах іони накопичуються, тобто поляризують їх. Цей процес, за його переконаннями, мав основне значення для подразнення живої тканини, тобто для виникнення збудження [17, 33]. У тезах доповіді на II Всесоюзному з'їзді фізіологів [17] він писав: «электрический ток действует возбуждающим образом на живую ткань благодаря конденсаторному отложению ионов на полупроницаемых перепонках» (мембранах) всередині живої тканини.

І дійсно, накопичення на плазматичній і внутріклітинних мембранах іонів, що призводить до внутрішньої поляризації біологічних структур, мають багато спільного з явищами, які відбуваються при зарядці конденсаторів [17, 20, 23]. Ці процеси можна виразити формулою:

$V = E (1 - e^{-t/CR})$, де V – потенціал конденсатора, або електрорушійна сила (е.р.с.) тканини, E – е.р.с. батареї, з якою з'єднані обкладки конденсатора, або повна е.р.с. поляризувального струму (у випадку тканин – подразнювального струму), t – час від початку зарядки конденсатора, або від початку поляризації тканини, C – ємність конденсатора, або поляризаційна ємність тканини, R – опір електричного ланцюга, e – основа натурального логарифма. Виходячи з такого порівняння і аналізу формули, В.Ю. Чаговець вважав, що явище внутрішньої поляризації має основне значення для процесів подразнення тканини, тобто для виникнення збудження [17, 23].

Як автор конденсаторної теорії збудження В.Ю. Чаговець вважав, що значення V виражає величину поляризації і є силою

збудження (при замиканні струму), а значення E є напругою подразнювального струму. На думку автора, подразнювальна дія електричного струму залежить від накопичення на мембрані позитивних іонів H^+ , тобто тих іонів, яким він надавав вирішального значення у виникненні біоелектричних потенціалів [14, 24, 27, 29]. При замиканні струму катіони рухаються до катода, а при розмиканні – до анода під впливом поляризаційного струму. Таким перерозподілом іонів і зумовлена фізико-хімічна природа явища, узагальнена полярним законом Пфлюгера [21]. Згідно з цим законом, збудження виникає на катоді при замиканні постійного струму, а при розмиканні – на аноді.

Завдяки В.Ю. Чаговцю стало можливим пояснити поляризаційними процесами і закон Дюбуа-Реймона, за яким при постійній силі струму подразнювальна його дія виникає лише в момент замикання чи розмикання струму [22]. За В.Ю. Чаговцем, при замиканні постійного струму відбувається швидко накопичення на полюсах протилежно заряджених іонів і виникає струм поляризації. Тому сила подразнювального струму знижується. При подразненні постійним струмом великої сили рухового нерва скорочення м'яза, який ним іннервується, є постійним тому, що е.р.с. подразнювального струму перевищує максимально можливу силу поляризаційного струму [16]. Таким чином, В.Ю. Чаговець виходив з того, що головною дією електричного струму на живу тканину є її поляризація і зарядка тканинних (мембранних) «конденсаторів». Тому свою теорію подразнення автор правильно називав конденсаторною.

За конденсаторною теорією, відновлення вихідного стану живої тканини після її подразнення потребує деякого часу, достатнього для розрядки тканинного конденсатора, тобто для деполяризації тканини. З приводу цього принципового постулату своєї теорії В.Ю. Чаговець писав: «Если через данную ткань был пропущен электрический ток, вызвавший эффект возбуждения, т.е. сопровождавшийся

конденсаторным отложением некоторого количества ионов у электродов, то тем самым внутри ткани созданы условия, ослабляющие или совсем прекращающие сам ток. Поэтому понятно, что если мы вторично желаем получить от замыкания этого тока прежний эффект, то должны выждать некоторое время, необходимое для того, чтобы внутри ткани произошла деполяризация, то есть разряжение тех конденсаторно заряженных ионами образований ..., зарядение которых ионами вызвало эффект возбуждения. Время, необходимое для разряжения ..., так же как и время для зарядения, могло бы быть вычислено по формуле разряжения конденсаторов, если известна поляризационная емкость ее и сопротивление для возникающего при разряжении поляризационного тока». Ця цитата є свідченням суті конденсаторної теорії про механізми подразнення і роль фактора часу між окремими стимулами, яка проводиться В.Ю. Чаговцем в різний час і у різних працях [10, 18, 19, 21–23]. Тобто, він першим розвинув обґрунтовану законами фізичної хімії теорію, в якій час має конкретне значення: це час, який необхідний для зарядження мембранного конденсатора до певного потенціалу. Аналогічним чином В.Ю. Чаговець пояснив і період неподразнювальності нерва, який триває після першого подразнення – рефрактерний період. Він розглядав його як час, протягом якого поляризаційна ємність нерва знижується, і він деполяризується. Тобто, друге подразнення може збуджувати нерв лише в тому разі, коли зникне його поляризація, викликана першим подразненням.

