

Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 5 2014

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Шарінов Р.Р., Коцюруба А.В., Кон'як Б.С., Сагач В.Ф.</i> Індукція нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної ішемії–реперфузії головного мозку та її корекція екдистероном	3
<i>Маслак Г.С., Костюк О.В., Мінченко Д.О., Бразалук О.З., Шевцова А.І., Мінченко О.Г.</i> Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії NTU1 нейрамінідази та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію	14
<i>Портніченко В.І., Носар В.І., Гончар О.О., Опанасенко Г.В., Глазирін І.Р., Маньковська І.М.</i> Фазові зміни енергетичного обміну при адаптації до іммобілізаційного стресу	23
<i>Коломієць О.В., Данилович Ю.В., Данилович Г.В.</i> H^+ – Ca^{2+} -обмінник у мітохондріях міомеріа: модуляція екзо- та ендогенними сполуками	33
<i>Розова К.В., Сидоряк Н.Г.</i> Механізми змін мікроциркуляції у щурів при гострій метгемоглобінемії	43
<i>Бондаренко О.В., Гула Н.М., Макаруч М.Ю., Горідько Т.М., Коваленко О.А.</i> Вплив N-стеароїлетаноламіну на емоційність та здатність до навчання у щурів	52
<i>Насібян Л.С., Філіппов І.Б.</i> Модуляція скорочення міомеріа щурів пептидогліканом клітинної стінки золотистого стафілокока	62
<i>Котлярова А.Б., Мерлавський В.М., Дорош О.М., Манько В.В.</i> Роль мітохондріального уніпортера у підтриманні кальцієвого гомеостазу секреторних клітин слюзової залози	73
<i>Шпакова Н.М., Ніпот О.Є., Іщенко І.О., Прилуцька С.В., Богуцька К.І., Черепанов В.В., Сандомирський Б.П., Прилуцький Ю.І.</i> Вплив C_{60} -фулерену на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів людини	82
<i>Божкова Ю.О., Кірошка В.В., Гавас А.А., Бондаренко В.А.</i> Динаміка структурних змін оваріальної тканини при ішемії	89

<i>Manko A.M., Neporada K.S., Sukhomlyn A.A., Ghasemzadeh J., Beregova T.V., Yankovskiy D.S.</i> Experimental correction of metabolic changes in mouth at long-term hypoacidity by multiprobiotic «symbiter acidophilic»	99
<i>Величко Н.Ф.</i> Особливості гормонально-метаболічних змін у дорослих самців щурів за умов емоційного стресу під час молочного вигодовування	105

Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюрuba, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

Індукція нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної ішемії–реперфузії головного мозку та його корекція екдистероном

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: Egiptian77@gmail.com

*На моделі фокальної ішемії–реперфузії головного мозку досліджували індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів і можливі механізми протекторної дії екдистерону. Показано, що в цих умовах індукується активація конститутивного та індукцйного de novo синтезу NO внаслідок окиснення L-аргініну та неокисного реутилізаційного синтезу NO внаслідок відновлення його окиснених стабільних метаболітів. Вагомим доказом індукції нітрозативного стресу було значне зростання мітохондріальних пулів нітрат-, нітрит-аніонів і нітрозотіолів, що свідчить про утворення та розпад пероксинітриту – основного маркера розвитку нітрозативного стресу. Спостерігали також підвищення вмісту ключового регулятора de novo синтезу NO сірководню й активності індукцйної аргінази II та, як наслідок, пулу карбаміду. Попереднє введення тваринам рослинного екстракту *Serratula coronata*, збагаченого екдистероном, зменшує індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії–реперфузії.*

Ключові слова: фокальна ішемія–реперфузія головного мозку, цереброкардіальний синдром, мітохондрії серця, нітрозативний стрес, екдистерон.

ВСТУП

Згідно з офіційною статистикою, внаслідок мозкового інсульту в Україні щорічно помирає від 40 до 45 тис. осіб. Однією з найважливіших проблем сучасної неврології є терапія ускладненого перебігу ішемічного інсульту. Насамперед це стосується функціональних змін серцево-судинної системи в гострому періоді захворювання. Цю патологію можна розглядати не тільки як неврологічну, але і як мультидисциплінарну проблему, в якій серце і головний мозок мають два взаємопов'язаних аспекти: з одного боку – це інсульт, що розвивається в результаті захворювань серця, з іншого – кардіальна дисфункція при гострому його перебігу, яка сприяє ранній смертності хворих [1]. Ця дисфункція, або цереброкардіальний синдром, описана близько 60 років тому, і може

проявлятися в діапазоні від різних варіантів порушення серцевого ритму до розвитку гострого інфаркту міокарда [2]. Провідною ланкою розвитку цереброкардіального синдрому є гістотоксичне ураження міокарда внаслідок гіперкатехоламінемії, збільшується вхід Ca^{2+} в кардіоміоцити, в яких виникають вторинні морфофункціональні зміни («адреналіновий міокардит») [3]. Важливо, що при ішемії мозку мікроглія продукує токсичні прозапальні цитокіни, які збільшують набряк головного мозку, розмір інфарктної зони, а в серці – впливають на міокард через ендотеліальні клітини та кардіоміоцити [4]. Інтерлейкін-1 (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин (ФНП- α) та γ -інтерферон активують транскрипцію гена кальційнезалежної індукцйної NO-синтази (iNOS), що призводить до надлишкового синтезу оксиду азоту (NO) при ішемічному інсульті. Активація конститутивних NO-

© Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюрuba, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

синтаз (eNOS, nNOS), на відміну від iNOS, здійснюється транзиторно внаслідок підвищення внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} та активації протеїнкінази B, яка в свою чергу контролюється сфінгомієліновим сигнальним каскадом [5]. Останній здатний активуватися ФНП- α стероїдним гормоном кальцитриолом та його природним аналогом екдистероном [6].

Гіперкатехоламінове гістотоксичне ураження міокарда [7], токсичний вплив прозапальних цитокінів мікроглії мозку, доведений факт розвитку потужного оксидативного стресу в мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії [8] дає підстави припустити також можливий розвиток нітрозативного стресу при цереброкардіальному синдромі. Ще одне припущення стосується можливої участі в процесах, які відбуваються в мітохондріях міокарда біологічно активного газового трансмітера сірководню (H_2S), що відіграє суттєву роль як у фізіологічних реакціях, так і при розвитку багатьох патологічних станів. Сірководень інтенсивно синтезується в мітохондріях людини і тварин, бере участь в реакціях з активними формами кисню та азоту ($\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , ONOO^- , NO) [9], є важливим регулятором *de novo* синтезу NO [10, 11].

Екдистерон є природним аналогом гормональної форми вітаміну D_3 – кальцитріолу (1,25-дигідроксихолекальциферолу). Він здатний активувати не лише цитозольні так звані „ядерні” рецептори, запускаючи експресію багатьох відомих залежних від вітаміну D генів (у т.ч. мітохондріального Ca і NO -зв’язувального білка „calbindin D-28K”), але й активувати різні сигнальні системи (фосфатидилінозитольну, фосфатидилхолінову, сфінгомієлінову, холестеролову, аденілат- і гуанілатциклазні тощо), взаємодіючи з рецепторами плазматичних мембран клітин у серці і головному мозку щурів. Екдистерон здатний інгібувати як кальційзалежне, так і залежне від активних форм кисню (АФК) відкривання мітохондріальної пори [12], інгібує активність iNOS, нітратредуктази та аргінази II в мітохон-

дріях серця щурів, що було показано на моделі експериментального діабету 1-го типу [13].

Мета нашої роботи – дослідити скоординовані зміни маркерів нітрозативного стресу (активність iNOS, пулів нітрозотіолів і нітрат-аніона) та пулів H_2S , а також ефективність кардіопротекторної дії екдистерону у мітохондріях серця щурів за фокальної ішемії–реперфузії.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 280–320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Тварин поділили на чотири групи. До 1-ї (контрольної) групи ($n=8$), увійшли інтактні тварини. Щурам 2-ї групи моделювали фокальну ішемію–реперфузію ($n=8$, через 24 год, $n=5$, 3 тварини загинули). Тварини 3-ї і 4-ї (по 8 щурів) груп протягом 18 діб отримували екдистерон по 100 мкг/100 г на добу, з питною водою у вигляді препарату «Біоспон» (екстракт екдистерону з рослини *Serratula coronata*). Тваринам 4-ї групи після введення екдистерону оперативно моделювали фокальну ішемію–реперфузію.

Оскільки ішемічний інсульт часто викликається оклюзією середньої мозкової артерії або однієї з її гілок, для дослідження була обрана модель ізольованої оклюзії – МСАО (від англ. middle cerebral artery occlusion) [14]. Його відтворювали оперативним шляхом під наркозом (кетамін 75 мг/кг, внутрішньоочеревинно). У внутрішню сонну артерію вводили монофіламентний оклюдер 4/0 («Doccol corp.», США), який потрапляв у просвіт передньої мозкової артерії та блокував середню мозкову артерію. Оклюзію здійснювали протягом 60 хв, потім оклюдер видаляли. Після пробудження тварин перевіряли наявність фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку. Для цього щура утримували за хвіст на відстані 1–2 см від поверхні. У нормі щури симетрично витягують обидві кінцівки у напрямку до підлоги.

При наявності фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження визначається тонічна флексія контралатеральної передньої лапи. Тварин, у яких цей феномен не спостерігався, в дослід не брали.

Біохімічні показники визначали в мітохондріях серця контрольних тварин 1-ї і 3-ї груп, а також через 24 год фокальної ішемії–реперфузії у тварин 2-ї та 4-ї групи, що вижили, які виділяли після декапітації з тканин серця послідовним центрифугуванням гомогенату. Осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА та негайно заморожували. В ізольованих мітохондріях серця визначали показники, що характеризують метаболізм оксиду азоту (активність ферментів *de novo* і реутилізаційного шляхів його синтезу, пули стабільних метаболітів), ступінь розвитку нітрозативного стресу (мітохондріальні пули нітрозотіолів), активність аргінази, що конкурує за субстрат із синтазами NO, вміст сірководню.

Вивчали базальну активність ферментів *de novo* синтезу оксиду азоту. Активність кальційзалежних конститутивних (сNOS=eNOS+NOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацією класичного методу [15] та сучасної його модифікації [16], пристосованою до спектрофотометричного визначення одного з продуктів реакції L-цитруліну. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі. Вміст цитруліну вимірювали високочутливим колориметричним методом [17]. Активність НАДНФ-залежної нітратредуктази, що характеризує інтенсивність неокисного реутилізаційного синтезу NO, вивчали за зменшенням вмісту нітрат-аніона в інкубаційному середовищі [18], аргіназну – стандартним методом за утворенням карбаміду в інкубаційній суміші, що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс-HCl (фірма “Calbiochem”) буфері (pH 8,0) [19], вміст карбаміду – колориметричним монооксимним методом у безбілкових розчинах за допомогою добірки

реактивів фірми «Філісіт-Діагностика», м. Дніпропетровськ, Україна. Мітохондріальні пули нітрит-аніона досліджували за допомогою реактиву Гріса [20], нітрат-аніона – за допомогою бруцину фірми «Sigma», США [21], а вміст високо- і низькомолекулярних нітрозотіолів – за методом Saville [22], суть якого полягає у вивченні вмісту додаткового нітрит-аніона після гідролізу S–NO-зв'язку катіонами двовалентної ртуті. Для визначення вмісту H_2S , до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при 37°C протягом 10 хв, потім додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N,N-DPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine, «Sigma», США) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Після цього в темноті на холоді вимірювали оптичну густину при $\lambda=670$ нм [23]. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій вимірювали за методом Лоурі [24].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мітохондріальна NOS кардіоміоцитів, локалізована у внутрішній мембрані мітохондрій, продукує як оксид азоту за наявності аргініну, так і супероксидний аніон-радикал ($\cdot O_2^-$) – за дефіциту аргініну або кофактора тетрагідробіоптерину. NO в низьких концентраціях, як і АФК, є фізіологічним модулятором в мітохондріях, що регулює споживання кисню, синтез аденозинтрифосфату і транспорт Ca^{2+} . Надмірне ж накопичення активних форм азоту (АФА) – оксиду азоту, діазоттриоксиду (N_2O_3), пероксинітриту ($ONOO^-$) і, особливо, одного з продуктів його деградації за вільнорадикальним механізмом – радикала діоксиду азоту ($\cdot NO_2$), порушує вищезгадані процеси внаслідок розвитку нітрозативного стресу [25].

У більшості випадків пошкоджувальна дія NO опосередковується пероксинітритом, який утворюється при одночасній генерації

високого вмісту як NO, так і $\cdot\text{O}_2^-$. Крім того, високий вміст оксиду азоту пригнічує активність каталази, що збільшує вміст H_2O_2 і кальційзалежних NOS, у тому числі мітохондріальної, що призводить до утворення нею $\cdot\text{O}_2^-$ замість NO [26].

У таблиці представлено абсолютні значення досліджених показників в мітохондріях серця щурів, а на рис. 1–4, значення показників виражено у відсотках відносно контрольної групи, що були прийняті за 100 %.

Через 24 год після моделювання фокальної ішемії–реперфузії (рис. 1), в мітохондріях серця щурів спостерігається синтез NO із L-аргініну киснезалежним шляхом *de novo*, про що свідчить значне збільшення активності конститутивної NOS (cNOS) та iNOS порівняно з тваринами контрольної групи. У тварин 4-ї групи, які перед моделюванням фокальної ішемії–реперфузії отримували

екдистерон, підвищення активності cNOS та iNOS порівняно зі щурами 2-ї групи не спостерігалось. Вона наближалася до значень активності ферментів у мітохондріях 1-ї та 3-ї груп. Після фокальної ішемії–реперфузії в мітохондріях серця активізується система газового трансмітера NO. Зростає синтез NO *de novo*, що може призвести до збільшення вмісту АФА і, що особливо небезпечно, пероксинітриту, бо в цих умовах значно підвищується генерація АФК, в т.ч. необхідного для його утворення $\cdot\text{O}_2^-$. Отже, посилення активності iNOS, що має значно більшу продуктивність синтезу NO, ніж cNOS, за умов підвищення вмісту $\cdot\text{O}_2^-$ може призводити до утворення пероксинітриту та подальшої активації процесів нітрозативного стресу та апоптозу. Екдистерон інгібує активацію синтезу NO *de novo*, тим самим зменшує ймовірність утворення АФА.

Абсолютні значення досліджуваних показників у мітохондріях серця щурів при ішемії–реперфузії та введення протягом 18 діб екдистерону ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=8)	Ішемія–реперфузія (n=5)	Екдистерон (n=8)	Екдистерон та ішемія–реперфузія (n=8)
Активність NOS, $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка				
конститутивної	$3,62 \pm 0,21$	$14,24 \pm 1,83^*$	$3,2 \pm 0,09$	$4,1 \pm 0,77^{**}$
індуцибельної	$1,52 \pm 0,19$	$5,01 \pm 0,75^*$	$1,31 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,3^{**}$
Нітратредуктазна активність, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$0,49 \pm 0,11$	$1,58 \pm 0,2^*$	$0,31 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,07^{**}$
Вміст				
NO_2^- (пмоль/мг білка)	$347,3 \pm 36,37$	$1242,93 \pm 170,27^*$	$382,03 \pm 71,7$	$331,6 \pm 40,01^{**}$
NO_3^- (нмоль/мг білка)	$68,9 \pm 5,53$	$211,98 \pm 33,13^*$	$17,37 \pm 2,63$	$105,45 \pm 16,05^{**}$
низькомолекулярних нітрозотіолів	$259,9 \pm 27,6$	$889,14 \pm 170,3^*$	$225,21 \pm 15,53$	$290,59 \pm 37,09^{**}$
високомолекулярних нітрозотіолів	$164,4 \pm 28,9$	$1033,8 \pm 91,21^*$	$159,26 \pm 9,15$	$465,28 \pm 100,18^{**}$
Активність аргінази II, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	$1,18 \pm 0,1$	$8,21 \pm 1,5^*$	$0,39 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,11^{**}$
Вміст карбаміду, нмоль/мг білка	$6,1 \pm 0,8$	$134,07 \pm 10,59^*$	$10,18 \pm 1,44$	$21,71 \pm 3,36^{**}$
Вміст H_2S , нмоль/мг білка	$4,21 \pm 0,34$	$10,94 \pm 1,7^*$	$3,71 \pm 0,39$	$2,79 \pm 0,6^{**}$

* $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

Крім киснезалежного *de novo* синтезу NO (окиснення L-аргініну) в умовах гіпоксії значно активується киснезалежний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO). Ми дослідили в мітохондріях серця сумарну НАДНФ-залежну нітратредуктазну активність. Відомо, що основними продуцентами реутилізаційного NO ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$) в мітохондріях є цитохром С-оксидаза та ксантиноксидаза [27]. Отримані результати (див. рис. 1) вказують на посилення нітратредуктазної активності, а, отже, і реутилізаційного синтезу NO в мітохондріях серця тварин 2-ї групи порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи активність нітратредуктази не збільшується. Інтенсифікація нітратредуктазного (діє лише в умовах гіпоксії) реутилізаційного синтезу NO із його стабільних метаболітів (NO_2^- та NO_3^-) за умов фокальної ішемії–реперфузії вказує на порушення оксигенації міокарда. Високий вміст NO, що утворюється в цих умовах, може бути причиною значного підвищення вмісту пероксинітриту [28]

і рівнів генерації таких радикалів, як $\cdot\text{NO}_2$ (чинник нітрозативного стресу), так і $\cdot\text{OH}$ (чинник оксидативного стресу), які є продуктами вільнорадикального шляху розпаду пероксинітриту і ініціаторами перекисного окиснення ліпідів.

Отже, не виключено, що за умов розвитку цереброкардіального синдрому, в мітохондріях серця виникає дефіцит кисню, який зумовлює значне посилення реутилізаційної генерації NO. Ці зміни синтезу NO не відбувалися при попередньому введенні гормону екдистерону – регулятора синтезу в мітохондріях кальційзв'язувального білка (calbindin D28K), а в плазматичних мембранах кардіоміоцитів кальційселективного каналу TRPV6 та активатора багатьох сигнальних каскадів, у т.ч. сфінгомелінового [13], що є ключовим регулятором програм виживання і апоптозу кардіоміоцитів.