Зі своєї «конденсаторної» точки зору В.Ю. Чаговець першим пояснив і незбудливість живих тканин до змінних струмів високої частоти (д'Арсонваля, Тесла) і явища песимуму подразнення, відкритого Введенським [22]. Він однозначно довів, що сильні та часті подразнення тому малоефективні, що за короткий час між окремими стимулами не встигають розрядитися поляризаційні напруги, тобто нерв не встигає деполяризуватися. З

урахуванням сучасних уявлень, що песимум створюється не у нерві, а у нервовому закінченні (як окремій структурі нерва), і що поляризація останнього відіграє важливу роль у збудженні нерва [1, 2], то і цю думку В.Ю. Чаговця теж слід вважати пріоритетною.

Розглядаючи подразнення як зарядку конденсатора, В.Ю. Чаговець прискіпливо аналізує експерименти і теорії його сучасників – Цибульського, Заньетовського, Германа, Гоорвега, Вейсса [1, 15, 17, 22] і робить висновок, що усі ці дані узгоджуються з його конденсаторною теорією. У подальших розробках цього питання через багато років у тезах доповіді на VI Всесоюзному з'їзді фізіологів він писав «Формула раздражения Нернста и другие формулы раздражения (Вейсса, Гоорвега и др.) являются лишь частным случаем конденсаторной формулы раздражения» [19]. Прикладом цього є порівняння подразнювальної дії розряду конденсатора за формулами Чаговця і Гоорвега. Коли нерв подразнюють зарядом конденсатора, то, на думку В.Ю. Чаговця, заряджається поверхня нервового волокна (плазматична мембрана) і можна записати: $PC = XC + XU$, де P – потенціал, C – ємність конденсатора, X – напруга (е.р.с), U – поляризаційна ємність нервового волокна. За формулою Гоорвега аналогічний процес описується як: $P = aR + v/C$, де R – опір загального ланцюга розряду конденсатора, а i в - константи, що характеризують подразнювальний об'єкт, а P і C – те саме, і у формулі В.Ю. Чаговця. Поділивши обидві половини формули Чаговця на C ($P = X + XU/C$) і прийнявши, що $X = aR$, а $XU = v$, отримаємо формулу Гоорвега [21, 23]. Тобто, використовуючи точку зору В.Ю. Чаговця, можна зрозуміти емпіричні константи формули Гоорвега: $a = X/R$ – е.р.с. поляризації нерва, яка створюється розрядом конденсатора, а $v = XU$ – добуток потенціалу поляризації на її ємність є кількістю електрики.

Ще у 1906 р. у своїй монографії В.Ю. Чаговець [15] глибоко проаналізував явище фізичного електротону, відкритого Е.

Дюбуа-Реймоном [1–3], механізми якого на той час були невідомими. Відомостей про біохімію м'язів і нервів було мало, а знання про зв'язок хімічних перетворень у тканині з явищами збудження були відсутні. Існували лише припущення про участь фосфорної кислоти в хімічних перетвореннях у клітинах і що вугільна кислота є кінцевим продуктом окиснювальних процесів. Тому В.Ю. Чаговець і висловив припущення, що іони H^+ , які утворюються при дисоціації цих двох кислот, і зумовлюють явище електротону [22, 23]. Електрогенна дія іонів H^+ у подразненій ділянці тканини в ділянці катода сумується з ефектом поляризації, що залежить від переміщення іонів під впливом поляризувального струму. Це і призводить до уявного зменшення поляризаційної ємності (мембран) – до виникнення електротону. Важливо, що В.Ю. Чаговець уперше припустив участь процесів обміну речовин у явищах електротону. Хоч цей висновок він висловив 100 років тому, і уже в першій половині минулого століття знання про електротон значно розширилися [1–3], принципова основа його поглядів на природу фізичного електротону залишається пріоритетною.

Основні ідеї монографій В.Ю. Чаговця 1903 і 1906 рр. стосуються не тільки електрогенезу та конденсаторної теорії збудження, а й геніальних припущень про проведення збудження [14, 15]. Його передачу від однієї ділянки до іншої він уявляв як результат явищ біофізичного та біохімічного характеру. За В.Ю. Чаговцем проведення збудження є поширенням поляризаційного заряду вздовж тканини – біофізичний процес. Що ж до біохімічних процесів, то вони впливають на фізичні властивості нерва (мембрани), викликаючи такі молекулярні зміни (у т.ч. і процеси розпаду з утворенням кислот), які необхідні для виникнення струмів дії [11–13, 24]. Конденсаторній теорії В.Ю. Чаговця притаманна універсальність щодо різних фізіологічних явищ. Прикладом цього є пояснення основного психофізичного закону

Вебера–Фехнера (співвідношення між силою подразнення органів чуття і викликаними відчуттями: відчуття пропорційне логарифму подразнення). Уже в перших своїх працях [12, 13, 25] В.Ю. Чаговець писав [31], що у збудженій тканині утворюються сполуки, які легко дисоціюють (вуглецева кислота), що призводить до виникнення концентраційного струму, е.р.с. якого пропорційна концентрації іонів. Тому і фізіологічний ефект збудження, і відчуття повинні зростати пропорційно логарифму подразнення [25], як цього і вимагає закон Вебера–Фехнера.

Основи теорії подразнення Чаговця були надруковані у 1896–1898 рр. [11–13], але північне положення в науці зайняла іонна теорія Нернста, опублікована пізніше без посилань на праці В.Ю. Чаговця [36, 37]. За останньою (без будь-яких дискусій з В.Ю. Чаговцем), головним подразнювальним фактором електричного струму є зміна концентрації іонів, яка викликається струмом, на межі поділу фаз у тканині. Тобто, головним є концентрація іонів, які могли частково дифундувати за концентраційним градієнтом, незважаючи на наявність електричного поля. В.Ю. Чаговець у процесах подразнення головного значення надавав поляризаційному потенціалу [20, 23]. Ця точка зору в кінці 20-х років минулого століття починає набувати універсального значення: подразнення нерва електричним струмом відбувається в результаті поляризації протоплазматичної мембрани подразнювальним струмом. Подальшому розвитку вчення про механізми подразнення наука завдячує цілій плеяді зарубіжних і вітчизняних дослідників 20–30-х років минулого століття, хоч ніхто із них належним чином не оцінив і не посилався на роботи В.Ю. Чаговця.

Показовим негативним прикладом цього є, наприклад, роботи У. Еббеке [34], який розробив конденсаторну теорію збудження майже через десятиріччя після виходу перших праць В.Ю. Чаговця [12, 13, 31], не зіславшись на жодну з них. Аналогічним прикладом є і двотомник з фізіології нервів

Р. Лоренте де Но [35], в якому без посилань на праці В.Ю. Чаговця аналізуються проблеми електротону, поляризації нерва, роль вугільної кислоти тощо. Навіть П.П. Лазарев у своїй монографії [5, 6] писав: «Современная теория растворов (це теорія Арреніуса, яку першим щодо електричних явищ тканин застосував В.Ю. Чаговець) открыла новую эру в области учения о возбуждении. Пионерами в этом деле явились Нернст и Леб». Висловлюючи свою думку про застосування іонної теорії щодо трактовки закону Вебера–Фехнера, П.П. Лазарев не згадує жодної роботи В.Ю. Чаговця, хоч перша з них опублікована ще у 1896 р. [12]. І лише значно пізніше у книзі про історію біофізики в Росії і СРСР [6, 7] П.П. Лазарев згадує про іонну теорію біоелектрогенезу Чаговця, замовчуючи при цьому конденсаторну теорію збудження. На противагу такому замовчуванню досягнень В.Ю. Чаговця слід відмітити і думку І.П. Павлова, висловлену ним у відгуку (на жаль, вчасно не опубліковану [8]) на працю «Очерк электрических явлений на живых тканях ...». У цьому відгуку він, зокрема, писав, що В.Ю. Чаговець «является одним из первых, выступивших на путь обсуждения и обследования электрофизиологических явлений с точки зрения современной физической химии», про його «огромный труд, охвативший ... электрофизиологию», що його дослідження «внушительно и убедительно склоняют читателя в сторону его теории исследуемых явлений».

Таким чином, В.Ю. Чаговцю належить пріоритет у розробці іонної теорії біоелектрогенезу та конденсаторної теорії збудження. Своєрідний і самостійний, принципово новий напрям у фізіології – застосування фізико-хімічних теорій, законів і методів для вирішення електрофізіологічних проблем. Ідеї, висловлені студентом-медиком В.Ю. Чаговцем ще у 1896 р. і які він розвивав усе своє життя, незважаючи на їх невинуваті замовчування (чи ігнорування) окремими зарубіжними дослідниками та співвітчизни-

ками, отримали у наш час достойне визнання. Півстолітні дослідження В.Ю. Чаговця і результати його наукових праць свідчать, що він є одним із основоположників фізико-хімічної біології і одного з основних її розділів – мембранології.

Василь Юрійович Чаговець народився 18 квітня 1873 р. на хуторі Патичиха (біля с. Заруддя), Роменського повіту, Полтавської губернії у сім'ї землеміра та вчительки жіночої гімназії. Середню освіту здобув у Другій Київській гімназії, після закінчення якої з золотою медаллю вступив до Петербурзької Військово-медичної Академії (1892–1897 рр.). У 1896 р. студент-медик В.Ю. Чаговець робить першу свою доповідь «О применении теории Аррениуса к электромоторным явлениям на живых тканях» спочатку на засіданні хімічного товариства при Петербурзькому університеті, а потім і на наукових зборах клініки душевних і нервових хвороб академії. У 1896–1898 рр. опублікував тези і три перші статті за результатами своїх досліджень у часописах: «Ж. Русск. физико-химического общества», «Zitschr. fur physikalische Chemie» і «Неврологический вестник». З листопада 1887 по 1900 рр. В.Ю. Чаговець – молодший лікар резервного піхотного Лукського полку (біля Варшави). Після служби в армії він продовжує працювати за сумісництвом (через відсутність вакансії) в лабораторії кафедри фізіології Академії, якою керував уже І.П. Павлов, і одночасно працює у лабораторії І.П. Павлова, досліджуючи функцію органів травлення. Офіційна його робота в цей період – міністерство фінансів. Після захисту докторської дисертації (1903) В.Ю. Чаговець призначається прозектором Петербурзького жіночого медичного інституту і приват-доцентом Військово-медичної академії. В цей час він проводить інтенсивну не тільки наукову, а й педагогічну діяльність. У 1906 р. друкується друга частина його монографії, присвячена електричним явищам нервів,