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу у мітохондріях серця щурів за експериментальної фокальної ішемії–реперфузії та кардіопротекторної дії екдистерону, ми також визначали зміни пулів стабільних метаболітів

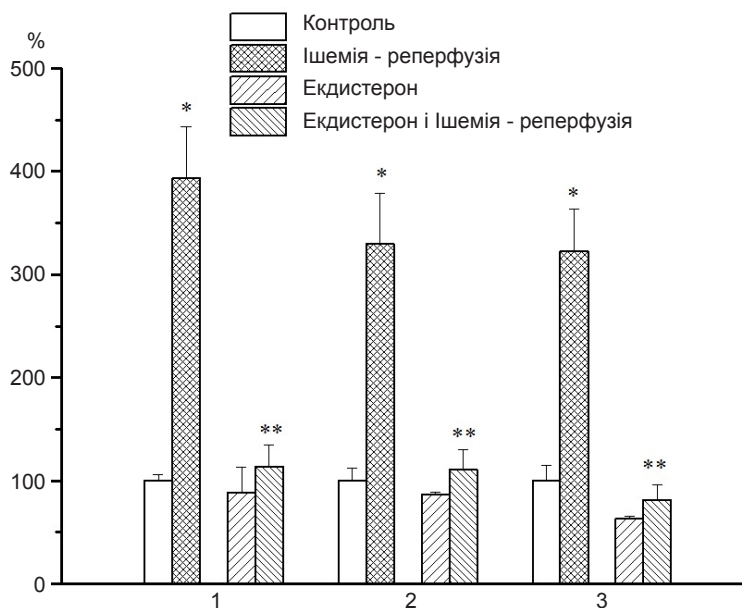


Рис.1. Активність ферментів різних шляхів генерації NO в мітохондріях серця, за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – конститутивна NOS; 2 – індукцибельна NOS; 3 – нітратредуктаза. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

NO: NO_2^- , NO_3^- (рис. 2) та продуктів нітрозилювання АФА низькомолекулярних тіолів, в основному глутатіону – низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ), що є продуктами нітрозилювання SH-груп цистеїну в білках (рис. 3). У мітохондріях серця тварин 2-ї групи достовірно зростали пули NO_2^- та NO_3^- порівняно з контролем (див. рис. 2). У тварин 3-ї групи вміст нітритів достовірно не змінювався, а нітратів, що є продуктом нерадикального розпаду пероксинітриту, зменшився в декілька разів порівняно з тваринами контрольної групи (див. рис. 2). В 4-й групі тварин, вміст нітритів не змінився, хоча вміст нітратів достовірно збільшився порівняно зі щурами 3-ї групи. На відміну від тварин 2-ї групи, у тварин 4-ї групи вміст нітритів і нітратів достовірно менші. Особливо несподіваним було значне підвищення пулів нітриту у тварин 2-ї групи. Як правило, в умовах патології, чи при старінні вміст нітриту знижується, що, власне, часто є головною причиною дисфункції мітохондрій органів. Враховуючи існуючий *de novo* синтез H_2S у мітохондріях серця, а також його антиоксидантну дію, в тому числі

взаємодію з пероксинітритом, стає зрозумілим, що поява надлишкового нітрит-аніона, більше того, і зростання мітохондріальних пулів H_2S (рис. 4) можуть бути зумовлені взаємодією сірководню з пероксинітритом. Це може бути ще одним (крім зростання мітохондріальних пулів нітрат-аніона і нітрозотіолів (див. рис. 2, 3) доказом значного утворення пероксинітриту, а, отже, свідченням розвитку нітрозативного стресу у мітохондріях серця за ішемії–реперфузії.

Нітрат-аніон є найбільш окисненим стабільним метаболітом NO, а також субстратом нітратредуктази для ресинтезу NO [29]. За умов ішемії–реперфузії значно підвищуються пули нітрату у мітохондріях серця. В умовах гіпоксії утворення нітрат-аніона при ферментативному окисненні NO є мало-вірогідним. Водночас частка його утворення при спонтанній деградації пероксинітриту зростає [30]. Враховуючи ці факти, а також те, що пероксинітрит утворюється лише при одночасній генерації як NO, так і $\cdot\text{O}_2^-$ підвищення вмісту нітрат-аніона у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії, свідчить не лише про активацію синтезу NO, тобто

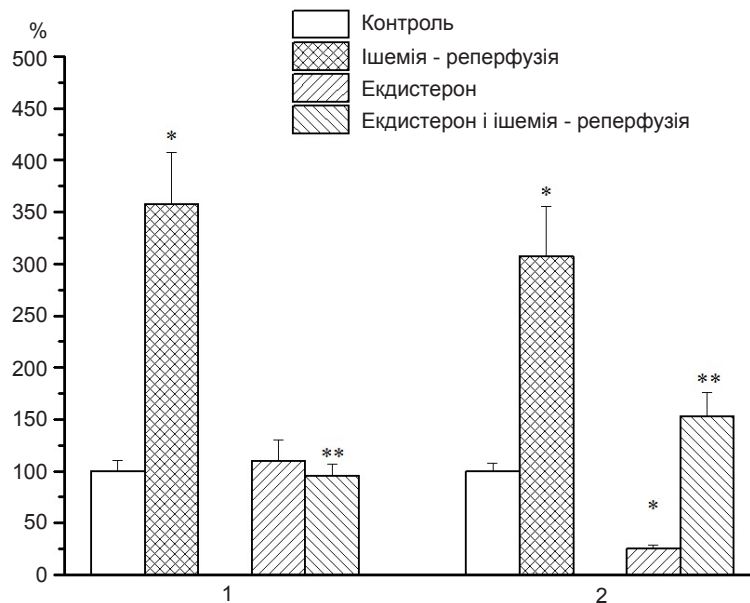


Рис. 2. Пули нітрит-аніона (1) та нітрат-аніона (2) в мітохондріях серця, за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

розвиток нітрозативного стресу, але також про активацію генерації супероксидного аніона (що неминуче призводить до утворення H_2O_2 і $\cdot\text{OH}$). Отже, одночасно з нітрозативним, за ішемії–реперфузії у мітохондріях серця розвивається і оксидативний стрес [8].

Вміст маркерів нітрозативного стресу, якими є нітрозотіоли, змінювався аналогічно пулам NO_2^- та NO_3^- (див. рис. 3).

За умов ішемії–реперфузії у мітохондріях серця зростають пули НМНТ (які є в основному нітрозоглутатіоном), а, отже, можуть знижуватися мітохондріальні пули самого глутатіону – потужного низькомолекулярного антиоксиданта. Також зростають пули ВМНТ (нітрозильовані білки), при цьому певним чином змінюються функції цих білків мітохондрій, що, подібно до фосфорилування, є проявом сигнальної функції АФА (див. рис. 3). Нітрозотіоли – ендogenousні донори NO, а також його депо. У процесі їх декомпозиції може звільнятися NO, причому як ферментативно, так і неферментативно. Зміни вмісту нітрозотіолів у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії вказують на дві можливі причини їх виникнення: з одного боку – зро-

стання їх утворення (процес нітрозилування за дії різних АФА, особливо пероксинітриту), а з іншого — про пригнічення процесу їх декомпозиції.

Досліджуючи активність неокисного метаболізму L-аргініну та L-цистеїну у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії, визначали активність індуктибельної аргінази II – основного ізоферменту мітохондрій, а також мітохондріальні пули карбаміду (один із продуктів аргіназної реакції гідролізу L-аргініну) і вміст H_2S (утворюється в мітохондріях за допомогою неокисного de novo синтезу із L-цистеїну).

Як відомо, потужна мітохондріальна аргіназа II (аргіназний неокисний метаболізм L-аргініну) може конкурувати із мітохондріальними ізоферментами cNOS (окисним метаболізмом L-аргініну). В умовах гіперпродукції NO та можливої нестачі субстрату L-аргініну (за високої активності його деградації аргіназою), кальційзалежні cNOS (як eNOS, так і nNOS) замість NO можуть інтенсивно генерувати супероксид-радикал, тим самим підсилюючи утворення пероксинітриту. Активність аргінази в міто-

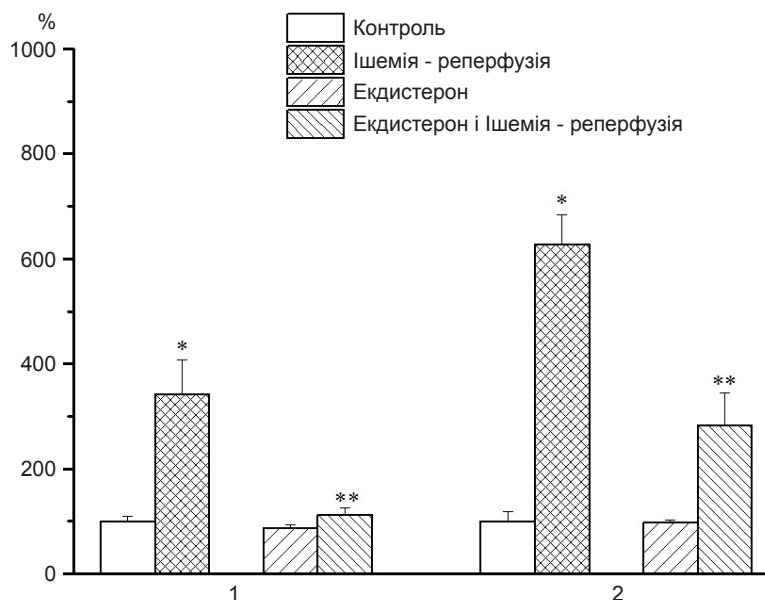


Рис. 3. Пули нітрозотіолів у мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – низькомолекулярні; 2 – високомолекулярні нітрозотіоли. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

хондріях серця тварин 2-ї групи достовірно збільшилася порівняно з контролем, а у тварин 3-ї та 4-ї групи – не підвищилася навіть за умов фокальної ішемії–реперфузії (див. рис. 4). Вміст карбаміду достовірно збільшився в мітохондріях тварин 2-ї групи відносно контролю. У тварин 4-ї групи його вміст достовірно більший, ніж у контролі, але значно нижчий порівняно з тваринами 2-ї групи (див. рис. 4).

Таким чином, одним із можливих механізмів кардіопротекторної дії екдистерону є нормалізація синтезу NO в мітохондріях із ферментом iNOS (що не конкурує з аргіназою за субстрат, позаяк використовує механізм ресинтезу свого субстрату L-аргініну виключно із копродукту синтезу NO L-цитруліну) внаслідок інгібування активності мітохондріальної аргінази II. Причини таких взаємин ще невідомі, однією з яких може бути інгібування активуючого ферменту iNOS його вільнорадикального окиснення через обмеження перетворення H_2O_2 в $\cdot OH$ -радикал у реакціях Хабера–Вайса чи Фентона. Це відбувається

внаслідок інгібування генерації $\cdot OH$ -радикала внаслідок хелатування вільного заліза карбамідом, копродуктом аргіназної реакції. Але більш вірогідним є інгібування iNOS гуанідіносукцинатом, попередником якого може бути карбамід (це рідкісна, поряд з реакцією карбаміювання, реакція прямого включення молекул карбаміду в обмін речовин) внаслідок прямого інгібування ресинтезу L-аргініну із L-цитруліну в т.з. цитруліновому циклі [31].

Як відомо, карбамід – це один із продуктів аргіназної реакції разом із орнітином, який у мітохондріях переважно метаболізується в глутамінову кислоту. Остання використовується для утилізації в циклі трикарбонових кислот. Встановлено здатність фізіологічних концентрацій сечовини карбаміювати різні білки, що змінює їх властивості. Не виключено, що підвищення чутливості мітохондріальної пори до її індукторів у серці старих шурів частково опосередковується саме карбаміюванням певних білків цього надзвичайно складного мультибілкового

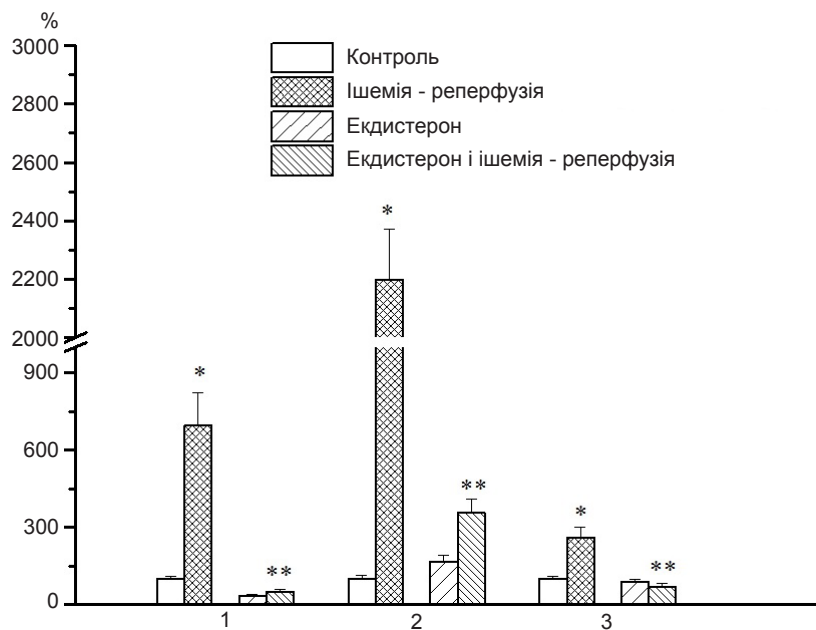


Рис. 4. Активність неокисного метаболізму L-аргініну та L-цистеїну в мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – аргіназа; 2 – карбамід; 3 – H_2S . * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

комплексу. У такому разі, пригнічувальний вплив екдистерону щодо активності мітохондріальної аргінази (див. рис.4) може бути ще одним механізмом у його кардіопротекторній дії, яка реалізується через інгібування мітохондріальної пори.

В організмі, подібно до синтезу NO, існує три шляхи *de novo* синтезу H_2S , а також реутилізаційні. В процесі конститутивного та індукційного синтезу *de novo H_2S утворюється з L-цистеїну за допомогою трьох ферментів: цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін-L-синтази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, які експресуються в мітохондріях тканин серцево-судинної та нервової систем. Реутилізаційний шлях синтезу H_2S здійснюється за допомогою сульфатредуктази та цистеїнліази, коли сульфат-аніон перетворюється на сульфід-аніон, а останній на сірководень, – який є регулятором мітохондріальної пори, неорганічним субстратом дихання і „хелатором” пероксинітриту в мітохондріях серця щурів, за умов фокальної ішемії–реперфузії. Встановлено достовірне збільшення його вмісту у тварин 2-ї групи порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи його вміст був достовірно меншим, ніж у тварин 2-ї групи*

Раніше встановлена інгібувальна дія фізіологічних концентрацій сірководню на відкривання мітохондріальної пори [32]. Отримані нами результати передбачають можливу активуючу дію його високих концентрацій на АФК чи АФА-залежне, а, не виключено, що і на кальційзалежне відкривання пори, яке є однією з головних причин смертності за мозкового інсульту внаслідок апоптозу клітин головного мозку, а також, як показали наші дослідження, і апоптозу кардіоміоцитів за ішемії–реперфузії, внаслідок розвитку оксидативного і нітрозативного стресів, що є неодмінними компонентами цереброваскулярного синдрому. Про це незаперечно свідчить показана нами раніше потужна антиапоптотична дія екдистерону. Крім того, зростання мітохондріальних

пулів сірководню, як було сказано вище, при аналізі можливих причин збільшення пулів нітрит-аніона, може мати адаптивне захисне значення, спрямоване на нейтралізацію високого вмісту пероксинітриту, що утворюється в незахищених екдистероном мітохондріях серця за ішемії–реперфузії внаслідок високих рівнів генерації як АФК (оксидативного стресу), так і гіпервисоких рівнів індукційного і реутилізаційного синтезу NO (нітрозативний стрес). Не виключено також, що підвищені пули сірководню в умовах комбінованого оксидативно-нітрозативного стресу використовуються мітохондріями серця як додатковий неорганічний субстрат дихання.

ВИСНОВКИ

1. За умов ішемії–реперфузії головного мозку в мітохондріях серця дорослих щурів активується конститутивний і, особливо, індукційний *de novo* синтез NO внаслідок окиснення L-аргініну, та неокисний реутилізаційний, за рахунок відновлення окиснених стабільних метаболітів NO-мітохондріальних пулів нітрат- і нітрит-аніонів, які при цьому зростають, що є доказом утворення та розпаду АФА пероксинітриту – основного маркера розвитку нітрозативного стресу. Збільшуються пули нітрозотіолів. Вищезгадане – вагомий доказ індукції нітрозативного стресу.

2. За фокальної ішемії–реперфузії головного мозку в мітохондріях серця підвищуються вміст сірководню, активність індукційної аргінази II і, як наслідок, пулу карбаміду, що є продуктом альтернативного окиснення для синтезу NO гідролізу L-аргініну аргіназою.

3. Профілактичне вживання рослинного екстаку *Serratula coronata*, збагаченого екдистероном, повністю попереджує індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

**Р.Р. Шарипов, А.В Коцюрuba, Б.С. Копьяк,
В.Ф. Сагач**

ИНДУКЦИЯ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС ВО ВРЕМЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ЭКДИСТЕРОНОМ

На модели фокальной ишемии–реперфузии головного мозга исследовали индукцию нитрозативного стресса в митохондриях сердца крыс и возможные механизмы протекторного действия экдистерона. Показано, что в этих условиях индуцируется активация конститутивного и индуцибельного *de novo* синтеза NO за счет окисления L-аргинина и неокислительного реутилизационного синтеза NO за счет восстановления окисленных стабильных метаболитов NO. Весомым доказательством индукции нитрозативного стресса был значительный рост митохондриальных пулов нитрат- и нитрит-анионов и пулов нитрозотиолов, что свидетельствует об образовании и распаде пероксинитрита – основного маркера развития нитрозативного стресса. Наблюдали также повышение содержания ключевого регулятора *de novo* синтеза NO сероводорода и активности индуцибельной аргиназы II и, как следствие, пула карбамида, который также является регулятором синтеза NO. Предварительное введение животным растительного экстракта *Serratula coronata*, обогащенного экдистероном, уменьшает индукцию нитрозативного стресса в митохондриях сердца крыс при фокальной ишемии–реперфузии.

Ключевые слова: фокальная ишемия–реперфузия головного мозга, цереброкардиальный синдром, митохондрии сердца, нитрозативный стресс, экдистерон.

**R.R. Sharipov, A.V. Kotsuruba, B.S. Kopyak,
V.F. Sagach**

INDUCTION OF NITROSATIVE STRESS IN MITOCHONDRIA OF RATS HEARTS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA–REPERFUSION OF THE BRAIN AND ITS CORRECTION BY ECDYSTERONE

On the model of focal ischemia–reperfusion of the brain investigated the induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts and possible mechanisms of protective action of ecdysterone. It is shown that focal ischemia–reperfusion of the brain induced in myocardial mitochondria the activation of constitutive and inducible *de novo* synthesis of NO by oxidation of L-arginine and not oxidative synthesis of NO through the recovery of oxidized stable metabolites of NO. Strong evidence of induction of nitrosative stress in heart mitochondria by focal ischemia - reperfusion of the brain, was a significant increase in mitochondrial pool of nitrat- and nitrite- anions and pools of nitrosothiols, that is proof of the

formation and decay of peroxynitrite - a key marker of nitrosative stress. Also was observed increase in heart mitochondria by focal ischemia–reperfusion of the brain, content key regulator of *de novo* synthesis of NO - hydrogen sulfide and activity of inducible arginase II and, as a result, the pool of carbamide, which is also a regulator of the synthesis of NO. Previous introduction for animals herbal extract *Serratula coronata*, enriched ecdysterone, reduces induction nitrosative stress in mitochondria of rats hearts under conditions of focal ischemia–reperfusion of the brain.

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

REFERENCES

1. Zozulya IS, Moshenska OP. The acute period of ischemic stroke: a modern view on the problem Ukr Med J. 2009; 4: 67-73 [Ukrainian].
2. Hyvrinen M, Qiao Q, Tuomilehto J. et al. The difference between acute coronary heart disease and ischaemic stroke risk with regard to gender and age in Finnish and Swedish population Intern. J of Stroke. 2010; 5 : 152-56.
3. Johnson RH, Lambie DG, Spalding JMK. Neurocardiology: The Interrelationships Between Dysfunction in the Nervous and Cardiovascular System. London, England: WB Saunders; 1984: 66-70.
4. Zhdanov GN, Gerasimov MM. Studying the content of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the serum of patients with acute phase of ischemic stroke. Cytokines and Inflamm. 2006;5(1):27-30 [Russian].
5. di Villa Bianca R, Sorrentino R, Imbimbo C. et al. Sphingosine 1-phosphate induces endothelial nitric -oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum J Pharmacol Exp. 2006; 316(2): 703-08.
6. Kotsiuruba AV, Tuhanova AV, Bukhanevich OM, Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Identification of sphingomyelin as the effector mechanism of the early effect Ukr Biokhim Zh. 1995;67(2):53-8 [Ukrainian].
7. Shchokina E. G., Study of the cardioprotective features of the recombinant antagonist interleukin-1 receptors under conditions of the adrenal myocarditis in rats. Ukr J of Biopharm. 2012; (5-6):47-51 [Ukrainian].
8. Sharinov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria by focal ischemia – reperfusion brain and protective effect of ecdysterone. Fiziol.Zh. 2014;60(3):11-7 [Ukrainian].
9. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, et al. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice Mol Cell Biochem. 2012;360: 61-69.
10. Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Brit J Pharmacol. 2006;149: 625-34.

11. King DL, Polhemus DJ, Bsushan SJ et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent PNAS. 2014; 111(8): 3182-87.
12. Sagach VF, Korkach YP, Kotsyuruba AV et al. Inhibition of opening mitochondrial pore by ecdysterone in the heart of old rats Fiziol. Zh. 2008;54(4):3-10 [Ukrainian].
13. Korkach JuP, Rudyk OV, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD, Sagach VF. The nitric oxide and superoxide synthesis in protective action of ecdysterone in mitochondrias of rats with streptozotocin-induced diabetes Fiziol. Zh. 2007;53(5):1-6 [Ukrainian].
14. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. ILARJ.2003;44(2):85-95.
15. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide syntases FEBS Lett. 1991;291(1):145-49.
16. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats Am J Physiol. 1999;277(5):797-84.
17. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime Anal. Biochem.1980; (107):424-31.
18. Alikulov ZA, Lvov NP, Kretovich VL. Nitrate and nitrite reductase activity of milk Biochemistry. 1980;45(9):1714-18 [Russian].
19. Shugalei VS, Kozina AS. Urea content and arginase activity in rat organs during acclimatization to cold Physiol. J. USSR. 1977; (8): 1199-02 [Ukrainian].
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids Anal Biochem. 1982;126(1):131-38.
21. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone methabolizm in growing rats Am J. Physiol. 1996; (270)5: 840-45.
22. Gerdel D, Cederbaum AJ. Inhibition of the catalitic activity of alkoholdegydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc Biochemistry.1996;35(50):16186-194.
23. Hue Yan, Junbao Du, Chaoshu Tang. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. Biochem and Biophys Res Commun. 2004;313(1):22-27.
24. Lowery OH, Rosebroughh NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.
25. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD. The inhibition of oxidative and nitrosative stresses by ecdysterone as the mechanisms of its cardio- and vasoprotective action at type Fiziol. Zh. 2008;54(5):1-9 [Ukrainian].
26. Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines:simple primordial stress molecules J Cell Mol Med. 2007;11(4):685-703.
27. Loke KE, Laycock SK. Mital S. et. al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart Circulation. 1999;100(12):1291-97.
28. Reutov VP, Sorokina EG, Ohotyn VE, Kosytsyn NS. Cyclic conversion of nitric oxide in the body of mammals Science, M. 1997:158 [Russian].
29. Moibenko OO, Sagach VF, Tkachenko MM. et al. Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system, as the basis of pathogenetic treatment of diseases Fiziol. Zh. 2004;50(1): 11-30 [Ukrainian].
30. Lee C I, Lin X, Zweier J.L. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite// J Biol Chem. 2000;275(3): 9369-76.
31. Kihara M, Schmelzer JD, Poduslo JF. et al. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology and oxygen free radicals Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(14):6107-11.
32. Strutynska NA, Semenykhina OM, Shorna SV, Vavilova HL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart Fiziol. Zh. 2011;57(6):3-14 [Ukrainian].

*Ин-т фізіології. О.О. Богомольця НАН України, Київ
Egipian77@gmail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 18.05.2014*

Г.С. Маслак¹, О.В. Костюк¹, Д.О. Мінченко^{2,3}, О.З. Бразалук¹, А.І. Шевцова¹,
О.Г. Мінченко²

Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії нейрамінідази NEU1 та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію

¹Дніпропетров. нац. мед. академія МОЗ України; ²Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; ³Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ; E-mail: ominchenko@yahoo.com

Досліджено вміст сіалілгліканів на поверхні мембрани лімфоцитів та експресії генів нейрамінідази NEU1 і сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію, а також концентрацію сіалових кислот у плазмі крові, ступінь сіальованості α 1-кислого глікопротеїну та фібронектину, тип зв'язування сіалових кислот з їхніми гліканами, який визначали за допомогою сіалоспецифічних лектинів MAA та SNA. Встановлено, що вміст вільних сіалових кислот у плазмі крові та активність нейрамінідази за еритремії зростали порівняно зі здоровими донорами на тлі зниження MAA-II-зв'язувальної активності досліджуваних глікопротеїнів. За допомогою методів протокової цитометрії та конфокальної мікроскопії з використанням сіалоспецифічних лектинів показано підвищення експонування α 2,6- та α 2,3-сіальованих глікокон'югатів на поверхні мембрани лімфоцитів у хворих на еритремію. У лімфоцитах за еритремії виявлено також підвищення рівня експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1. Отримані результати розкривають механізми порушень глікобіологічних процесів за еритремії і можуть сприяти розробці адекватних засобів лікування цього захворювання.

Ключові слова: сіальованість, глікопротеїни, експресія генів, NEU1, ST6GAL1, лімфоцити, плазма, еритремія.

ВСТУП

Сіальованість є одним із поширених та універсальних типів термінального глікозилювання N- та O-гліканів [1]. Сіалові кислоти (в основному, N-ацетил-5-нейрамінова кислота) зазвичай займають кінцеві невідновлювальні позиції на олігосахаридних ланцюгах і можуть існувати у двох ізомерних формах: як α 2,3- та α 2,6-зв'язані сполуки [2]. Функції цих кінцевих моносахаридів надзвичайно різноманітні: вони впливають на період напіврозпаду багатьох циркулюючих глікопротеїнів, відіграють важливу роль у міжклітинних зв'язках, а також у взаємодії клітин з міжклітинним матриксом, беруть участь у розвитку та прогресуванні багатьох патологічних процесів [3, 4].

Зміни вмісту сіалових кислот у складі глікопротеїнів часто корелюють з їх функціональною активністю. Так, протизапальні та імуномодулювальні властивості α 1-кислого глікопротеїну значною мірою залежать від ступеня сіальованості його N-гліканових структур, причому десіальовані форми α 1-кислого глікопротеїну викликають значно нижчу оксигензалежну відповідь, ніж сіальовані [5]. Показано, що глікоформи α 1-кислого глікопротеїну амніотичної рідини плоду, які мають у своєму складі велику кількість α 2,3-зв'язаних сіалових кислот, захищають його від шкідливої дії медіаторів запалення [4]. Інший глікопротеїн фібронектин є низькогліколізованим (5–9 %) протеїном міжклітинного матриксу та плазми крові,

© Г.С. Маслак, О.В. Костюк, Д.О. Мінченко, О.З. Бразалук, А.І. Шевцова, О.Г. Мінченко

що відіграє важливу роль у процесах росту і диференціювання, а також міграції пухлинних клітин [6, 7]. Його біологічна активність також може змінюватися залежно від ступеня сіалюваності. Як стверджують Pan та Song [8], зміни сіалюваності N-гліканів у складі послідовності III_{9-10} фібрoneктину та I-подібного домену $\beta 1$ -інтегрину викликають у них значні конформаційні перебудови та впливають на взаємодію цих двох глікопротеїнів.

Як експресія так і активність сіалілтрансфераз та сіалідаз, істотно впливають на сіалюваність глікопротеїнів. Ці форми гліканів утворюються під дією сіалілтрансфераз, родина яких включає 20 специфічних ензимів, що приєднують сіалові кислоти до глікопротеїнів та гліколіпідів з утворенням $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - і $\alpha 2,8$ -зв'язків [2]. За типом зв'язку, який утворюється між сіаловими кислотами та акцепторним моносахаридом, ці ферменти класифікуються як ST3GAL, ST6GAL, ST6GALNAC і ST8SIA [9]. ST6GAL1, що використовує $\text{GAL}\beta 1 \rightarrow 4\text{GLCNAC-R}$ як акцептор сіалових кислот, задіяний у канцерогенезі [10, 11]. Видалення α -глікозидних залишків сіалових кислот від вуглеводних складових глікопротеїнів і гліколіпідів проходить під дією сіалідаз. У ссавців були ідентифіковані та охарактеризовані чотири типи сіалідаз або нейрамінідаз (NEU1-4), які відрізняються за своєю внутрішньоклітинною локалізацією та ферментативними властивостями. NEU1 бере участь у клітинній сигналізації та імунних реакціях [12]. Цей ензим локалізується у лізосомах, але він може транспортуватися і на поверхню плазматичної мембрани клітин [10]. Його каталітична активність змінюється при онкологічних захворюваннях, що може значно впливати на деякі біологічні процеси через зміну конформації, розпізнавання та маскування функціональних ділянок молекул на поверхні мембран [13].

Еритремія – мієлопроліферативне захворювання крові, при якому кістковий мозок виробляє занадто багато червоних кров'яних клітин. Воно найчастіше спостерігається у

літніх людей віком від 60 років, але в останні роки збільшилася частота цього захворювання у молодих людей і дітей, для яких ця хвороба може переходити у злоякісну форму.

Метою роботи було дослідити вміст, синтез, особливості структури сіалілгліканів на поверхні лімфоцитів та експресію генів нейрамінідази NEU1 і сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію, а також концентрацію сіалових кислот у плазмі крові, ступінь сіалюваності $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну та фібрoneктину, а також зв'язування сіалових кислот з їхніми гліканами.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження була кров, а саме плазма (з гепарином чи з ЕДТА) та лімфоцити хворих на еритремію віком від 58 до 66 років ($n=20$) та гематологічно здорових волонтерів віком від 55 до 65 років ($n=20$). Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару: гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» м. Дніпропетровськ. Всі пацієнти давали письмову згоду на участь у обстеженні.

Ступінь глікозильованості фібрoneктину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну вивчали методом лектин-ферментного аналізу з використанням антитіл до цих речовин, що були деглікозильовані за допомогою N-Glycosidase F («US Biological», США), причому відсутність вуглеводів у складі цих імуноглобулінів, їх афінність і специфічність перевіряли лектин- та імунодот-аналізом. Використовували лектин маакії амурської – MAA II («Sigma», США), бузини чорної – SNA («Лектинотест», Україна), що були кон'юговані з пероксидазою хрину. Специфічність зв'язування лектинів із вуглеводними детермінантами фібрoneктину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну контролювали додаючи у реакційну суміш відповідні моносахариди-інгібітори у концентрації 0,1

моль/л. Щоб вивчити лектинзв'язувальну активність фібронектину і $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну їх вносили у лунку по 200 та 500 нг. Рівень адсорбції вимірювали на апараті Humareader («Human», Німеччина) при довжині хвилі 405 нм.

Концентрацію фібронектину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну у плазмі визначали методом імунодоту з використанням відповідних поліклональних кролячих антитіл. Отримані результати обчислювали за допомогою програми GelProAnalyser 3.1.

Вміст загальних сіалових кислот вимірювали за допомогою набору «СіалоТест» (НПЦ «Еко-Сервіс», Росія) згідно з протоколом виробника. Для цього в пробірку вносили 0,6 мл сироватки, 2 мл дистильованої води і 1 мл реагенту А, ретельно перемішували і ставили у водяну баню на 5 хв при 37°C, потім центрифугували при 3000 хв⁻¹ протягом 6 хв. Відбирали 2 мл супернатанту, додавали 0,4 мл реагенту В, інкубували на киплячій водяній бані впродовж 15 хв, охолоджували, додавали 2 мл дистильованої води, перемішували і вимірювали оптичну густину (Е) у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм і виражали в міліграмах на 100 мл.

Активність нейрамінідази визначали за аглютинацією еритроцитів лектином арахісу в діапазоні концентрацій від 2 до 15,6 мкг/мл [14]. Для цього у пробірки вносили по 50 мкл попередньо відмитої 10%-ї суспензії еритроцитів людини першої групи крові, додавали 50 мкл плазми та 100 мкл 0,2 М ацетатного буферного розчину з рН 5,0, залишали на 2 год при 30 °С у термостаті, після чого центрифугували протягом 30 с при 3000 хв⁻¹. Відбирали надосадову рідину, додаючи 200 мкл розчину бичачого сироваточного альбуміну в забуференому фізіологічному розчині. Процедура повторювали, після чого проводили калібрування активності нейрамінідази в діапазоні від 50 до 100.00 ОД/мл, використовуючи ензим холерного ембріона («Serva, Heidelberg», Німечина) як стандарт. Утворення 1 мкмоль/л

N-ацетилнейрамінової кислоти з NAN-лактози або бичачого підщепленого муцину за 1 хв при рН 5,0 та 37 °С прийнято за одиницю активності нейрамінідази (U). Отримані результати переводили в цифровий формат за допомогою програми GelProAnalyser 32.

Лімфоцити з гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл) виділяли за методом, який базується на седиментації клітин у градієнті густини фікол-урографіну ($\rho = 1,077$ г/мл). Для цього у центрифужну пластикову пробірку наливали 2–3 мл фікол-урографіну, на нього нашаровували 4–6 мл відстояної плазми, попередньо розведеної вдвічі у фізіологічному розчині, і зверху шар клітин крові. Пробірки центрифугували упродовж 40 хв з прискоренням 200 g (1500–1800 хв⁻¹) за кімнатної температури. Інтерфазне кільце із лімфоцитів відбирали в суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 3–4 мл цього розчину, вміст пробірки ретельно перемішували та центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання отримані клітини ресуспендували в забуференому фізіологічному розчині, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин визначали за допомогою трипанового синього (їх було понад 90 %) та готували робочу концентрацію лімфоцитів (300 тис./мл у кожному зразку).

Локалізацію фібронектину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням сіалоспецифічних лектинів MAA II та SNA, кон'югованих з флуоресцеїнізотіоціанатом («EU Laboratories», Швеція). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із йодидом пропідіуму. Результати реєстрували на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS, обробляли за допомогою програми FCS3 Express.

Експресію NEU1 і ST6GAL1 аналізували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, використовув-

ючи «Mx 3000P QPCR» («Stratagene», США) та SYBRGreen Mix («AB gene», Велика Британія). Для цього із лімфоцитів виділяли РНК як описано раніше [15]. Її осад промивали 75%-м етанолом, розчиняли у воді, вільний віз рибонуклеаз, переосаджували етанолом для позбавлення препаратів рибонуклеїнових кислот від залишків реагенту Trisol, знову розчиняли у воді та використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою QuaniTect Reverse Transcription Kit («QIAGEN», Німеччина) згідно з протоколом виробника.

Для ампліфікації кДНК NEU1 були використані прямий (5'-ccctatgagctcccatg-3' та зворотний (5'-actgtctcttccgcatga-3') праймери. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 955–974 та 1338–1219 кДНК NEU1 людини (GenBank номер NM_000434). Розмір ампліфікованого фрагмента 284 пари нуклеотидних залишків. Ампліфікацію кДНК ST6GAL1 (ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1; SIAT1) проводили за допомогою прямого (5'-aggaccaggcatcaagttca-3') та зворотного (5'-ggaggacttcagagatccc-3') праймерів, які відповідають послідовності 697 – 716 та 898 – 879 кДНК ST6GAL1 людини (GenBank номер NM_003032). Розмір ампліфікованого фрагмента 202 пари нуклеотидних залишків.

Кількість РНК, взятої для аналізу, оцінювали за рівнем експресії мРНК β -актину (ACTB). Ампліфікацію кДНК β -актину проводили за допомогою прямого – 5'-ggacttcgagcaagagatgg-3' та зворотного – 5'-agcactgtgtggcgctacag-3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747–766 та 980–961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 пари нуклеотидних залишків. Праймери були отримані від фірми “Sigma-Aldrich” (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів NEU1 та ST6GAL1 виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential expression calculator”, а статисти-

чний аналіз – за допомогою програмного забезпечення Statistics 6.0. Значення експресії генів NEU1 та ST6GAL1 нормалізували за рівнем експресії β -актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Використано середні значення $M \pm m$ чотирьох експериментів. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням критерію t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сіальованість глікопротеїнів плазми крові. Лектини SNA (*Sambucus nigra* lectin) та МАА (*Maackia amurensis* lectin) II – найкращі інструменти для дослідження сіальованості протеїнів, оскільки SNA має високу афінність до $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -сіалових кислот біантенних N-гліканів та О-гліканів, а МАА-II взаємодіє з тими сіаловими кислотами, що зв'язані з $\alpha(2 \rightarrow 3)$ -галактозою [15]. Ми дослідили сіальованість двох глікопротеїнів плазми крові хворих на еритремію, а саме $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну та фібрoneктину, участь яких у розвитку онкологічних процесів відома, але недостатньо вивчена. З першого погляду між цими протеїнами мало спільного, але їх особливістю є майже однакова кількість N-гліканових ланцюгів у структурі, вони мають імуномодулювальні властивості та залучені у процеси пухлинного росту [6, 16–18]. Більше того, $\alpha 1$ -кислий глікопротеїн як представник білків гострої фази першим реагує на будь-які запальні або проліферативні процеси, які виникають в організмі хворої людини [3], а фібрoneктин залучається переважно на стадії розповсюдження та метастазування пухлинних клітин [19].

З рис. 1 видно, що у хворих на еритремію рівень зв'язування $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну зі SNA знижений на 61 % ($P < 0,001$), а з МАА-II – на 42 % ($P < 0,05$), в той час як зв'язування фібрoneктину, навпаки, підвищується на 58 % ($P < 0,05$), а з МАА II знижений на 71 % ($P < 0,001$). Кореляційний аналіз показав наявність позитивного зв'язку між змінами

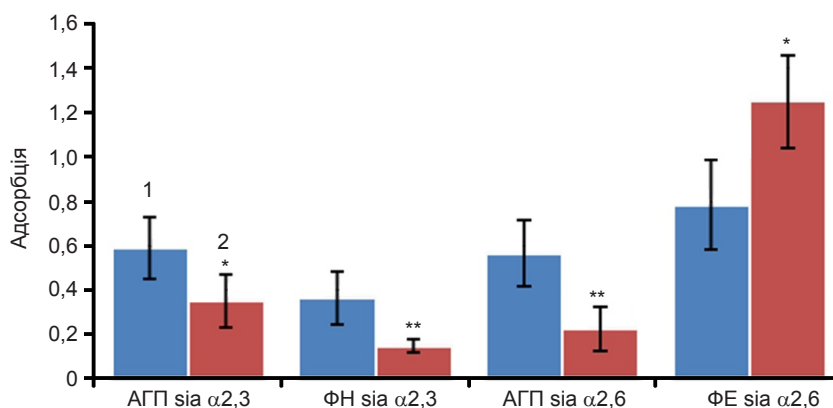


Рис. 1. Ступінь зв'язування α_1 -кислого глікопротеїну (АГП) та фібронектину (ФН) плазми крові хворих на еритремію з лектинами маакії амурської та бузини чорної. 1 – контроль, 2 – еритремія. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ порівняно з контролем

МАО II і SNA-зв'язувальних активностей як α_1 -кислого глікопротеїну, так і фібронектину ($\gamma = 0,610$; $P<0,05$ і $0,654$; $P<0,05$) відповідно.