м'язів, залоз, органів риб і рослин. У цій монографії він вперше виступив зі своєю конденсаторною теорією подразнення електричним струмом. У 1909 р. В.Ю. Чаговець обраний професором кафедри фармакології Томського університету й аналогічної кафедри Харківського університету. Віддаючи переваги батьківщині, він переїжджає до Харкова, у 1910 р. – до Києва, працює на посаді екстраординарного професора, а з 1913 р. ординарного професора і завідувача кафедри фізіології Київського університету. У зв'язку з реорганізацією університету він переходить до Київського медичного інституту, де керує кафедрою фізіології з 1921 р. по 1935 р. З 1936 р. В.Ю. Чаговець завідує кафедрою фізіології Другого Київського медичного інституту. В київський період своєї діяльності В.Ю. Чаговець проводив велику лекційну діяльність не тільки за місцем основної роботи, а й на Вищих жіночих курсах і агрономічному відділенні Київського політехнічного інституту, у ветеринарному, зоотехнічному і стоматологічному інститутах. У Київському інституті гігієни праці і профзахворювань організував фізіологічну лабораторію. У 1939 р. В.Ю. Чаговець був обраний дійсним членом Академії УРСР. Помер В.Ю. Чаговець 19 травня 1941 р.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабский Е.Б. Василий Юрьевич Чаговец // Изб. тр. в одном томе. – К.: Изд-во АН Украины. – 1957. – Вып. 1. – С. 5–42.
2. Воронцов Д.С. В.Ю. Чаговец – основоположник современной электрофизиологии. – К., Вид-во Київ. ун-ту ім. Т.Г. Шевченка, 1957. – 52 с.
3. Воронцов Д.С., Шуба М.Ф. Физический электротон нервов и мышц. – К.: Наук. думка, 1966. – 214 с.
4. Гальвани и Вольта / Избр. работы о животном электричестве. – М.: Биомедгиз, 1937. – 430 с.
5. Лазарев П.П. Ионная теория возбуждения. - М. - Петроград: Гос. изд-во, 1923. – 173 с.
6. Лазарев П.П. Сочинения. В 3х т. Изд-во АН СССР, 1950. – Т.1-3. – 1808 с.
7. Лазарев П. П., Павлов П. П. «Биофизика: Сб. статей по истории биофизики в СССР». Моск. об-во испытателей природы. К 135-летнему юбилею (1805—1940), юбилейное издание. – М.: Типография Известий, 1940. – 76 с.

8. Лебединский А.Н., Мозжухин А.С. И.П. Павлов о работах В.Ю. Чаговеца [по вопросам электрофизиологии] // Физиол. журн. СССР. – 1953. – **39**, №2. – С.250–256.
9. Рибальченко В.К., Конотопець Н.І. Жива електрика. - К.: Рад. школа, 1990. – 174 с.
10. Сеченов И.И. О поглощении углекислоты солевыми растворами и кровью. – СПб.: Изд-во Л.Ф. Пантелеева, 1879. – 162 с
11. Чаговец В.Ю. О применении теории диссоциации Аррениуса к электрическим явлениям на живых тканях. Докл. в заседании хим.отд. Русского физ.-хим. об-ва / В.Ю. Чаговец // Журн. русск. физико-хим. об-ва. – 1896. – **28**, Вып. 5 – С. 431–432.
12. Чаговец В.Ю. О применении теории диссоциации Аррениуса к электрическим явлениям на живых тканях // Там же. – Вып. 7 – С. 657–663.
13. Чаговец В.Ю. О применении теории диссоциации растворов электролитов Аррениуса к электрофизиологии // Неврол. вестн., 1898. – **6**, Вып. 1. – С. 173–183.
14. Чаговец В.Ю. Очерк электрических явлений на живых тканях с точки зрения новейших физико-химических теорий. Дис. д-ра медицины / СПб.: Тип. Гл. упр. Уделова, 1903. – 315 с.
15. Чаговец В.Ю. Очерк электрических явлений на живых тканях с точки зрения новейших физико-химических теорий. Электрофизиология нервного процесса. – СПб. - 1906. – Вып. 2. – 168 с.
16. Чаговец В.Ю. О тормозящем действии прерывистого гальванического тока на центральную нервную систему // Обзор. психиатрии, неврологии и эксперим. психологии. – 1906. – №1. – С.18–34.
17. Чаговец В.Ю. О теориях возбуждения живых тканей электрическим током. – В кн.: Тр. I Всесоюз. съезда физиологов. – Л., 1926. – С. 39.
18. Чаговец В.Ю. Конденсаторная теория возбуждения и внутренняя поляризация тканей. – В кн.: Докл. VI Всесоюз. съезда физиологов. – Л., 1937. – С. 806–807.
19. Чаговец В.Ю., Нови В.А. Видозміни прихованого періоду м'язів і швидкості проведення збудження по нерву у жаби при змінах температури і стомленні. – У кн.: III Укр. з'їзд фізіологів, біохіміків і фармакологів. – К., 1939. - С. 108.
20. Чаговец В.Ю. Аналогия между зарядением конденсаторов и поляризацией. – В кн.: Избр. тр. в одном томе. – К.: Изд-во АН Украины. - 1957. – Вып.2. – С.318–319.
21. Чаговец В.Ю. Главнейшие явления, наблюдаемые при раздражении электрическим током живых тканей с точки зрения теории свободных ионов. – Там же. – С.319–339.
22. Чаговец В.Ю. Количественные отношения между различными факторами при раздражении живых тканей электрическим током. – Там же. – С. 339–367.
23. Чаговец В.Ю. Конденсаторная теория возбуждения и внутренняя поляризация живых тканей. – Там же. – С.504–505.
24. Чаговец В.Ю. О химическом источнике электрических токов в живых тканях. – Там же. – Вып. 1. – С. 130–151.
25. Чаговец В.Ю. Общий обзор сущности нервного возбуждения и проведения. Психофизический закон Вебера–Фехнера. – Там же. – Вып.2. – С.413–429.
26. Чаговец В.Ю. Прохождение электрического тока через влажные проводники и явления поляризации, происходящие при этом. – Там же. – С. 307–319.
27. Чаговец В.Ю. Электрические органы рыб. – Там же. – Вып. 1. – С. 273–293.
28. Чаговец В.Ю. Электрические явления в растениях. – Там же. – С. 294–304.
29. Чаговец В.Ю. Электромоторная деятельность желез. – Там же. – С. 254–273.
30. Чаговец В.Ю. Электрофизиология нервного процесса. – Там же. – Вып. 2. – С. 305–515.
31. Chagovets V. Yu. Anwendung elektrolytischen Dissociationstheorie von Arrhenius auf die elektrische Erscheinungen in lebenden Gewebe // Zeitschr. f. phys. Chemic. – 1897. – **23**, №1. – S. 558–559.
32. Chagovets V.Yu. Uber die erregende Wirkung des elektrischen Stromes auf das lebende Gewebe vom physikochemischen Standpunkt aus betrachtet // Pflüg. Arch. f.d. ges. Physiol. – 1908. – **125**. - S. 401–466.
33. Chagovets V.Yu. Uber die Rolle der semipermeablen Membranen bei Entstehung elektrischen Stromes im lebenden Gewebe. Zeitschr. F. Biol. – 1908. – **90**. – S. 247–280.
34. Ebbecke U. Uber das Gesetz der elektrischen Reizung, etc // Pflug. Arch.f.d.ges. Physiol. – 1927. - **216**. - S. 448–452.
35. Lorente de Nó, R. A study of nerve physiology. Studies from the Rockefeller Institute for Medical Research. - 1947. - Part I. 131. – S. 1-496, Part II. 132 – S. 1–548.
36. Nernst W. Zur Theorie des elektrischen Reizes // Pflüg. Arch f.d. ges. Physiol. – 1908. – **122**. –S. 275–304.
37. Nernst W. Zur Theorie der elektrischen Reizung // Nachr. Kgl. Ges. Wiss. Gött., Mathematisch-physikalische Klasse. – 1899. - № 1. - P. 104–108.