Таким чином, нами встановлено, що сіальованість цих білків за еритремії змінюється по-різному, і підвищення вмісту десіальованих форм α_1 -кислого глікопротеїну часто є ознакою розвитку патологічного процесу, що і підтверджують інші автори [5, 20].

Вміст сіалових кислот і активність NEU1. Показало, що у плазмі крові хворих на еритремію достовірно ($P<0,05$) підвищується вміст сіалових кислот (таблиця), а також суттєво посилюється і активність NEU1.

Сіальованість поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів за еритремії. За допомогою проточної цитофлуориметрії з використанням сіалоспецифічних лектинів виявлено зміни вуглеводних компонентів у складі глікокон'югатів на поверхні плазматичної мембрани лімфоцитів порівняно з контролем.

Так, зв'язування SNA з поверхневими $\alpha_2,6$ -сіальованими глікокон'югатами лімфоцитів було в 3,3 рази більш інтенсивним (рис. 2,а), що підтверджено з використанням методів конфокальної мікроскопії (рис. 3). Водночас інтенсивність зв'язування МАО-II (див. рис. 2,б) збільшувалася меншою мірою: експонування $\alpha_2,3$ -сіальованих глікокон'югатів на поверхні плазматичної мембрани лімфоцитів крові зростало тільки на 38 % ($P<0,05$).

Зміни сіальованості фібронектину представляють особливий інтерес, оскільки, як відомо, N-глікани плазмової його форми в нормі мають приблизно вдвічі більше $\alpha_2,6$ -зв'язаних сіалових кислот, ніж $\alpha_2,3$ -зв'язаних [21]. Більше того, сіальовані глікани перерозподіляються: знижується $\alpha_2,3$ - та підвищується $\alpha_2,6$ -сіальованість, а їх співвідношення зменшується більше ніж у 4 рази. Можливою причиною таких змін можуть бути конформаційні порушення

Вміст сіалових кислот і активність нейрамінідази у плазмі крові хворих на еритремію та гематологічно здорових донорів

Групи	Сіалові кислоти, мг/100мл	Нейрамінідаза, ОД/мл 10^{-3}
Контроль (здорові донори)	$63,74 \pm 12,3$	$53,78 \pm 12,19$
Хворі на еритремію	$91,25 \pm 14,6^*$	$72,48 \pm 5,68^*$

* $P<0,05$ порівняно з контрольною групою.

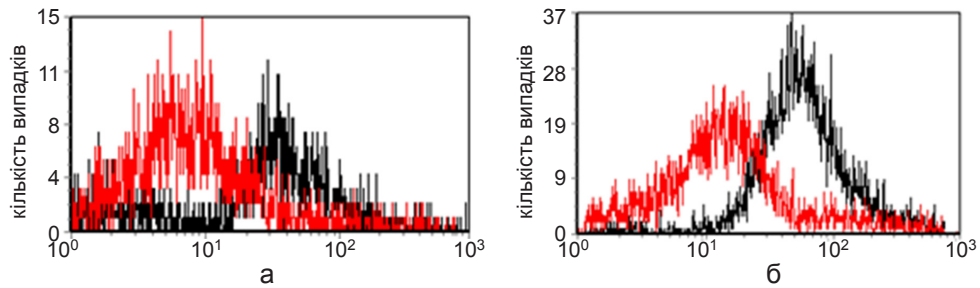


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції бузини чорної-SNA (а) і маакії амурської-MAA II (б) на лімфоцитах гематологічно здорового донора (світла лінія) і хворого на еритремію (темна лінія), протокова цитометрія на апараті («Beckman Coulter EPICS»)

цього протеїну, що робить недоступними гліканові структури для дії глікозидаз. Це узгоджується з даними інших авторів [19, 22, 23], які продемонстрували можливість таких змін конформації фібронектину за умов росту пухлин, в результаті яких активні модулі маскуються та втрачають свої функції, а також порушується взаємодія фібронектину і колагенових фібрил.

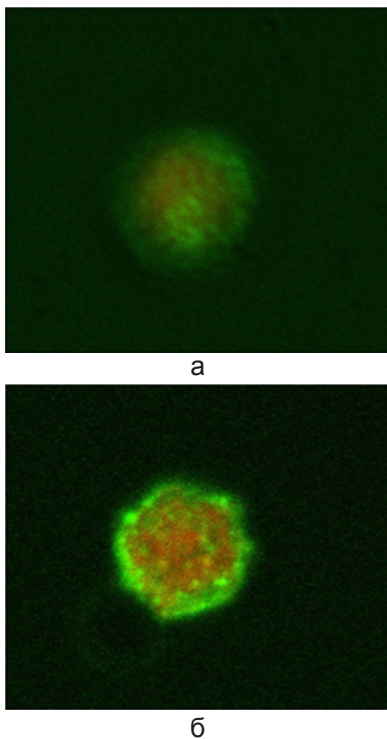


Рис. 3. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-SNA на лімфоцитах гематологічно здорового донора (а) і хворого на еритремію (б), конфокальна мікроскопія

Сіальованість розчинних форм глікопротеїнів, у тому числі α 1-кислого глікопротеїну та фібронектину, залежить від активності нейрамінідаз, що циркулюють у крові людини. Виявлене нами підвищення активності нейрамінідази у плазмі крові хворих на еритремію корелює з високим вмістом сіалових кислот та посиленням експресії NEU1, яка, як відомо, бере участь у багатьох патологічних процесах, у тому числі метастазуванні пухлинних клітин через десіалювання інтегрину β -4 [24–28].

Експресія мРНК NEU1 і ST6GAL1 у лімфоцитах крові. Дослідження рівня експресії генів NEU1 та ST6GAL1 за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції показали наявність мРНК для обох ферментів у лімфоцитах крові як здорових донорів, так і хворих на еритремію (рис. 4). Встановлено, що у хворих на еритремію істотно підвищується рівень експресії мРНК NEU1 (на 79 %) та

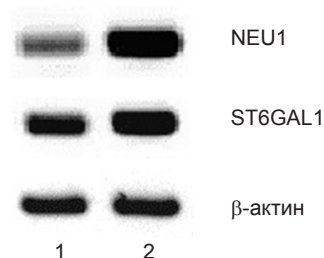


Рис. 4. Експресія мРНК нейрамінідази та сіалілтрансферази у лімфоцитах здорових донорів (1) та хворих на еритремію (2) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії мРНК β -актину визначали для контролю кількості РНК, взятої для аналізу

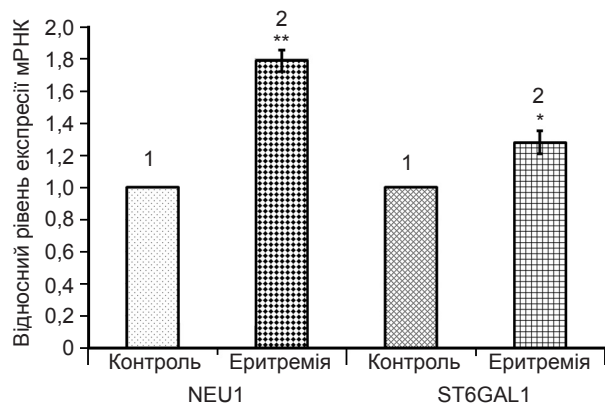


Рис. 5. Кількісна оцінка експресії нейрамінідази (NEU1) та сіалілтрансфери (ST6GAL1) у лімфоцитах здорових донорів (1) та хворих на еритремію (2) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1 нормалізували за експресією β -актину і виражали у відсотках відносно контролю; $n = 5$; * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ порівняно з контролем

ST6GAL1 на 28 % порівняно зі здоровими донорами у розрахунку на експресію β -актину як контрольного гена (рис. 5).

Нами також виявлено зростання рівня експресії мРНК сіалілтрансфери ST6GAL1 (β -галактозид: $\alpha 2$ -6-сіалілтрансфери), що забезпечує утворення $\alpha 2,6$ -зв'язку між сіаловою кислотою та галактозою (SIA $\alpha 2$ -6GAL $\beta 1$ -4GLCNAC $\beta 1$ -R). Це узгоджується з даними інших дослідників [19, 29], які показали підвищення експресії ST6GAL1 за багатьох онкологічних захворювань: аденокарциномі товстої кишки, грудної залози та шийки матки, хоріокарциномах, гострому мієлоїдному лейкозі та деяких пухлинах головного мозку. Цей ензим є медіатором пухлинної прогресії, оскільки призводить до гіперсіалюваності $\beta 1$ -інтегринів, внаслідок чого змінюється їх конформація та порушуються процеси активації рецепторів і сигналізації, а це в свою чергу підвищує рухливість та інвазивність клітин [29].

Результати, представлені на рис. 2, 3 та 4, свідчать про наявність прямого зв'язку між розвитком пухлин та підвищенням $\alpha 2,6$ -сіалюваності поверхневих глікокон'югатів і експресії ST6GAL1, що узгоджується з даними літератури [2]. Підвищення експресії нейрамінідази можна розглядати також як включення захисних механізмів за умов

еритремії, що може частково нівелювати ефекти високосіалюваних вуглеводних гілок у складі як плазматичних, так і поверхневих глікокон'югатів. Підтвердженням тому є подовження майже втричі часу ремісії у хворих на гострий мієлоїдний лейкоз, які між проходженням курсів хіміотерапевтичного лікування отримували ін'єкції оброблених нейрамінідазою мієлобластних клітин [30]. Таким чином, отримані результати можуть бути корисними для розуміння процесів глікозилювання протеїнів за еритремії та пошуку шляхів використання сіалових кислот або відповідних ензимів для розробки нових стратегій лікування онкологічних захворювань.

ВИСНОВКИ

1. У плазмі крові хворих на еритремію сіалюваність вуглеводних антен α -1-кислого глікопротеїну знижується, причому спостерігається перерозподіл сіалюваних гліканів фібронектину: у положенні $\alpha 2,3$ знижується, а $\alpha 2,6$ – підвищується.

2. Вміст сіалових кислот у плазмі крові за еритремії підвищується і позитивно корелює з активністю нейрамінідази.

3. Рівень експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1 у лімфоцитах крові, а також експонування $\alpha 2,6$ - та $\alpha 2,3$ -сіалюваних глікокон'югатів на

поверхні мембрани лімфоцитів хворих на еритремію збільшується порівняно зі здоровими донорами.

**А.С. Маслак, О.В. Костюк, Д.А. Минченко,
А.З. Бразалук., А.И. Шевцова, А.Г. Минченко**

СИАЛИРОВАННОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНОВ И ЭКСПРЕССИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ NEU1 И СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ST6GAL1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

Изучено содержание сиалилгликанов на поверхности мембраны лимфоцитов и экспрессии генов нейраминидазы NEU1 и сиалилтрансферазы ST6GAL1 в лимфоцитах больных эритремией, а также концентрацию сиаловых кислот в плазме крови, степень сиалированности α 1-кислого гликопротеина и фибронектина, тип связывания сиаловых кислот с их гликанами, который определяли с помощью сиалоспецифических лектинов MAA и SNA. Установлено, что содержание свободных сиаловых кислот в плазме крови и активность нейраминидазы увеличивались при эритремии по сравнению со здоровыми донорами на фоне снижения MAA-II-связывающей активности исследованных гликопротеинов. С помощью методов проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с использованием сиалоспецифических лектинов показано повышение экспонирования α 2,6- та α 2,3-сиалированных гликоконъюгатов на поверхности мембраны лимфоцитов у больных эритремией. При этом в лимфоцитах выявлено также повышение уровня экспрессии мРНК NEU1 и ST6GAL1. Полученные результаты раскрывают механизмы нарушения гликобиологических процессов при эритремии и могут содействовать разработке адекватных способов лечения этого заболевания.

Ключевые слова: сиалирование, гликопротеины, экспрессия генов, NEU1, ST6GAL1, лимфоциты, плазма, эритремия.

**H.S. Maslak¹, O.V. Kostyuk¹, D.O. Minchenko^{2,3},
O.Z. Brazaluk¹, A.I. Shevtsova¹, O.H. Minchenko²**

GLYCOPROTEIN SIALYLATION AND NEU1 AND ST6GAL1 EXPRESSIONS IN ERYTHREMIA DISEASE

We studied the levels of lymphocyte surface-associated sialylglycans and the expression of neuraminidase NEU1 and sialyltransferase ST6GAL1 genes in lymphocytes in erythremia patients and healthy donors as well as the levels of sialic acids in plasma and sialylation of alpha-acid glycoprotein and fibronectin. Moreover, we also investigated the type of sialic acids binding with its glycans using sialospecific lectins MAA and SNA. fibronectin protein in lymphocytes and its cell surface in erythremia disease as compared to healthy donors. It was shown that the levels of free sialic acids and neuraminidase

activity in plasma are increased in erythremia disease as compared to healthy donors; however, MAA-II-binding activity of tested glycoproteins is decreased. fibronectin-1 mRNA expression in lymphocytes is increased in patients with erythremia. The decreasing of plasma fibronectin concentration and its heparin-binding activity as well as increasing of lymphocyte content with surface-associated and intracellular fibronectin were revealed in erythremia disease in comparison with healthy donors. Positive correlation between plasma fibronectin level and its heparin-binding activity and negative correlation between plasma fibronectin level and quantity of lymphocytes which express fibronectin inside the cell and on cell surface was detected. Enhanced levels of α 2,3- and α 2,6-linked residues of glycoconjugates were detected on lymphocyte cell surface in erythremia disease using sialospecific lectins and flow cytometer as well as fluorescent confocal microscope. The level of NEU1 and ST6GAL1 mRNA expressions is significantly increased in lymphocytes in erythremia disease. Results of this study are clarified the mechanisms of disturbed in erythremia disease glycobiological processes and may therefore present new approaches for therapeutic opportunities. Key words: sialylation, glycoproteins, gene expressions, NEU1, ST6GAL1, lymphocytes, plasma, erythremia.

REFERENCES

1. Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. Sialylation is essential for early development in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2002 Apr 16; 99(8): 5267-5270.
2. Wang PH, Lee WL, Juang CM, Yang YH, Lo WH, Lai CR, Hsieh SL, Yuan CC. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. Gynecol Oncol 2005 Dec; 99(3): 631-9.
3. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr Protein Pept Sci 2007 Feb; 8(1): 91-108.
4. Orczyk-Pawilowicz M, Hirnle L, Katnik-Prastowska I. Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid alpha-1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies. Clin Chim Acta 2006 May; 367(1-2): 86-92.
5. Gunnarsson P, Fornander L, Pahlsson P, Grenegård M. Sialic acid residues play a pivotal role in alpha(1)-acid glycoprotein (AGP)-induced generation of reactive oxygen species in chemotactic peptide pre-activated neutrophil granulocytes. Inflamm Res 2010 Feb; 59(2): 89-95.
6. Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Rivera HN, Roman J. Extracellular matrix fibronectin increases prostaglandin E₂ receptor subtype EP4 in lung carcinoma cells through multiple signaling pathways : the role of AP-2. J Biol Chem 2007; 282(11): 7961-72.
7. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. J Cell Sci 2002 Oct 15; 115(Pt 20): 3861-3.
8. Pan D, Song Y. Role of altered sialylation of the I-like domain of β 1 integrin in the binding of fibronectin to β 1 integrin: thermodynamics and conformational analyses.

- Biophys J 2010 Jul 7; 99(1): 208-17.
9. Patel RY, Balaji PV. Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. Glycobiology 2006 Feb; 16(2): 108-16.
10. Miyagi T. Aberrant expression of sialidase and cancer progression. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2008; 84(10): 407-18.
11. Raval GN, Parekh LJ, Patel DD, Jha FP, Sainger RN, Patel PS. Clinics usefulness of alterations in sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in breast cancer. Indian J Clin Biochem 2004 Jul; 19(2): 60-71.
12. Katoh S, Maeda S, Fukuoka H, Wada T, Moriya S, Mori A, Yamaguchi K, Senda S, Miyagi T. A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. Clin Exp Immunol 2010 Aug; 161(2): 233-41.
13. Cross AS, Hyun SW, Miranda-Ribera A, Feng C, Liu A, Nguyen C, Zhang L, Luzina IG, Atamas SP, Twaddell WS, Guang W, Lillehoj EP, Puche AC, Huang W, Wang L-X, Passaniti A, Goldblum SE. NEU1 and NEU3 sialidase activity expressed in human lung microvascular endothelia: NEU1 restrains endothelial cell migration, whereas NEU3 does not. J Biol Chem 2012 May 4; 287(19): 15966-80.
14. Nakano V, Fontes Piazza RM, Avila-Campos MJ. A rapid assay of the sialidase activity in species of the bacteroides fragilis group by using peanut lectin gemagglutination. Anaerobe 2006 Oct-Dec; 12(5-6): 238-41.
15. Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Caro J, Komisarenko SV, Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. Biochimie 2005 Nov; 87(11): 1005-10.
16. Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. Am J Pathol 1991 Dec; 139(6): 1435-48.
17. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. Glycobiology. 2005 Dec; 15(12): 1332-40.
18. Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. Biochim Biophys Acta 2005 Aug 30; 1725(1): 128-35.
19. Nakano M, Takehi K, Tsai M, Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. Glycobiol 2003 May; 14(5): 431-441.
20. Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, Algueró MC, Dall'Olio F, Cabral MG, Trindade H. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. Glycoconj J. 2008 Apr; 25(3): 259-68.
21. Kątnik-Prastowska I, Kratz EM, Faundez R, Chelmońska-Soyta A. Lower expression of the alpha2,3-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. Clin Chem Labor Med 2006; 44(9): 1119-25.
22. Erat MC, Schwarz-Linek U, Pickford AR. Implications for collagen binding from the crystallographic structure of fibronectin 6FnI1-2FnII7FnI. J Biol Chem 2010 Oct 29; 285(44): 33764 -70.
23. Crostek L, Cylwik B, Krawiec A, Korcz W, Szmikowski M. Relationship between serum sialic acid and sialylation glycoproteins in alcoholics. Alcohol Alcoholism 2007 Nov-Dec; 42(6): 588-92.
24. Uemura T, Shiozaki K, Yamaguchi K, Miyazaki S, Satomi S, Kato K, Sakuraba H, Miyagi T. Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. Oncogene. 2009 Mar 5; 28(9): 1218-29.
25. Nanetti L, Vignini A, Raffaelli F, Taffi R, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Sialic acid and sialidase activity in acute stroke. Dis Markers 2008; 25(3): 167-73.
26. Sönmez H, Süer S, Güngör Z, Baloglu H, Kökçü E. Tissue and serum sialidase levels in breast cancer. Cancer Lett 1999 Feb 8; 136(1): 75-8.
27. Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Hata K. Sialidase and malignancy: a minireview. Glycoconj J 2004; 20(3): 189-98.
28. Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Shiozaki K, Sato I, Kakugawa Y, Yamanami H, Fujiya T. Human sialidase as a cancer marker. Proteomics 2008 Aug; 8(16): 3303-11.
29. Hedlund M, Hg E, Varki A, Varki NM. Alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. Cancer Res 2008 Jun 15; 68(2): 388-94.
30. Vakonakis I, Staunton D, Ellis IR, Sarkies P, Flanagan A, Schor AM, Schor SL, Campbell ID. Motogenic sites in human fibronectin are masked by long range interactions. J Biol Chem. 2009 Jun 5; 284(23): 15668-75.