ННЦ «Ін-т біології» Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка
E-mail: taras_rybal@ukr.net

Матеріал надійшов
до редакції 18.03.2013

РЕЦЕНЗІЯ

на підручник «Фізіологія» для студентів вищих медичних закладів

за редакцією члена-кореспондента НАПН України професора В.Г. Шевчука

Україна має потужний науково-педагогічний потенціал фізіологів, який врешті-решт проявив себе виданням підручника «Фізіологія». Нагальна потреба, без перебільшення – вищих медичних навчальних закладів у сучасному підручнику з фізіології зріла давно і була реалізована групою провідних фізіологів на чолі з членом-кореспондентом НАПН України професором В.Г. Шевчуком.

Підручник повною мірою відповідає Програмі для вищих медичних закладів освіти України III-IV рівнів вивчення фізіології за кредитно-модульною системою відповідно до вимог Болонського процесу.

Підручник складається умовно з двох частин: загальна фізіологія та фізіологія вісцеральних систем організму і містить 14 розділів. Оригінальним є наведення перед кожним розділом короткої історичної довідки («Віхи історії») щодо науковців та вперше описаних ними структур і функцій у відповідному розділі.

Основним достоїнством підручника є те, що в ньому детально описані механізми функціонування, регулювання та інтегрування діяльності всіх головних систем організму людини, направлені на підтримання гомеостазу внутрішнього середовища. Особлива увага надається використанню результатів найновіших наукових досліджень для пояснення тієї чи іншої фізіологічної реакції. Він відображає всі сторони життєдіяльності людини, містить велику кількість клінічних прикладів про можливі функціональні зміни організму при патології.

У першому розділі наведено визначення фізіології як науки, її задачі та етапи розвит-

ку, наводяться дані про фізіологію збудливих структур, в яких відображені сучасні знання про будову й функції клітинних мембран, види і функції іонних каналів, рецепторний апарат мембрани, його значення, природу розвитку мембранних потенціалів та їх фізіологічну роль. Прекрасно представлений і повноцінно продемонстрований матеріал про проведення збудження нервовими волокнами через нервово-м'язовий синапс.

У наступному розділі «Біологічна регуляція» описані сучасні дані про контури біологічної регуляції за збуренням і відхиленням, регульовані параметри, роль негативного та позитивного зворотного зв'язку в контурі біологічної регуляції.