Дніпропетров. нац. мед. академія МОЗ України;
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ
E-mail: ominchenko@yahoo.com

Матеріал надійшов
до редакції 17.03.2014

**В.І. Портніченко, В.І. Носар, О.О. Гончар, Г.В. Опанасенко, І.Д. Глазирін,
І.М. Маньковська**

Фазові зміни енергетичного обміну при адаптації до іммобілізаційного стресу

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; Міжнарод. центр астрон. та мед.-
екол. досліджень НАН України, Київ; E-mail: vport@biph.kiev.ua*

При стресі страждають органи і тканини організму, а також порушується бар'єрна функція легень. Це призводить до синдрому «стресових легень» і порушення доставки кисню до тканин організму, а також до гіпоксії. Метою дослідження було визначити динаміку споживання кисню, глікемії, температури тіла, стану окисидантної й антиоксидантної систем, мітохондріального дихання при хронічному стресі (6-годинна іммобілізація щодня протягом 3 тиж) у 42 самців лінії Вістар масою 340–380 г. Виявлено 4 фази змін енергетичного обміну при хронічному стресі. У першій фазі спостерігали нестабільність окиснювального метаболізму, зменшення окиснення НАД-залежних субстратів, але, на відміну від періодичної гіпоксії, суттєве підвищення окиснення ФАД-залежних субстратів не було, знижувалося роз'єднання дихального контролю (РДК). Підвищується активність супероксиддисмутази, однак це відбувається на тлі зниження активності глутатіонпероксидази, виникає дисбаланс антиоксидантної системи. Після 7-го сеансу іммобілізації зрушується енергетичний обмін (друга фаза) і розвивається третя фаза, гіперметаболічна, яка характеризується поступовим зростанням окиснювального метаболізму. Збільшується раніше пригнічене окиснення НАД-залежних субстратів, РДК, покращується баланс співвідношення анти- та прооксидантної систем. Четверта фаза починається після 15-ї іммобілізації і характеризується розвитком виражених адаптивних реакцій з посиленням толерантності енергетичного обміну до впливу стресу. Отримані результати корелювали зі змінами вмісту кортикостерону в крові щурів. Таким чином, виявлено фазові закономірності динаміки кисневої частини енергетичного метаболізму при хронічному стресі.

Ключові слова: гострий стрес, хронічний стрес, енергетичний метаболізм, перекисне окиснення ліпідів, кортикостерон.

ВСТУП

Енергетичний обмін – один із одним із основних елементів функціонування організму людини та тварин. Він визначає інтенсивність роботи різних тканин і систем, а також доставки кисню до клітин організму, характеризує здатність клітин виконувати свої специфічні функції [1].

Серед найбільш відомих метаболічних відповідей організму на стрес є порушення кисневого гомеостазу, яке активує вільнорадикальні процеси [2, 3]. Встановлено [3,

4], що головним фактором, котрий викликає ураження тканин організму при стресі, – надлишок перекисних сполук у крові. Саме вони пошкоджують тканини легень, зменшують кількість і якість сурфактанту, що призводить до підвищення ригідності легеневої тканини та виникнення синдрому «стресових легень», гіпоксемії та зменшення доставки кисню до тканин організму. Внаслідок цього виникає своєрідний гіпоксичний стан, який за патогенезом можна розглядати як респіраторно-циркуляторний з можливою вторинною тканинною гіпоксією [5].

© В.І. Портніченко, В.І. Носар, О.О. Гончар, Г.В. Опанасенко, І.Д. Глазирін, І.М. Маньковська

При розвитку гіпоксичного стану найбільше страждає мітохондріальний апарат клітин. Літературні дані щодо особливостей мітохондріального дихання при хронічному стресі поодинокі. Особливо недостатньо вивчені зміни використання мітохондріями НАД- і ФАД-залежних субстратів окиснення у першому та другому мітохондріальних комплексах відповідно у різні часові проміжки дії хронічного стресорного подразника. Відомо, що при порушеннях роботи мітохондріального електронно-транспортного ланцюга активуються вільнорадикальні процеси [6]. Проте, незважаючи на велику кількість досліджень, недостатньо з'ясована як функціональна активність анти- —прооксидантної системи та її зв'язок з роботою мітохондрій, так і збалансованість цих систем у динаміці стресу.

Раніше нами було показано [7], що при періодичній гіпоксії у лабораторних щурів виникають фазові зміни енергетичного обміну. Треба зазначити, що стресовий і гіпоксичний впливи на організм можуть мати певну подібність з огляду на порушення кисневого гомеостазу [2, 4].

Метою нашого дослідження було встановити закономірності фазових змін енергетичного обміну, мітохондріального дихання та перекисного окиснення ліпідів при хронічному стресі.

МЕТОДИКА

Для виявлення фізіологічних закономірностей зміни дихання, газообміну, альвеолярної вентиляції, температури тіла та вмісту глюкози в крові використана модель хронічного іммобілізаційного стресу середнього ступеня важкості за показниками активності глюкокортикоїдної функції кори надниркових залоз [5]. Для цього 42 щури лінії Вістар віком 6 міс, масою 340–380 г були вміщені у плексигласові камери, які не заважають диханню, але жорстко обмежують рухи тварин. Іммобілізацію проводили щодня протягом 6 год у ранковий

час, фізіологічні дослідження – до та після 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 15 і 19-го сеансу іммобілізації.

Усі маніпуляції з тваринами виконували відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1986) та положенню Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Показники зовнішнього дихання та газообміну вивчали за допомогою автоматизованої установки [8]. Ректальну температуру тіла вимірювали електротермометром для дрібних лабораторних тварин. Вміст глюкози визначали на глюкометрі Accutrend Plus (Німеччина), кров для проби забирали з кінчика хвоста.

Для виключення впливу циркадіанних коливань фізіологічних показників паралельно з цією групою тварин у лабораторії постійно перебувала інтактна (контрольна) група. Значення показників дихання, температури та концентрації глюкози у крові вимірювали одночасно в обох групах протягом усього дослідження. Розраховували відносні показники співвідношення дослідної та інтактної груп, виражені у відсотках.

Зразки тканин відбирали через 24 год після сеансу іммобілізації. Мітохондрії печінки виділяли методом диференціального центрифугування в умовах, за яких зберігалися їх нативні властивості [9]. Дихання й окисне фосфорилування досліджували полярографічним методом [10]. Середовище виділення містило (ммоль/л): KCl – 120, HEPES – 10, K₂CO₃ – 2, EDTA – 10; бичачого сироваткового альбуміну (BCA) – 0,05 % (pH 7,2). Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120, HEPES – 10, NaH₂PO₄ – 5. Використовували такі субстрати окиснення: сукцинат – 1 ммоль/л і ротенон – 2 мкмоль/л; глутамат – 3 ммоль/л і малат – 2,5 ммоль/л; пальмітоіл – l-карнітин – 25 мкмоль/л і малат – 2,5 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 200 мкмоль/л аденозидифосфату (АДФ). Швидкість роз'єданого дихального контролю (РДК) вимірювали при додаванні роз'єднувача СССР (2 мкмоль/л). Розрахо-

ували швидкість фосфорилування (V3) і контрольованого дихання (V4), дихальний контроль (V3/V4) [9, 10], коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) [11]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Мітохондрії з печінки для вивчення прота антиоксидантного балансу отримували методом диференційного центрифугування, згідно з відомою методикою. Середовище виділення містило (ммоль/л): сахарози – 250, EDTA – 1, тріс-НСІ – 10 мм, БСА – 0,5 %; (рН 7,6). Мітохондрії відмивали тим самим середовищем, але без EDTA та БСА. Всі маніпуляції проводили при 4 °С. Вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК – РП), визначали на спектрофотометрі СФ-46 (Росія), згідно з Buege [12], перекису водню – згідно з Huwiler [13]. Активність супероксиддисмутази у мітохондріях печінки досліджували за Misra [14], глутатіонпероксидази – за вмістом віднов-

леного глутатіону на 1 мг білка при довжині хвилі 412 нм за Olinescu [15]. Концентрацію кортикостерону в плазмі крові визначали за флуориметричним методом Балашова [16].

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програмного пакета “V-STAT”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив хронічного стресу на енергетичний обмін віддзеркалюють зміни швидкості споживання кисню у спокої (VO_2). Вихідні значення в контрольній і дослідній групі вірогідно не відрізнялися ($15,81 \pm 1,32$ і $13,91 \pm 1,62$ м · хв⁻¹ · кг⁻¹ відповідно; рис. 1). Після 1-го сеансу іммобілізації (гострий стрес) значення VO_2 вірогідно зростало і через добу також залишалося підвищеним щодо вихідного рівня, а після 2-го – дещо знижувалося. Перед 3 і 8 сеансом цей показник залишався на вихідному рівні, однак після стресу спостерігалось

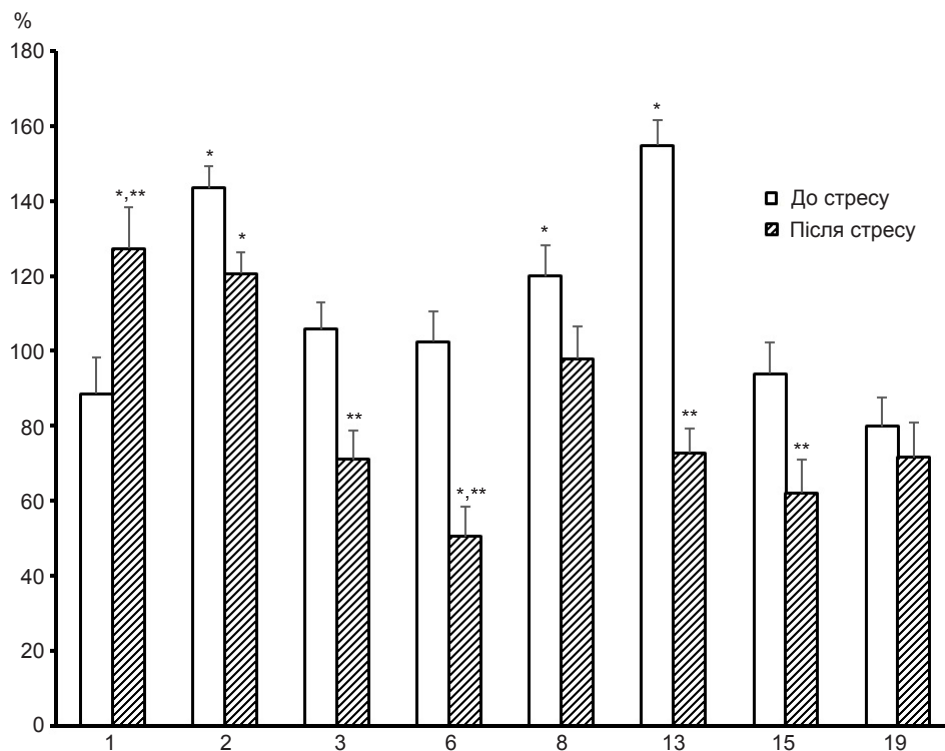


Рис. 1. Споживання кисню у щурів до і після сеансів хронічного стресу (1–19 – номери сеансів іммобілізації). * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем до першого сеансу, ** $P < 0,05$ до та після сеансу іммобілізації

значне його зниження. Наступна суттєва зміна енергетичного обміну відбувалося після 8-го і продовжувалося до 13-го сеансу. Вона характеризувалася значним зростанням VO_2 перед сеансами іммобілізації. Його зниження після сеансу було менш виражено в цей часовий проміжок. Остання перебудова енергетичного обміну виникає після 15-го і продовжується до 19-го сеансу. Спостерігалось зниження споживання кисню до вихідного рівня і поступове нівелювання реакції VO_2 на дію стресу.

Ректальна температура (рис. 2) в контрольній і дослідній групах була $37,25 \pm 0,09$ і $37,38 \pm 0,07$ °C відповідно і вірогідно не відрізнялася. Після 1-го сеансу іммобілізації вона знижувалася, як і VO_2 . В подальшому перед сеансом ректальна температура знижувалась, а після іммобілізації відбувалася гіпертермічна реакція на стрес. Після 15-го сеансу температурної реакції не було.

Одержані результати дали змогу виділити фазові зміни енергетичного обміну під час

іммобілізаційного стресу, які загалом були схожі на виділені нами раніше при періодичному гіпоксичному тренуванні [7]: гіпометаболічну (1–6-й сеанси), перехідну (6–8-й сеанси), гіперметаболічну (8–13-й сеанси) і адаптаційну (13–19-й сеанси). Проте були виявлені і суттєві відмінності, які проявлялися у менш виражених змінах споживання кисню у першій і третій фазах, гіпертермічній реакції на сеанс іммобілізації (за виключенням першого) тощо. Це може свідчити про менший внесок саме гіпоксичної компоненти в механізми змін енергетичного метаболізму при хронічному стресі.

Вміст глюкози у крові перед початком іммобілізації в контрольній і дослідній групах був $5,95 \pm 0,21$ і $6,21 \pm 0,19$ ммоль/л відповідно та вірогідно не відрізнявся. Після першого стресу підвищувалася глікемія. Надалі збільшувався вміст глюкози в крові після кожної іммобілізації аж до 8-го сеансу. Однак понад контрольні значення він не зростав внаслідок гіпоглікемії, яка спостерігалася перед

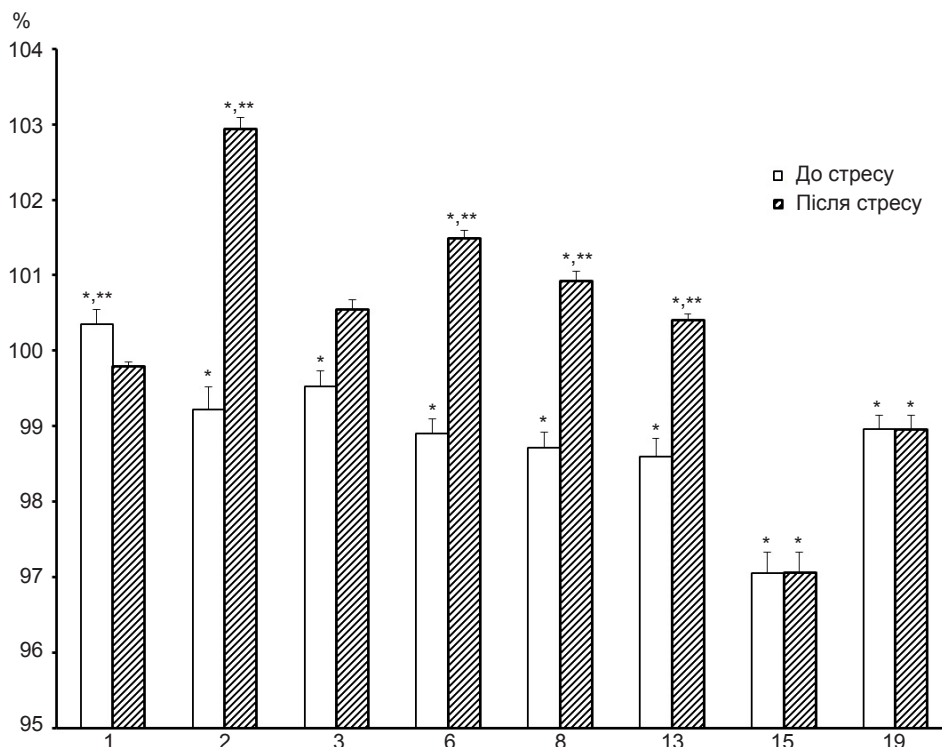


Рис. 2. Зміни ректальної температури у щурів при хронічному стресі (1–19 – номери сеансів іммобілізації). * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем до першого сеансу, ** $P < 0,05$ до та після сеансу іммобілізації

сеансами. З 8-го по 13-й сеанси вміст глюкози в крові підвищувався перед сеансами, а після них не змінюється. Після 13-го сеансу відбувалася вже гіпоглікемічна реакція. З 15-го – концентрація глюкози в крові знову знижувалася, і реакції на сеанс не було зареєстровано (рис. 3).

Відомо, що на швидкість дихання мітохондрій можуть впливати кортикостероїдні гормони [17–19]. У разі підвищення їх вмісту у крові зменшується активність І мітохондріального комплексу та мітохондріальних ферментів. При цьому знижується V3 і зменшується ефективність використання кисню при різних субстратах. Після 1-ї та 3-ї доби збільшується вміст кортикостерону у крові до $1,48 \pm 0,06$ і $1,62 \pm 0,08$ мкмоль/л відповідно, що вірогідно вище контролю ($1,29 \pm 0,05$ мкмоль/л). Після 7-ї і особливо 14-ї доби його вміст зменшується до $0,91 \pm 0,04$ і $0,69 \pm 0,04$ мкмоль/л відповідно $P < 0,05$ нижче від контрольного. З цим пов'язані і зміни показників мітохондріального дихання. Після триразо-

вого 6-годинного іммобілізаційного впливу спостерігали тенденцією до підвищення сукцинатзалежного шляху окиснення в мітохондріях печінки щурів, яка виражалася у збільшенні V3 на 13 % порівняно з контролем. При цьому НАД-залежний шлях надходження відновних еквівалентів у дихальний ланцюг пригнічувався і енергопродукція зменшувалася, про що свідчить різке зниження V3 (на 18 %, рис. 4), зменшення V3/V4 (на 12 %, рис. 5), ефективності АДФ/О (на 19,4 %, рис. 6), а також резерву дихальної активності на 11 % відносно контролю.

Після 7-го сеансу іммобілізації інтенсивність окисного фосфорилування у всіх метаболічних станах при окисненні ФАД-залежного субстрату сукцинату утримувалася на рівні контролю. При окисненні мітохондріями печінки НАД-залежних субстратів достовірно підвищувалася тільки V3 відносно контролю.