У третьому розділі подається матеріал про роль однієї з найскладніших структур тіла людини – ЦНС у регуляції рухових функцій. Поетапно подано класичні дані про рухові тіла системи спинного мозку, стовбура мозку, таламуса, базальних ядер, мозочка, моторних зон нової кори, їх організацію та механізми координації.

Уперше разом з класичною структурно-функціональною організацією симпатичного і парасимпатичного відділів автономної системи представлені новітні дані про організацію метасимпатичної нервової системи, її медіаторів та функцій. У цьому ж матеріалі викладені дані про центральне регулювання вісцеральних функцій та його інтегративні центри, вісцеральні рефлекси. Особлива увага надається гіпоталамусу, як центру автономної системи, його аферентним і еферентним зв'язкам у регуляції вісцеральних функцій.

Оригінально і на функціонально-системному рівні (четвертий розділ) описана гуморальна регуляція. Роль гормонів показана в чотирьох окремих фрагментах: 1) у регуляції процесів психічного і фізичного розвитку; 2) у регуляції гомеостазу; 3) у регуляції адаптації організму; 4) у регуляції статевих функцій.

У п'ятому розділі підручника описана фізіологія сенсорних систем. Слід відмітити сучасний рівень подачі матеріалу про фізіологічні основи болю. Вперше наводиться нова генна теорія, сучасні механізми опіатної і неопіатної антиноцицептивної захисної системи, фізіологічні механізми знеболювання.

У наступному розділі (вищі інтегративні функції) своєрідно висвітлені фізіологічні основи поведінки, сучасні механізми пам'яті, опис емоцій, цікаво представлені типи ВНД, мова та її функції, а також генетичний механізм її розвитку, взаємодія великих півкуль головного мозку, процеси мислення, представлені нові сучасні механізми сну.

Доктор медичних наук,
професор кафедри фізіології
Буковинського медичного університету

Фізіологія вісцеральних систем викладена в п'яти розділах: кров, кровообіг, дихання, обмін та терморегуляція, травлення, виділення. У цих розділах в класичній, і водночас цікавій формі подається характеристика зазначених систем, наводяться сучасні дані щодо особливостей їх функціонування.

Особливої уваги заслуговує і надає цінності підручнику супровід тексту великою кількістю ілюстрацій – оригінальних рисунків, схем та контурів регуляції фізіологічних процесів, що значно спрощує засвоєння поданих матеріалів, надає процесу навчання позитивного емоційного забарвлення.

Підручник «Фізіологія» за редакцією члена-кореспондента НАПН України професора В.Г. Шевчука є справді сучасним. За структурою та змістом, художнім оформленням та естетичним сприйняттям відповідає кращим світовим зразкам підручників з фізіології й тому буде корисним студентам, аспірантам, молодим викладачам і всім, кого цікавить фізіологія людини.

Ходоровський Г.І.

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



Віктор Григорович Шевчук
(до 75-річчя з дня народження)

Віктор Григорович Шевчук, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фізіології Національного медичного університету у травневі дні зустрів своє 75-річчя. Це одна з тих важливих подій у житті, коли пройдений шлях постає перед очима, коли минуле допомагає майбутньому.

Мріяв стати медиком, і спочатку закінчив Київське медичне училище №1, працював фельдшером, вступив до Київського медичного інституту, одержав диплом лікаря, але дуже приваблювала медична наука. Ще навчаючись в інституті захоплювався науковими дослідженнями. Дорога ж у велику науку у Віктора Григоровича розпочалася в Інституті геронтології в лабораторії видатного вчено-

го-фізіолога академіка Володимира Веніаміновича Фролькіса. Спочатку – аспірант, кандидат медичних наук, а потім – доктор медичних наук, старший науковий співробітник, професор. Згодом трудове життя було пов'язане з Інститутом удосконалення лікарів, де продовжував наукову діяльність, а з 1987 року В.Г. Шевчук очолив кафедру нормальної фізіології Київського медичного інституту ім. О.О. Богомольця.

Сьогодні професор В.Г. Шевчук – член-кореспондент НАПН України, висококваліфікований педагог, автор семи монографій (одна із них англійською мовою), 2 підручників, 2 навчальних посібників з нормальної фізіології, має понад 327 наукових праць з експериментальної кардіології, підготував і готує кандидатів медичних наук та докторів наук.

Напрямок наукових досліджень професора Віктора Григоровича та його учнів – вивчення молекулярних механізмів діяльності серця, тону судин та їх регуляції. Він неперевершений дослідник, автор багатьох експериментальних методик, його роботи з експериментальної кардіології мають не тільки теоретичне і практичне значення, а й міжнародне визнання.

Впродовж двох років Віктор Григорович був експертом Всесвітньої організації охорони здоров'я у Південно-Східній Азії.

Професор В.Г. Шевчук – талановитий науковець, чуйна і небайдужа людина, люблячий чоловік та батько, його шанують колеги, студенти.

Щиро вітаємо Вас, Вікторе Григоровичу, з днем народження, бажаємо здоров'я, щастя, нових творчих успіхів та довгих років життя.



Анатолій Іванович Гоженко
(до 65-річчя з дня народження)

Доктору медичних наук, професору, заслуженому діячу науки і техніки, відомому спеціалісту у галузі патологічної фізіології та профілактичної медицини, педагогу та організатору науки Анатолію Івановичу Гоженку виповнилося 65 років.