Продовження іммобілізації призводить до зростання ролі НАД-залежного окиснення в

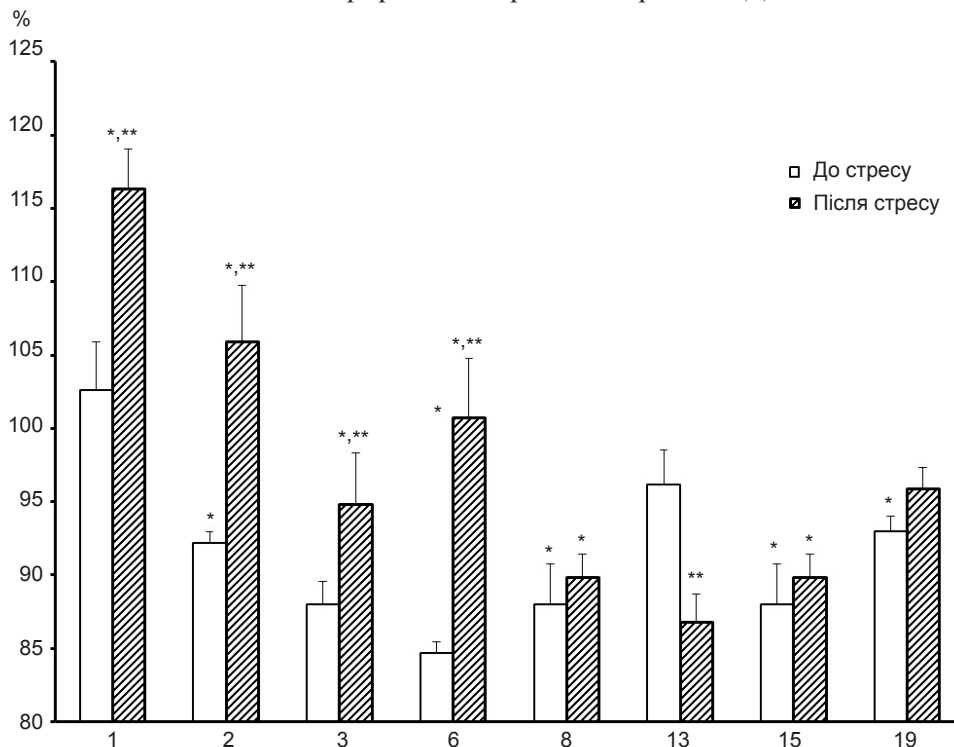


Рис. 3. Зміни вмісту глюкози у крові щурів у динаміці хронічного (1–19 – номери сеансів іммобілізації). * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем до першого сеансу, ** $P < 0,05$ до та після сеансу іммобілізації

енергетичному обміні, що чітко проявляється після 12-го сеансу іммобілізації. Одночасно з цим збільшується і резерв дихальної активності (на 12 %) порівняно з контролем. Активність сукцинатного шляху окиснення при цьому достовірно не відрізняється від контролю.

У результаті подальших іммобілізацій (до 19-го сеансу) показники мітохондріального дихання наближалися до контрольних значень. Виключення становили показники ДК, АДФ/О, РДК, які при окисненні НАД-залежних субстратів залишалися підвищеними.

Моделювання гострого 6-годинного іммобілізаційного стресу супроводжується посиленням окисдавативних процесів у мітохондріях печінки (рис. 7), про що свідчить зростання продуктів ПОЛ на 59 %, а також

збільшення вмісту перекису водню на 34 % порівняно з контролем ($P<0,05$). Про дисбаланс антиоксидантної системи свідчить підвищення активності супероксиддисмутази (на 39 %, $P<0,05$) при значному зниженні активності глутатіонпероксидази (на 32 %, $P<0,05$). Така неузгодженість у дії ферментативної ланки антиоксидантного захисту зазвичай призводить до надлишкової продукції пероксидів з їх ушкоджувальним впливом на мембранні структури та активність інших ферментів [20]. Численні дані свідчать, що вплив стресорного чинника викликає структурні і функціональні ушкодження в тканині печінки. Зокрема, порушується артеріальний кровотік, що спричинює гіпоксію гепатоцитів і посилення ПОЛ з наступним пошкодженням мітохондрій і некрозом клітин печінки [21, 22].

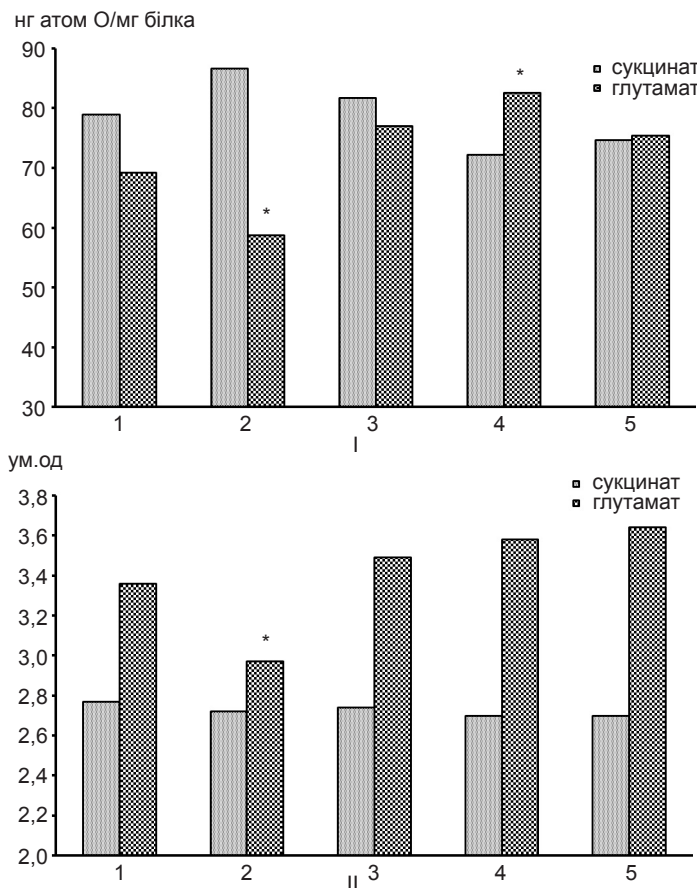


Рис. 4. Зміни показників дихання мітохондрій у стані V3 (I) і V3/V4 (II) в динаміці хронічного стресу (1 – контроль, 2 – 3-тя доба після початку стресу, 3 – 7-ма доба, 4 – 12-та доба, 5 – 12-та доба). * $P<0,05$ порівняно з вихідним рівнем до першого сеансу

Зміна показників анти- —прооксидантного гомеостазу на 7-му добу застосування стресорних впливів може бути пов'язана зі зменшенням вмісту глюкокортикоїдів у крові і свідчить про розвиток пристосування анти- —прооксидантної системи до впливу стресу. Інтенсивність ПОЛ та активність супероксиддисмутази утримуються на рівні контролю (таблиця). При цьому вміст H_2O_2 і, як наслідок, активність глутатіонпероксидази залишаються вище від контрольних значень на 13 і 18 % ($P<0,05$) відповідно. Відомо, що глутатіонпероксидаза має значно більшу спорідненість до перекису водню, ніж каталаза, що і визначає її першочергове значення у захисті клітинних структур від активних метаболітів кисню [21]. Зазвичай її активність прогресивно зростає залежно

від кількості ліпопероксидів, що утворилися [21]. Цю тенденцію ми спостерігаємо на 14-ту добу стресорного впливу. Так, у мітохондріях печінки вміст H_2O_2 збільшується на 22 % , а ТБК – РП – на 32 % порівняно з контролем ($P<0,05$). Активність ферментів першої лінії антиоксидантного захисту підвищується узгоджено (супероксиддисмутаза – на 20 %; глутатіонпероксидаза – на 27 % порівняно з контролем, $P<0,05$). На 19-ту добу експерименту в показниках вільнорадикальних процесів та активності глутатіонпероксидази зберігається лише тенденція до підвищення, при цьому активність супероксиддисмутази – до зниження.

Таким чином, фазові зміни енергетичного обміну пов'язані зі впливом стрес-гормонів на мітохондріальний апарат клітин. У першій

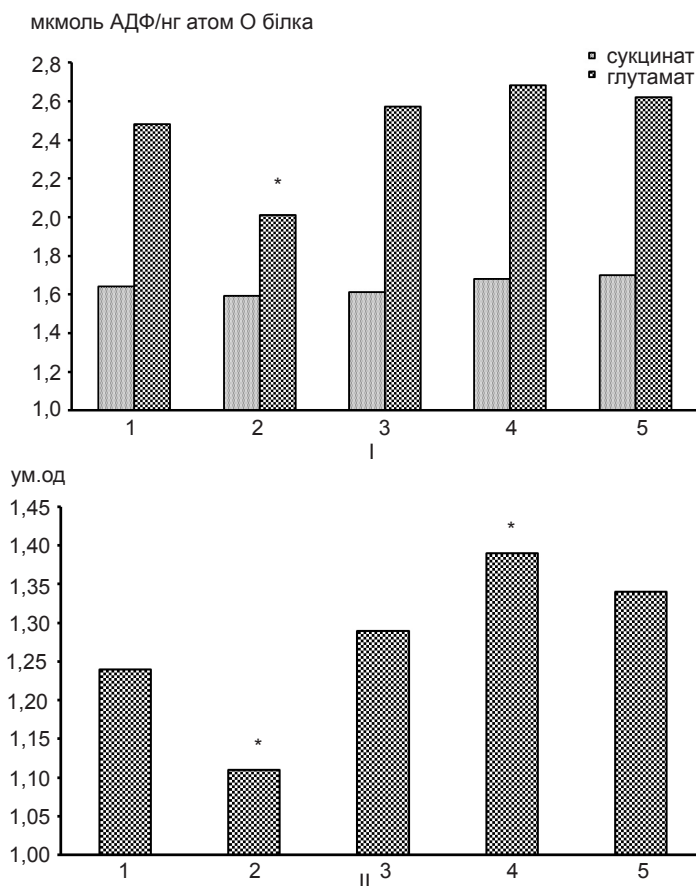


Рис. 5. Зміни показників дихання мітохондрій і ефективності використання кисню НАДФ/О (I) і РДК (II) в динаміці хронічного стресу (1 – контроль, 2 – 3-тя доба після початку стресу, 3 – 7-ма доба, 4 – 12-та доба, 5 – 19-та доба). * $P<0,05$ порівняно з вихідним рівнем

Анти- –прооксидантний гомеостаз у динаміці хронічного стресу у щурів

Показник	Контроль	6 год	3 доби	7 діб	14 діб	19 діб
Вміст тіобарбітурової кислоти – АП	2,25±0,15	3,59±0,16*	3,10±0,10*	2,47±0,11	2,97±0,12*	2,56±0,15
Вміст H ₂ O ₂	4,40±0,19	5,93±0,23*	5,75±0,17*	4,97±0,18*	5,38±0,15*	4,55±0,25
Активність супероксид-дисмутази	3,62±0,17	5,04±0,22*	4,71±0,20*	3,89±0,15	4,35±0,11*	3,25±0,18
глутатіон пероксидази	3,2±0,13	2,42±0,15*	3,51±0,15*	3,77±0,20*	4,05±0,19*	3,65±0,17

*P<0,05 порівняно з вихідним рівнем.

фазі окиснення НАД-залежних субстратів, знижується однак, на відміну від періодичної гіпоксії, суттєвого підвищення окиснення ФАД-залежних субстратів не спостерігається, знижується РДК. При цьому сповільнюється потік електронів по дихальному ланцюгу і активується ПОЛ, збільшується вміст перекису водню, паралельно зростає активність супероксиддисмутази, однак це відбувається на фоні зниження активності глутатіонпероксидази і виникає дисбаланс антиоксидантної системи. Після 8-го сеансу іммобілізації, приблизно в той самий часовий проміжок енергетичний обмін переключається (друга фаза) і настає третя фаза, яка характеризується зростанням окиснювального метаболізму, що найбільш чітко проявляється після 12-го сеансу іммобілізації. Вона характеризується збільшенням раніше пригнічених НАД-залежних субстратів, РДК і балансом показників співвідношення анти- і прооксидантної систем, які залишаються підвищеними. Четверта фаза починається після 15–19-го сеансу іммобілізації, характеризується розвитком виражених адаптивних реакцій на зразок повної толерантності енергетичного обміну до впливу стресу. При цьому в мітохондріях дещо підвищуються показники окиснення НАД-залежних субстратів, РДК на тлі нормалізації значень анти- та прооксидантної систем.

ВИСНОВКИ

1. Вплив хронічного стресу характеризується фазовими змінами енергетичного обміну, які значною мірою зумовлені зміною вмісту кортикостерону та його впливом на мітохондріальний апарат клітин.

2. Основні зміни роботи дихального ланцюга пов'язані з пригніченням НАД-залежних субстратів, в той час як ФАД-залежні субстрати суттєво не змінюються, на тлі гальмування току електронів по дихальному ланцюгу підвищується ПОЛ, при цьому посилюється активність антиоксидантної системи. Початковий розлад цих систем змінюється повним їх балансуванням.

3. Розвиток адаптивної фази супроводжується підвищенням толерантності енергетичного обміну до стресорного впливу.

В.И. Портниченко, В.И. Носарь, А.А. Гончар, Г.В. Опанасенко, И.Д. Глазырин, И.Н. Маньковская

ФАЗОВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПРИ АДАПТАЦИИ К ИММОБИЛИЗАТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

При стрессе наблюдаются повреждения органов и барьерных функций тканей перекисными соединениями липидов, возникает синдром «стрессорного легкого» и нарушается доставка кислорода к тканям. На 42 самцах крыс линии Вистар, массой 340–370 г исследовали изменения газообмена, гликемии, температуры тела, показателей

функции оксидантной и антиоксидантной систем, а также митохондриального дыхания по Чансу при хроническом стрессе (6-часовая иммобилизация ежедневно в течение 3 нед). Выделены 4 фазы изменений энергетического обмена в динамике хронического стресса. В первой фазе наблюдается нестабильность окислительного метаболизма, снижение окисления НАД-зависимых субстратов, однако, в отличие от периодической гипоксии, существенного повышения окисления ФАД-зависимых субстратов не наблюдается, снижается РДК. Растет активность супероксиддисмутазы, это происходит на фоне снижения активности глутатионпероксидазы, и возникает дисбаланс антиоксидантной системы. После 7-й иммобилизации энергетический обмен переключается (вторая фаза) и развивается третья фаза, гиперметаболическая, которая характеризуется постепенным ростом окислительного метаболизма. Увеличивается ранее подавленное окисление НАД-зависимых субстратов, РДК, улучшается баланс соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем. Четвертая фаза начинается после 15-й иммобилизации и характеризуется развитием выраженных адаптивных реакций с усилением толерантности энергетического обмена к воздействию стресса. Полученные результаты коррелировали с изменениями динамики содержания кортикостерона в крови крыс. Таким образом, обнаружены фазовые закономерности изменений кислородной части энергетического метаболизма при хроническом стрессе. Ключевые слова: хронический стресс, энергетический метаболизм, перекисное окисление липидов, митохондриальное дыхание, кортикостерон

**V.I. Portnichenko, V.I. Nosar, O.A. Gonchar,
G.V. Apanasenko, I.G. Glazyrin, I.N. Mankovskaya**

PHASE CHANGES OF ENERGY METABOLISM DURING ADAPTATION TO IMMOBILIZATION STRESS

In stress, it was showed the organ and tissue changes associated with damage by lipid peroxides, and the disrupted barrier function. As a consequence, it was to lead to a syndrome of "stress-induced lung" and violation of oxygen delivery to the tissues and hypoxia. Purpose of the study was to investigate the dynamics of changes in gas exchange, blood glucose, body temperature, oxidant and antioxidant system activity, as well as mitochondrial respiration by Chance under the influence of chronic stress (6-hour immobilization daily for 3 weeks). It was identified 4 phase changes of energy metabolism in the dynamics of chronic stress. In the first phase, hypometabolic, instability oxidative metabolism, decreased oxidation of NAD-dependent substrates, significant elevation of FAD-dependent substrates oxidation and low MRU were found. The activity of superoxide dismutase (MnSOD) was increased; it was occurred on a background low activity of glutathione peroxidase, and of misbalanced antioxidant system. After seven immobilizations, second phase - shift in energy metabolism, was observed, and

then the third phase (hypermetabolic) started. It was characterized by gradual increase in oxidative metabolism, the restoration of oxidation of NAD-dependent substrates, MRU, as well as optimizing balance of oxidant and antioxidant systems. The fourth phase was started after 15 immobilizations, and characterized by the development of adaptive reactions expressed in increased tolerance of energy metabolism to the impact of immobilization. The results are correlated with changes in the dynamics of blood corticosterone. Thus, it was found the phase character of the energy metabolism rebuilding during the chronic stress.

Key words: Acute stress, chronic stress, energy metabolism, lipid peroxidation, mitochondrial respiration, corticosterone

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

ICAMER, NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9493-98.
2. Meerson FZ, Pshennikova MG. Adaptation to the stress situations and to physical loads. Moscow: Medicina;1988 [Russian].
3. Baraboy VA, Reznikov OG. [Physiology, biochemistry, and psychology of stress]. Kyiv: Interservice; 2013 [Ukrainian].
4. Meerson F, Pozharov V, Minyailenko T. Superresistance against hypoxia after preliminary adaptation to repeated stress. *J Appl Physiol* 1994 May;76(5):1856-61.
5. Opanasenko AV, Bakunovsky AN, Nosar VI, Rozova EV, Frantsuzova SB, Mankovskaya IN. Effect of Actovegin on the oxygen regime and regional blood flow in the periodontum tissues under immobilization stress. *Farmakologia ta Likarska Toksikologia* 2013;34(3):47-53 [Ukrainian].
6. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11(4):341-46.
7. Portnichenko VI, Nosar VI, Portnychenko AG, Drevitskaya TI, Sydorenko AM, Mankovska IN. Periodic hypoxia influences energy metabolism in phasic way. *Intern J Physiol Pathophysiol* 2013;4(1):55-68.
8. Pozharov VP. Automatic installation for measuring the volume-time parameters of external respiration and gas exchange in small laboratory animals. *Fiziol Zh* 1989 Jul-Aug;35(4):119-21 [Russian].
9. Kondrashova MN, Fedotcheva NI, Saakyan IR, Sirota TV, Lyamzaev KG, Kulikova MV, Temnov AV. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. *Mitochondrion* 2001 Oct;1(3):249-67.
10. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem*. 1955 Nov;217(1):383-93.

11. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP:O ration. *Methods Enzymol.* 1967;10:41-7.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
13. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem.* 1984 May 15;141(1):69-74.
14. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
15. Olinescu R, Nita S. Influence of hemoproteins on glutathion peroxidase activity. *Rev Rom Biochem.* 1973;10:119-29.
16. Balashov IuG. A fluorimetric micromethod for determining corticosteroids: a comparison with other methods. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 1990 Feb;76(2):280-83 [Russian].
17. Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malhiery Y, Ritz P. Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br J Nutr.* 2003 Nov;90(5):969-77.
18. Tang VM, Young AH, Tan H, Beasley C, Wang JF. Glucocorticoids increase protein carbonylation and mitochondrial dysfunction. *Horm Metab Res.* 2013 Sep;45(10):709-15.
19. Jani MS, Telang SD, Katyare SS. Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991 May;38(5):587-91.
20. Hayes J, McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999 Oct;31(4):273-300.
21. Davydov VV, Zakharchenko IV, Ovsyannikov VG. Free radical processes in the liver of adult and old rats during stress. *Bull Exp Biol Med.* 2004 Feb;137(2):139-42 [English, Russian].
22. Sies H, Moss K. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem.* 1978 Mar 15;84(2):377-83.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр астроном. та мед.-екол. досліджень НАН
України, Київ
E-mail: vport@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.03.2014*

О.В. Коломієць, Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович

H^+ – Ca^{2+} -обмінник у мітохондріях міомеріа: модуляція екзо- та ендogenousними сполуками

Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ. E-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Досліджені властивості ΔpH -індукованого транспорту Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій міомеріа цурів. Акумуляція Ca^{2+} здійснювалася за наявності Mg -АТФ $^{2-}$ та сукцинату. Транспорт іонів Ca реєстрували із використанням кальційчутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ. Показано, що закиснення позамітохондріального середовища стимулює вивільнення Ca^{2+} із мітохондрій. Цей процес нечутливий до відносно специфічного інгібітора Na^+ – Ca^{2+} -обмінника внутрішньої мембрани мітохондрій тетрафенілфосфонію, але гальмується за наявності моноклональних антитіл проти протеїну LETM1 (анти-LETM1). Протеїн LETM1 в деяких тканинах є молекулярною основою функціонування H^+ – Ca^{2+} -обмінника мітохондрій. Встановлено, що H^+ – Ca^{2+} -обмінник стимулювався діуретиком амілоридом (100 мкмоль/л) та пригнічувався іонами Mg у мілімолярних концентраціях. Досліджувана транспортна система також стимулювалася макроциклічними сполуками каліксаренами (C-97 та C-99) у субмікромолярних концентраціях, але була абсолютно резистентна до дії оксиду азоту (нітропрусиду та нітриту натрію). Отже, мітохондрії міомеріа цурів, вірогідно, не мають системи Na^+ – Ca^{2+} -обміну, а забезпечують підтримання кальцієвого гомеостазу матриксу за допомогою H^+ – Ca^{2+} -обмінника. Останній високоафінно стимулюється каліксаренами, що робить перспективними подальші дослідження щодо закономірностей впливу цих сполук на транспортний процес.

Ключові слова: H^+ – Ca^{2+} -обмінник, протеїн LETM1, мітохондрії, каліксарени, міомеріа.

ВСТУП

Мітохондріям належить провідне значення в фізіології еукаріотних клітин. Вони забезпечують енергією метаболічні процеси, зумовлюють і контролюють їхнє протікання та відіграють головну роль у механізмах клітинної загибелі. Мітохондріальна дисфункція лежить в основі виникнення численних патологічних процесів – від порушень серцево-судинної системи до виникнення новоутворень; в останні роки навіть використовують таку дефініцію, як «мітохондріальні хвороби» [1–4].

Іони Ca відіграють важливу роль у функціонуванні мітохондрій. З одного боку, зміни концентрації Ca^{2+} в матриксі регулюють власну метаболічну активність органел. З іншого – кальційтранспортні системи мітохондрій

значною мірою зумовлюють термінацію кальцієвого транз'єнта в клітинах. Збільшення концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій активує синтез аденозинтрифосфату (АТФ) та ензимами циклу трикарбонових кислот, водночас перевантаження органел катіоном індукуює клітинну загибель. В основі регуляції концентрації Ca^{2+} у мітохондріях лежить узгоджене функціонування систем, які забезпечують енергозалежну акумуляцію катіона та його вивільнення з матриксу в цитозоль [1, 5–9].

Основною системою акумуляції Ca^{2+} енергізованими мітохондріями є кальцієвий уніпортер їхньої внутрішньої мембрани, який забезпечує накопичення катіона за електрофоретичним механізмом (від англ. MCU, mitochondrial Ca^{2+} uniporter). Ця транспортна система модулюється протеїном MICU1 (від

© О.В. Коломієць, Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович

англ. mitochondrial Ca²⁺ uptake 1) і відносно специфічно інгібується рутенієвим червоним. У внутрішній мембрані мітохондрій функціонують також обмінники Na⁺–Ca²⁺ і H⁺–Ca²⁺, які забезпечують вивільнення Ca²⁺ із матриксу і нечутливі (або малочутливі) до рутенієвого червоного. В залежності від значення рН та співвідношення концентрації Ca²⁺ в матриксі та цитозолі H⁺–Ca²⁺-обмінник може функціонувати як в аверсному, так і реверсному режимах. В останньому він забезпечує акумуляцію Ca²⁺ з цитозолу за відносно низьких концентрацій катіона (субмікромолярних), на відміну від низькоафінного MCU. Перевантаження іонами Ca та деенергізація мітохондрій супроводжуються відкриванням пори перехідної провідності, через яку також може здійснюватись транспорт катіонів [7–12].

Скорочення гладеньких (тонічних) м'язів значною мірою підтримуються процесами окисного метаболізму та супроводжуються окисненням жирних кислот та ацетоацетату. При цьому важливе значення, на відміну від скелетного м'яза, в забезпеченні енергією для контрактильної активності відіграє цикл трикарбонових кислот. Це вказує на неабияку роль мітохондрій у функціонуванні гладенького м'яза і важливість систем регуляції кальцієвого гомеостазу органел [13, 14]. Передбачається суттєве значення мітохондрій у забезпеченні «правого плеча» кальцієвого транзєнта в міоцитах [15, 16]. В гладенькому м'язі матки (міометрії) дослідження із використанням лазерної конфокальної мікроскопії продемонстрували досить щільне розташування мітохондрій в матриксі, які можуть утворювати структури на кшталт мітохондріального ретикулума [17].

У клітинах гладенького м'яза матки потенціал дії забезпечується значною мірою вхідним Ca²⁺, а не натрієвим струмом [15]. У сарколемі міоцитів матки зареєстрована висока активність незалежної від Ca²⁺ Mg²⁺-АТФази, функція якої може полягати в продукуванні H⁺ у міоплазму [18]. Ці дані свідчать

про першочергову роль саме H⁺–Ca²⁺-обмінника в мітохондріях клітин гладенького м'яза, зокрема міометрія. Аналогічна транспортна система функціонує також у клітинах печінки та нирок [19]. У наших попередніх дослідженнях, проведених на ізольованих мітохондріях міометрія щурів, продемонстрована наявність системи зворотного H⁺–Ca²⁺-обміну (ΔpH-залежного транспорту іонів Ca), який не залежав від градієнтів іонів Na та K, активувався за фізіологічних значень рН (рН_а ≈ 7,0) і здійснювався в стехіометрії 1:1 [20]. Але питання ідентифікації білка-транспортера, який забезпечує H⁺–Ca²⁺-обмін у мітохондріях міоцитів матки та пошуку ефективних модуляторів цього процесу, не з'ясоване.

Метою нашої роботи було встановити природу H⁺–Ca²⁺-обміну в ізольованих мітохондріях міометрія щурів і дослідити вплив на цей обмін вибраних органічних та неорганічних ендогенних/екзогенних модуляторів транспортних процесів у гладенькому м'язі.

МЕТОДИКА

Одержання фракції мітохондрій міометрія. Препарат ізольованих мітохондрій отримували із міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування, як описано раніше [6]. Тварин наркотизували інгаляцією діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після видалення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, препарат тримали у 0,9%-му розчині NaCl. Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2х2 мм, які переносили у робочий розчин при 4°C такого складу (ммоль/л): HEPES – 10 (рН 7,4), цукроза – 250, EGTA – 1. Тканину подрібнювали за допомогою гомогенізатора типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин становила 1 : 9. Гомогенат і супер-

натант центрифугували протягом 15 хв при (1000 g і 12000 g, 4 °C). Осад ресуспендували у робочому розчині (склад описаний вище) і знову центрифугували (15 хв, 12000 g, 4 °C). Упродовж експерименту одержану фракцію ізольованих мітохондрій зберігали на льоду. Визначали вміст білка у фракції мітохондрій за стандартним методом Bradford [21]. Середнє значення його вмісту становило 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

Процедура навантаження мітохондрій. Навантаження мітохондрій зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило (ммоль/л): HEPES – 10 (pH 7,4, 37 °C), цукроза – 250, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при 37 °C. Для покращення процесу змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [22].

Дослідження вмісту іонізованого Ca в мітохондріях. Відносні значення вмісту Ca^{2+} у матриксі мітохондрій міометрія, навантажених Fluo-4 AM ($\lambda_{\text{зб.}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 520$ нм) досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 PTI (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [22]. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} мітохондріями, мало склад (ммоль/л) [4, 6]: HEPES – 20 (pH 7,4, 37 °C), цукроза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (pH 7,4, 37 °C), MgCl_2 – 3, АТФ – 3, сукцинат натрію – 5, концентрація Ca^{2+} – 80 мкмоль/л. Енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} проводили протягом 5 хв, після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення Ca^{2+} (2 мл) такого складу (ммоль/л): HEPES – 20 (pH 6,5, 37 °C), цукроза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (pH 6,5, 37 °C), сукцинат натрію – 5, концентрація циклоспорину А – 5 мкмоль/л.

Значення флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як F/F_0 , де F_0 – початковий рівень флуоресценції, F – флуоресцентний сигнал упродовж спостереження за транспортом Ca^{2+} .

Статистичний аналіз отриманих резуль-

татів проводили із використанням пакета стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [23] і критерій t Стьюдента.

В роботі були використані реактиви: HEPES, диметилсульфоксид, циклоспорин А, сукцинат натрію, цукроза, АТФ. Мишачі комерційні моноклональні антитіла проти LETM1 людини анти-LETM1 (від англ. leucine-zipper-EF hand-containing transmembrane region; «Sigma», США), Fluo-4 AM, Pluronic F-127 («Invitrogen», США), бичачий сироватковий альбумін, мінеральні солі вітчизняного виробництва. Розчини готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше ніж 1,5 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з сучасними уявленнями, молекулярною структурою, яка забезпечує функціонування H^+ – Ca^{2+} -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій, виступає протеїн LETM1. Ця ізоформа розповсюджена в мітохондріях еукаріотів, тоді як LETM2 знайдений лише в тестікулах і сперматозоїдах. У дріжджах ідентифікований структурно і функціонально подібний протеїн Mdm38. Делеція відповідного гена, який локалізований у короткому плечі 4-ї хромосоми, призводить до виникнення синдрому Вольфа–Хиршхорна, що супроводжується затримкою росту та розвитку, епілептичними нападами тощо. Надекспресія LETM1 пов'язана із пригніченням туморогенезу [10–12, 24].

LETM1 асоційований із величезним білковим комплексом масою 300–500 кДа внутрішньої мітохондріальної мембрани. Відсутність цього протеїну спричинює деполяризацію та набухання мітохондрій, втрату крист. Тому LETM1 розглядається також як елемент молекулярної структури, яка бере участь у підтриманні калієвого гомеостазу органел [11].

У структурі протеїнів родини Mdm38/

LETM1 виділяють N-термінальний кінець, розташований у міжмембранному просторі мітохондрій, трансмембранний домен, який регулює димеризацію, і С-кінцевий домен, знаходиться у матриксі, що включає в себе, зокрема, типову кальційзв'язувальну структуру типу «EF-hand» [11]. Остання може забезпечувати функціонування LETM1 як H⁺-Ca²⁺-обмінника або виступати сенсором змін концентрації Ca²⁺ у матриксі.

Оскільки мітохондрії в клітинах гладеньких м'язів морфологічно пов'язані із сарколемою та саркоплазматичним ретикуломом [15, 25], їхня зовнішня мембрана після препаративного виділення набуває значної неспецифічної проникності. Водночас численні електронно-мікроскопічні дослідження, функціональні тести (вивчення кальційтранспортних процесів) та дані фотонної кореляційної спектроскопії однозначно вказують на наявність інтактної внутрішньої мембрани в ізолюваних мітохондріях міометрія [5, 6, 15, 20, 22]. Раніше було показано, що використання флуоресцентного зонда Fluo-4 AM дає змогу надійно тестувати зміни концентрації Ca²⁺ у матриксі ізолюваних мітохондрій, а їхня внутрішня мембрана має бар'єрну щодо іонів Ca функцію [22].

Виявлено, що закиснення позамітохондріального середовища (pH 6,5) стимулює

вивільнення Ca²⁺ з ізолюваних мітохондрій, який був попередньо акумульований органелами в енергозалежному процесі (рис. 1, 1). При значенні pH середовища 7,5 вихід катіона не є суттєвим, що повністю відповідає нашим попереднім результатам [20]. Встановлено, що інгібітор Na⁺-Ca²⁺-обмінника мітохондрій тетрафенілфосфоній [26] не впливає на ΔpH-індукований транспорт Ca²⁺ (див. рис. 1). Цей результат ставить під сумнів наявність Na⁺-Ca²⁺-обмінника в мітохондріях міометрія.

Анти-LETM1 суттєво пригнічували ΔpH-індуковане вивільнення Ca²⁺ з мітохондріального матриксу. У разі 5-хвилинної інкубації з антитілами ефект був більше виражений (рис. 2). Отже, є підстави припустити, що мітохондрії міометрія щурів мають транспортну систему H⁺-Ca²⁺-обмінника, яка репрезентована білком LETM1.

Водночас використання антитіл повністю не інгібує транспортну систему навіть за умови їхньої високої концентрації: до 100 мкг протеїну мітохондрій додавали 2,5 мкг анти-LETM1. Цей результат можна пояснити видоспецифічністю білка-транспортера. Існують відомості щодо взаємодії LETM1 із системами, які забезпечують транспорт речовин у мітохондрії [11], що, можливо, перед-

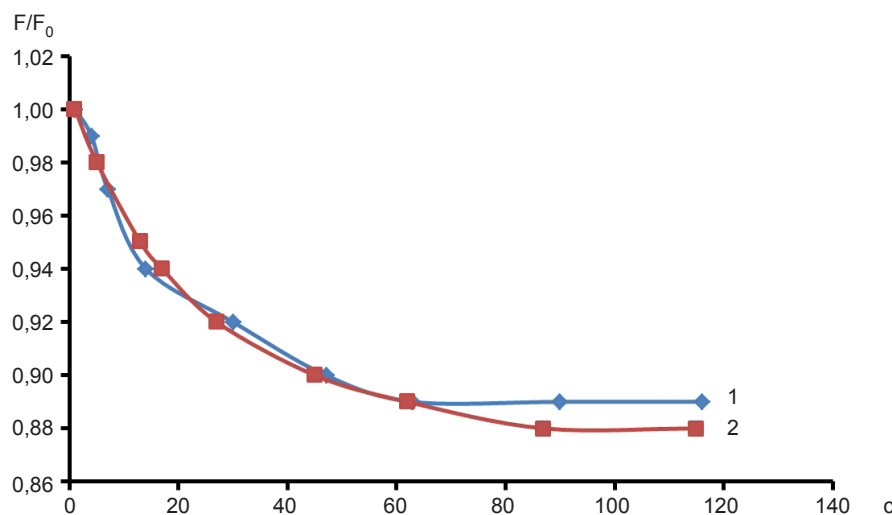


Рис. 1. Вплив інгібітора Na⁺-Ca²⁺-обмінника тетрафенілфосфонію (ТФФ) на ΔpH-індуковане вивільнення іонів Ca з мітохондрій міометрія. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л ТФФ

бачає зв'язок протеїну також із зовнішньою мембраною органел.

Важливою проблемою подальшого вивчення властивостей та регуляції H^+-Ca^{2+} -обмінника є пошук як природних, так і штучних інгібіторів транспортної системи. В доступній нам літературі відповідних відомостей дуже мало. Показано, що транспорт Ca^{2+} у внутрішній мембрані мітохондрій модулюється іонами Mg та діуретиками (амілорид) [26]. В наших дослідженнях (рис. 3) Mg^{2+} пригнічував, а амілорид стимулював H^+-Ca^{2+} -обмінник.

При вивченні властивостей кальцієвого уніпортера мітохондрій дія іонів Mg виявилася біфазною: за фізіологічних мілімолярних концентрацій спостерігалася стимуляція транспортної системи, а за високих – інгібування [5]. Останній ефект пов'язується або ж прямим впливом на каналну структуру, або із екрануванням негативного заряду, який забезпечує рушійну силу уніпортера [26]. Для H^+-Ca^{2+} -обмінника ми припускаємо безпосередній вплив Mg^{2+} на транспорту систему. Проникнення блокувального катіона до матриксу і відповідна конкуренція із Ca^{2+} за місця зв'язування є маловірогідною через бар'єрну функцію внутрішньої мембрани.

Якщо дослідження із застосуванням амілориду та його аналогів продемонстрували інгібувальний вплив діуретиків на кальцієвий уніпортер [18], то відповідний ефект на H^+-Ca^{2+} -обмінник виявився протилежним (див. рис. 3).

У наших експериментах попередня акумуляція Ca^{2+} в енергозалежному процесі може призвести до деполаризації внутрішньої мембрани мітохондрій, що відкриває можливість вивільнення катіона із матриксу за концентраційним градієнтом через структуру MCU. Оскільки ефекти відомих модифікаторів транспорту Ca^{2+} на рівні уніпортера і H^+-Ca^{2+} -обмінника протилежні, останнє припущення мало вірогідне. З іншого боку, згідно з нашими попередніми результатами [27], пора перехідної провідності не відіграє суттєвої ролі у транспорті Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях за цих умов.

Дослідження останніх років вказують на важливу роль оксиду азоту (NO) у функціонуванні мітохондрій. Знайдена мітохондріальна ізоформа NO-синтази, яка, можливо, є сплайс-варіантом нейрональної. Зовнішня мембрана мітохондрій у нейронах і ендотеліюцитах зв'язує також ендотеліальну форму NO-синтази. Електронно-транс-

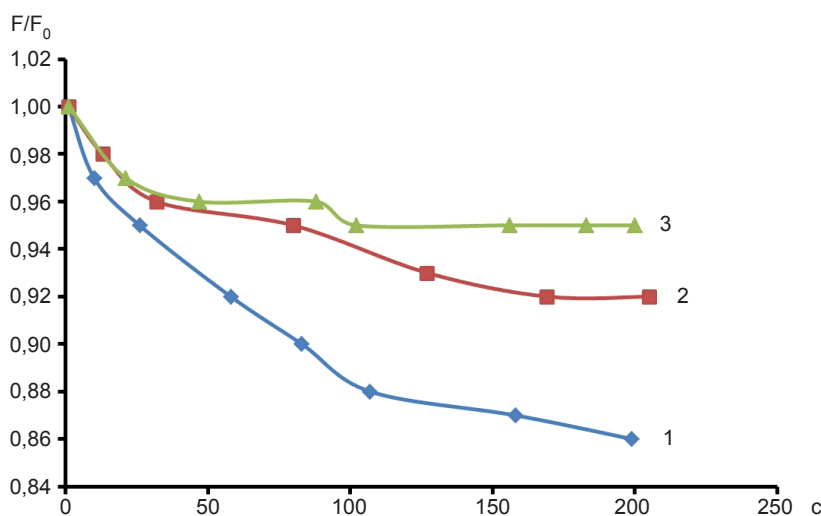


Рис. 2. Вплив комерційного моноклонального антитіла проти H^+-Ca^{2+} -обмінника мітохондрій (анти-LETM1) на ΔpH -залежний транспорт Ca^{2+} з матриксу ізольованих мітохондрій міометрія щурів (на 100 мкг білка мітохондрій – 2,5 мкг антитіла). 1 – контроль, 2 – додавання анти-LETM1, 3 – передінкубація 5 хв з анти-LETM1

портний ланцюг мітохондрій та матриксні ензими – ефективні мішені для оксиду азоту або його похідних через наявність гемових груп та залізо-сірчаних кластерів. Оксид азоту регулює споживання кисню мітохондріями, процеси окисного фосфорилування та біогенез органел. Баланс між різними формами та концентраціями активних метаболітів азоту та кисню в мітохондріях визначає життя або загибель клітини [3]. Проте інформація щодо впливу донорів NO на кальційтранспортні системи мітохондрій доволі обмежена. Раніше нами демонструвалася стимуляція за дії

нітроактивних сполук (нітропрусида та нітриту натрію) кальцієвого уніпортера [27]. Водночас H^+-Ca^{2+} -обмінник виявився резистентним до їхньої дії (рис. 4). Отже, ефект оксиду азоту на кальційтранспортні системи мітохондрій є специфічним.