Народився ювіляр 13 лютого 1948 р. Після закінчення у 1972 р. Чернівецького медичного інституту вступив до аспірантури при кафедрі патологічної фізіології. Ще до закінчення аспірантури він був зарахований на посаду асистента цієї кафедри, і вже у 1976 р. успішно захищає кандидатську дисертацію. З 1980 по 1983 р. А.І. Гоженко виконує обов'язки, а у 1983 р. його обрано за конкурсом завідувачем кафедри патологічної фізіології Чернівецького медичного інституту. Він та очолювана ним кафедра активно працюють у галузі патофізіології нирок, і у 1987 р. Анатолій Іванович захищає докторську дисертацію «Енергетичне забезпечення основних ниркових функцій і процесів у нормі та при пошкодженні нирок». У ній були сформульовані принципово нові положення про механізми формування патології нирок.

У 1989 р. він переїздить до Одеси та працює завідувачем лабораторії Всесоюзного НДІ гігієни водного транспорту МОЗ СРСР (ДП «Український НДІ медицини транспорту» МОЗ України) до 1992 р. З 1992 до 1999 р. – заступник генерального директора з наукової роботи Українського науково-практичного об'єднання «Медицина транспорту», до складу якого увійшов інститут. У цей період остаточно формуються здібності Анатолія Івановича як організатора, науковця та педагога. Його зусиллями в Українському НПО «Медицина транспорту» починається активна наукова робота, до якої залучаються практичні лікарі, у тому числі і суднові лікарі. У 1992 р. А.І. Гоженку присвоюється вчене звання «професор», а у 1998 р. – почесне звання «Заслужений діяч науки і техніки України», його обирають експертом ВАК України зі спеціальності «Космічна, авіаційна та морська медицина». Але потяг до педагогічної діяльності, незважаючи на активну роботу з підготовки кадрів вищої кваліфікації, залишається нереалізованим повною мірою, тому у 1998 р. він починає працювати за сумісництвом професором кафедри патологічної фізіології Одеського державного медичного університету. У 1999 р. після відставки за станом здоров'я процесора Р.Ф. Макулькіна, він стає завідувачем кафедри. На цій посаді А.І. Гоженко продовжує втілювати у життя свої наукові ідеї. Значний досвід у практичній охороні здоров'я дозволив йому на III Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю вперше в Україні запропонувати новий розділ патофізіології – клінічну патофізіологію. За ініціативою А.І. Гоженко у 2002 р. були проведені I читання ім. В.В. Підвисоцького, присвячені річниці від дня народження засновника кафедри патологічної фізіології, що нині стали традиційними. За його пропозицією Одеський державний медичний університет разом з НАН України та Українським товариством патофізіологів у 2007 р. започаткували видання пам'ятної медалі В.В. Підвисоцького,

якою нагороджують видатних патофізіологів сучасності. За час роботи на кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького коло наукових інтересів Анатолія Івановича охоплює різні напрями медицини – загальну і клінічну патофізіологію, нефрологію, урологію, акушерство та гінекологію, гігієну, але пріоритетним напрямом його наукової роботи є фундаментальні дослідження нирок і водно-сольового обміну. А.І. Гоженко разом зі своїми учнями розробив цілу низку нових способів діагностики нирок, що успішно впроваджуються в лікувальних закладах України та країн СНД.

У травні 2004 р. Анатолія Івановича за результатами конкурсу Міністерства охорони здоров'я України призначено на посаду директора Державного підприємства «Український НДІ медицини транспорту».

Його праця дала відчутні позитивні наслідки – значно підвищилася роль інституту з методичного забезпечення практичних установ медицини транспорту, започатковані та видаються 2 наукові журнали – «Актуальні проблеми транспортної медицини» та «Вісник морської медицини», виконано і захищено 10 докторських і 18 кандидатських дисертацій, регулярно проводяться міжнародні наукові конференції, річний дохід інституту збільшився майже у 6 разів. Суттєво підвищився науковий авторитет інституту, який виборов у міжнародному конкурсі почесне право проведення в Одесі XI Міжнародного симпозіуму з морської медицини, в роботі якого взяли участь представники 42 країн світу.

Невичерпна енергія та безмежна широта наукових, педагогічних і організаційно-методичних інтересів щодо розвитку профілактичного напрямку організації охорони здоров'я знайшли відображення у 1150 публікаціях у вітчизняних і зарубіжних виданнях, 46 монографіях і навчальних посібниках, 61 винаходах і патентах. У монографіях, підготовлених ним у співавторстві, відображено сучасні наукові досягнення, серед них: «Гостра ниркова недостатність» (2003),

«Лекции по экспериментальной медицине» (20032), «Чума и пограничные карантинны» (2004);), навчальний посібник «Pathophysiology» (2007), «Гіпоксично-гіперкаптичні тренування у кардіології» (2007), «Вода и водно-обусловленные инфекции» (2008), «Профессиональные заболевания работников железнодорожного транспорта» (2009), «Патогенетичні та клінічні основи захворювань печінки» (2010), «Биологическое обоснование антипротеазной терапии гриппа» (2011), «Обеззараживание воды. Гигиенические и медико-экологические аспекты» (2011, 2012), «Вирусология» (2013).

Створена ним наукова школа складається з 18 докторів та 44 кандидатів наук, що на сьогодні працюють у наукових колективах України, Росії, Польщі, Канади, Індії.

До далеко не повного переліку нових, експериментально та клінічно доведених положень, запропонованих А.І. Гоженком, слід віднести: теорію превентивної регуляції водно-сольового обміну та принципи фізіологічно оптимального споживання води, обґрунтування ролі клінічної патофізіології у визначенні етіології професійних захворювань, формулювання нової парадигми хвороби та закономірностей розвитку патологічних процесів у нирках, доведено превалювання пошкодження проксимального відділу нефрону з пригніченням енергетичного обміну в механізмі первинної токсичної дії важких металів, обґрунтування терапевтичної ефективності антиоксидантів, енергопротекторів і донаторів азоту в лікуванні токсичних нефропатій, участь в обґрунтуванні протеазно-інгібіторної теорії патогенезу грипу.

За значний внесок у розвиток фундаментальної і прикладної медицини Всеросійський НДІ залізничної гігієни, Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я.Горбачевського та Буковинський державний медичний університет присвоїли йому звання «Почесний професор», він нагороджений пам'ятними медалями ім. В.В. Підвисоцького (Україна) та ім. А.Д. Сперан-

ського (Росія). А.І. Гоженко є членом експертної ради Атестаційної колегії МОН України зі спеціальності «патологічна фізіологія», членом редакційних колегій 12 вітчизняних та 3 зарубіжних наукових журналів (Болгарія, Польща, Росія).

За удосконалення медико-санітарної допомоги працівникам транспорту Міністерст-

во охорони здоров'я України призначило його головним позаштатним спеціалістом із дисципліни «суднова медицина» та нагородило Почесною грамотою, а Казахстану – знаком «Отличнику здравоохранения Республики Казахстан».

Щиро вітаємо ювіляра, бажаємо йому здоров'я, успіхів у реалізації творчих планів.

CONTENTS

R.B. Strutynskiy, V.S. Nagibin, N.A. Strutynska, O.R. Ianchii, A.A.Moibenko. Influence of focalin on development of apoptosis and necrosis at anoxia-reoxygenation of culture rats neonatal cardiomyocytes	3
S.V. Malysheva, G.V. Budash, N.M. Bilko, J. Hescheller. Cardiomyocyte differentiation of individual clones murine inductd pluripotent stem cells	10
M.B.Baskakov, A.S. Zheludeva, S.V. Gusakova, L.V. Smagly, A.N.Aleinik, P.I.Yanchuk, M.A. Medvedev, S.N.Orlo. Ionic mechanisms of carbon monoxide action on the contractile properties of smooth muscles of the blood vessels	18
A. Moskalyuk, S. Voytenko, S.Fedulova, N.Veselovsky. Changes in kinetics of calcium signals in response to high frequency stimulation in cultured hippocampal neurons	25
O.V. Dolga, N.Kh. Pogorela, O.S. Bogorad-Kobelska, N.M. Zholobak, S.O. Zanoza, S.A. Lyakhov, I.S. Magura. Effects of diphenyl derivatives on electrophoretic mobility of murine t lymphocytes	31
Andrey M. Puzyrenko, Ivan S. Chekman, Tetiana P. Kuftyreva, Nadija O. Gorchakova. The effect of amlodipine, bisoprolol on the myocardial ultrastructure of the hypertensive rats	39
I.V. Kharchuk, O. Andrukhova, V.K. Rybalchenko, O. Andrukhov. Mechanisms of nephrotoxicity of novel anticancer compound maleimide derivative MI-1	50
E.E. Kolesnikova, V.I. Nosar, L.V. Bratus. Pharmacological correction of experimental mitochondrial dysfunction of brain stem neurons by rhytmocor and mildronate	58
R.V. Yanko. The influence of normobaric hypoxia on the morphofunctional changes of thyroid gland in young rats	65
A. I. Bereznyakova, O.D. Jemela. Deformability of the erythrocytes membrane in rats of different age in hypoxia	72
Ye.Ju. Horokhovskiy, Ju.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko, I.Ye. Yurchuk. Functional state of the ileum, cationic peptids and zinc content in the paneth cells of the rats dollowing lincomycin, indomethacin and methotrexate andministration	78
L.G. Korobeynikova, M.Y. Makarchuk. Perception, processing of visual information and resistance to emotional stresses in athletes of different ages	89
A. Yashchenko, E. Vdovitchenko. The dynamic of annual modification of phasic structure of cardiac cycle in children of junior school age	97
T.V. Mamontova, M.V. Mikityuk, N.A. Bobrova, L.A. Kutsenko, L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev. The anti-inflammatory effect of fullerene c60 on adjuvant arthritis in rats	102
O.B. Dynnyk, V.A. Berezovsky, N.M. Kobyliak, I.G. Litovka, R.V. Yanko, L.N. Plotnikova. Determination of age-related liver stiffness changes in rats according to the ultrasonic shear wave elastography	111
S. Yu. Tsiporenko. Influence of hepatomax on male fertility	119

REVIEWS

N.I. Lisiany. Mesenchymal stem cells and immunological properties	126
---	-----

HISTORY OF SCIENCE

REVIEW

JUBILEE DATES