Стимуляція енергозалежної акумуляції іонів Ca органелами оксидом азоту на тлі відсутності будь-якого ефекту на вихід катіона може забезпечити зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі поблизу мітохондрій.

Відсутність високоафінних модуляторів H^+-Ca^{2+} -обмінника мітохондрій спонукало нас до пошуку синтетичних речовин,

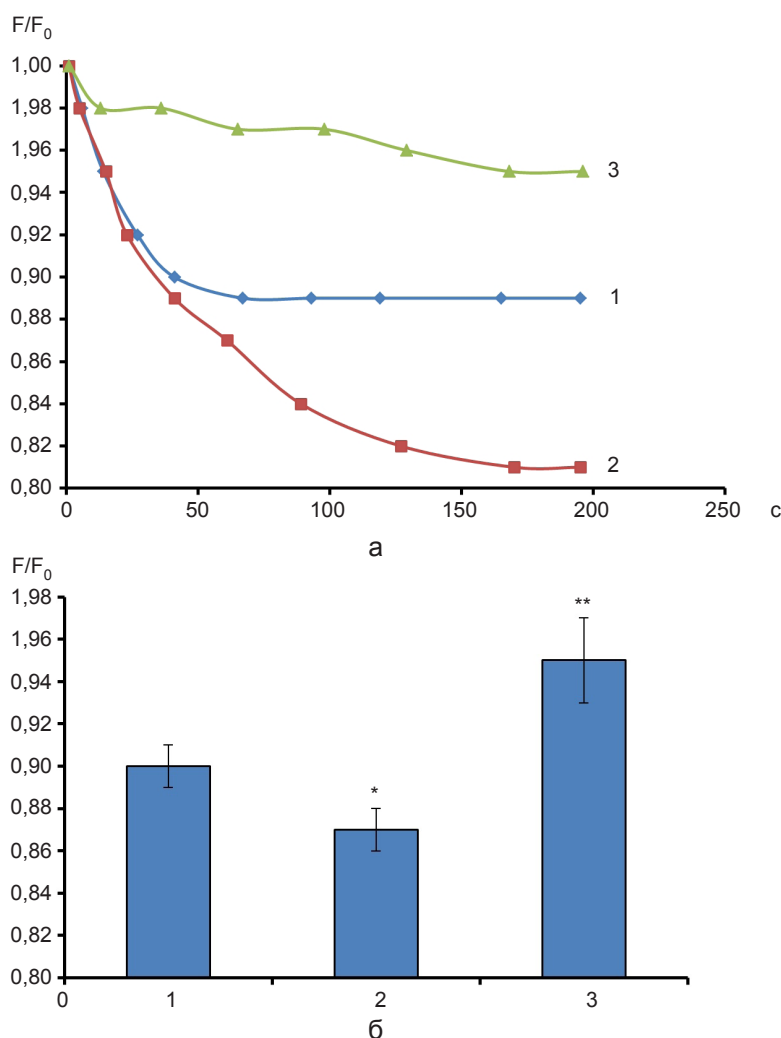


Рис. 3. Дія модифікаторів трансмембранного обміну катіонів на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л амilorид, 3 – 5 ммоль/л Mg^{2+} : а – результати типового експерименту, б – статистичний аналіз результатів, $n=5$; * $P \leq 0,02$, ** $P \leq 0,05$ відносно контролю

здатних ефективно впливати на зазначену структуру. Нині інтенсивно досліджуються супрамолекулярні макроциклічні сполуки – каліксарени, – високоафінні модифікатори АТФ-гідролазу у гладенькому м'язі, зокрема матки, що привертає увагу до їхнього значення як можливих регуляторів кальцієвого гомеостазу міоцитів. Показана інгібіторна дія окремих каліксаренів на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу сарколеми та саркоплазматичного ретикулума, а також АТФ-гідролазну активність препаратів міозину з міометрія [28]. Демонструється ефективний подібний до убаїну вплив сполук С-97 та С-99 на Na^{+} , K^{+} -АТФазу активність сарколеми міометрія, яка проявляється у концентраціях 50-100 нмоль/л. Зазначені макроцикли викликають деполаризацію плазматичної мембрани та транзйентне зростання мембранного потенціалу мітохондрій [17]. Останній факт робить актуальним дослідження їхнього впливу на H^{+} - Ca^{2+} -обмінник мітохондрій.

Нами встановлено, що каліксарени С-97 та С-99 високоафінно (у субмікромольній концентрації) стимулюють досліджувану транспортну систему (рис. 5). Водночас макроцикл С-107, який має подібну біохімічну активність [17], та С-150 – суто каліксаренова

чаша без замісників, яка була використана для порівняння, не мали ефекту у зазначеній концентрації. Вплив диметилсульфоксиду, в якому були розчинені каліксарени, у робочій концентрації був несуттєвим.

Як було вказано вище, стехіометрія H^{+} - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій міометрія близька до 1:1, що вказує на електрогенність транспортної системи та можливість поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій при її функціонуванні. Отже, стимуляція обмінника дослідженими каліксаренами повинна підвищити мітохондріальний потенціал, що дійсно спостерігається в наших експериментах [17].

Отже, ми показали, що закиснення поза-мітохондріального середовища супроводжується вивільненням іонів Ca^{2+} із мітохондрій. Цей процес не є чутливим до специфічного інгібітора Na^{+} - Ca^{2+} -обмінника внутрішньої мітохондріальної мембрани тетрафенілфосфонію і гальмується за наявності моноклональних антитіл проти протеїну LETM1. Таким чином, можна вважати, що в мітохондріях міометрія шурів нами ідентифікований H^{+} - Ca^{2+} -обмінник, молекулярною основою функціонування якого, можливо, є протеїн LETM1. Досліджуваний

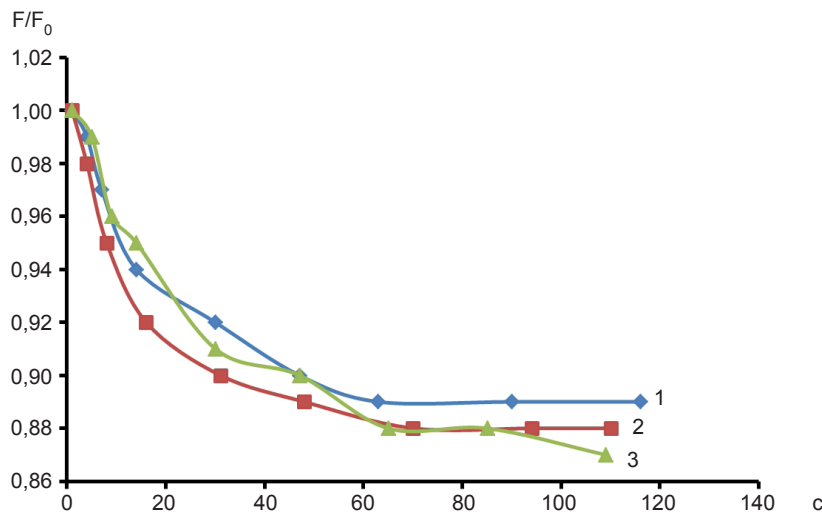


Рис. 4. Вплив нітрозактивних сполук на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л NPS, 3 – 100 мкмоль/л NS

H⁺–Ca²⁺-обмінник виявився резистентним до дії нітрозактивних сполук – нітропрусиду та нітриту натрію (100 мкмоль/л), пригнічувався іонами Mg у мілімолярних концентраціях, але стимулювався діуретиком амілоридом (100 мкмоль/л) та каліксаренами С-97, С-99 (100 нмоль/л). Високоафінна дія вищезазначених каліксаренів (субмікромолярні концентрації) спонукає до подальших досліджень цього класу органічних сполук для пошуку ефективних модуляторів кальційтранспортних систем мітохондрій.

Автори висловлюють подяку члену-кореспонденту НАН України, професору

С.О. Костеріну за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів та в процесі написання рукопису.

Синтез каліксаренфосфонових кислот С-97 (5-Біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-99 (5,17-Біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та С-150 (25, 27-дипропоксикаліксарен) був здійснений у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України.

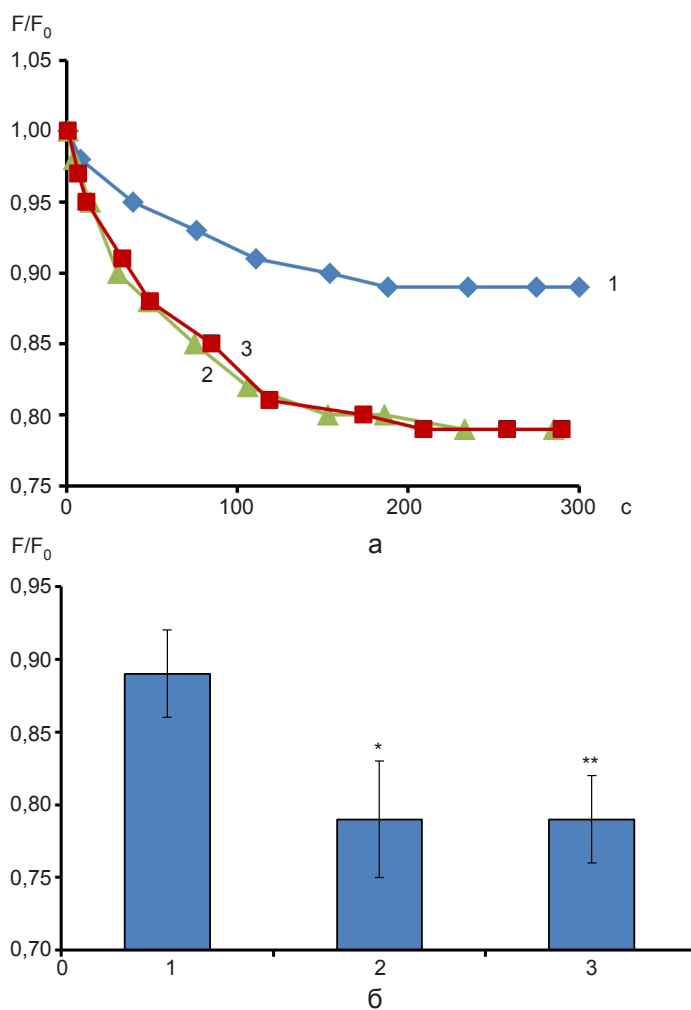


Рис. 5. Дія каліксаренів на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 нмоль/л каліксарену С-97, 3 – 100 нмоль/л каліксарену С-99: а – результати типового експерименту, б – статистичний аналіз результатів, $n=6-7$; * $P<0,1$, ** $P<0,05$ відносно контролю

**О.В. Коломієць, Ю.В. Данилович,
А.В. Данилович**

H⁺-Ca²⁺-ОБМЕННИК В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИЯ: МОДУЛЯЦИЯ ЭКЗО- И ЭН- ДОГЕННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Исследованы свойства ΔpH-индуцированного транспорта Ca²⁺ из изолированных митохондрий миометрия крыс. Аккумуляция Ca²⁺ осуществлялась в присутствии Mg-ATP²⁻ и сукцината. Транспорт ионов Ca регистрировали с использованием Ca²⁺-чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4 AM. Показано, что закисление внемитохондриальной среды сопровождается стимуляцией высвобождения Ca²⁺ из митохондрий. Этот процесс нечувствителен к относительно специфическому ингибитору Na⁺-Ca²⁺-обменника внутренней мембраны митохондрий тетрафенлфосфонию, однако угнетается в присутствии моноклональных антител против протеина LETM1 (Anti-LETM1). Протеин LETM1 в некоторых тканях является молекулярной основой функционирования H⁺-Ca²⁺-обменника митохондрий. Установлено, что H⁺-Ca²⁺-обменник стимулировался диуретиком амилоридом (100 мкмоль/л) и подавлялся ионами Mg в миллимолярных концентрациях. Исследуемая транспортная система была абсолютно резистентна к действию оксида азота (нитропруссид и нитрита натрия), но стимулировалась макроциклическими соединениями каликсаренами (C-97 и C-99) в субмикромолярных концентрациях. Итак, митохондрии миометрия крыс, вероятно, не обладают системой Na⁺-Ca²⁺-обменника, а обеспечивают поддержание кальциевого гомеостаза матрикса с помощью H⁺-Ca²⁺-обменника. Последний высокоаффинно активируется каликсаренами, что делает перспективными дальнейшие исследования закономерностей влияния этих соединений на транспортный процесс. Ключевые слова: H⁺-Ca²⁺-обменник, LETM1, митохондрии, каликсарены, миометрий.

**O.V. Kolomiets, Yu.V. Danylovysh,
G.V. Danylovysh**

H⁺-Ca²⁺-EXCHANGER IN THE MYOMETRIUM MITOCHONDRIA: MODULATION OF EXOGENOUS AND ENDOGENOUS COMPOUNDS

The properties of ΔpH-induced Ca²⁺-transport from isolated rat myometrium mitochondria was investigated. Ca²⁺-accumulation was carried out in the presence of Mg-ATP²⁻ and succinate. Transport of Ca²⁺ recorded using Ca²⁺-sensitive fluorescent probe Fluo-4 AM. It is shown that acidification of extramitochondrial medium is accompanied by stimulation of Ca²⁺ release from mitochondria. This process is insensitive to the tetraphenylphosphonium which is relatively specific Na⁺-Ca²⁺-exchanger inhibitor of mitochondrial inner membrane, but inhibited in the presence of monoclonal antibodies directed against the protein LETM1 (Anti-LETM1). LETM1

protein in some tissues is the molecular basis of the H⁺-Ca²⁺-exchanger functioning on mitochondria. It was found that the H⁺-Ca²⁺-exchanger is stimulated by 100 μM amiloride (diuretic) and inhibited by Mg ions in millimolar concentrations. The transport system was completely resistant to the action of nitric oxide (sodium nitroprusside and sodium nitrite), but was stimulated by macrocyclic compounds of Calixarenes (C-97 and C-99) in submicromolar concentrations. Thus, the mitochondria of rat myometrium probably not have a system of Na⁺-Ca²⁺-exchanger, and provide the maintenance of the matrix Ca²⁺-homeostasis with H⁺-Ca²⁺-exchanger. Since the transport system high affinity activated by Calixarenes, further investigation of the influence of these compounds on the transport process makes promising.

Key words: H⁺-Ca²⁺-exchanger, LETM1, mitochondria, Calixarenes, myometrium.

Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

REFERENCES

1. Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010 [Ukrainian].
2. Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. Diabetes. 2004 Feb;53 Suppl 1:S96-102.
3. Mitochondrial signaling in health and disease. Eds. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. N.Y.: CRC Press; 2012.
4. Piao L., Li Y., Kim S.J., Byun H.S., Huang S.M. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. Cancer Res. 2009 Apr 15;69(8):3397-404.
5. Veklich TO. Transport of Ca²⁺ in the smooth muscle cells mitochondria: Manuscript. Kiev: Palladin Institute of Biochemistry of the NASU; 2003 [Ukrainian].
6. Kandaurova NV. Ca²⁺-induced changes of membrane potential of myometrium mitochondria: Manuscript. Kiev: Palladin Institute of Biochemistry of the NASU; 2011 [Ukrainian].
7. Crosdas G, Varnai P, Golenar T. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 28;353(1-2):109-13.
8. Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. Sci China Life Sci. 2011 Aug;54(8):763-9.
9. Santo-Domingo J., Demareux N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12.
10. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. Science. 2009 Oct 2;326(5949):144-7.
11. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The pathophysiology of LETM1. J Gen Physiol. 2012 Jun;139(6):445-54.
12. Waldeck-Weirmair M, Jean-Quartier C, Rost R, Khan MJ. Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein

- 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute two distinct mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways. J Biol Chem. 2011 Aug 12;286(32):28444-55.
13. Mc Comas AJ. Skeletal muscle (structure and function). - Kiev: Olympic. Lit-ra; 2001 [Ukrainian].
14. Barany EdM. Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego, California: Acad. Press; 1996.
15. Kosterin SO. Transport of calcium in the smooth muscles. Kiev: Naukova dumka; 1990 [Ukrainian].
16. Kosterin SA, Burduga ThV, Fomin VP, Grover AK. Mechanism of Ca²⁺-transport in myometrium. Control of Uterine Contractility. Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor; 1994.
17. Danylovykh GV, Danylovykh YuV, Kolomiets OV, Chunikhin AJu, Gorchev VF, Karakhim SA, Kosterin SO, Rodik RV, Cherenok SO, Kalchenko VI. Changes in polarization of myometrial cells plasma and internal mitochondrial membranes under calixarenes action as inhibitors of plasma membrane Na⁺, K⁺-ATP-ase. Ukr Biokhim Zh 2012 Nov-Dec;84(6):37-48 [Ukrainian].
18. Kosterin SO. The possible H⁺-dependent functional connection between plasma membrane and mitochondria in the smooth muscle cell. Ukr Biokhim Zh. 1998 Nov-Dec;70(6):152-60 [Ukrainian].
19. Vovkanykh LS, Dubytsky LO. Kinetic properties of the H⁺-stimulated rat liver mitochondria Ca²⁺ efflux. Exp Clin Physiol Biochem 2001; 15(3):34-37 [Ukrainian].
20. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Regularities of Ca²⁺/H⁺-exchange in mitochondria myometrium. Ukr Biokhim Zh 2014 Jul-Aug;86(3):41-8 [Ukrainian].
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
22. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Ca²⁺ accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. Ukr Biokhim Zh 2013 Jul-Aug;85(4):30-9 [Ukrainian].
23. Bailay NTJ. Statistical methods in biology. Great Britain: Cambridge University Press; 1995.
24. Shin JY, Chung YS, Kang B, Jiang HL. Co-delivery of LETM1 and CTMP synergistically inhibits tumor growth in H-ras 12V liver cancer model mice. Cancer Gene Ther. 2013 Mar;20(3):186-94.
25. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiary P, Bononi A. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. Biochim Biophys Acta. 2009 Nov;1787(11):1342-51.
26. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol. 1990 May;258(5 Pt 1):C755-86.
27. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV. Influence of nitric oxide on transmembrane calcium exchange and mitochondrial inner membrane polarization of smooth muscle. III Conference of young scientists "Physiology: from Molecules to Organism" Kiev: Bogomoletz Institute of Physiology NASU; 2013 Oct: 15-16 [Ukrainian].
28. Labyntseva RD, Slinchenko NM, Veklich TO, Rodik RV, Cherenok SO, Boiko VI, Kal'chenko VI, Kosterin SO. Comparative study of calixarene effect on Mg²⁺-dependent ATP-hydrolase enzymatic systems from smooth muscle cells of the uterus Ukr Biokhim Zh. 2007 May-Jun;79(3):44-54 [Ukrainian].

Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014

К.В. Розова¹, Н.Г. Сидоряк²

Механізми змін мікроциркуляції у щурів при гострій метгемоглобінемії

¹Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; ²Мелітоп. пед. ун-т ім. Богдана Хмельницького; E-mail: erozova@ukr.net

У роботі було досліджено особливості мікроциркуляції та механізмів, що їх зумовлюють, при гострому введенні щурам нітриту натрію в дозі 5 мг сухої речовини на 100 г маси тіла. Показано, що гостре введення нітриту натрію призводить до розвитку метгемоглобінемії, артеріальної та венозної гіпоксемії, вираженої тканинної гіпоксії. Зростання шляху дифузії для O₂ при метгемоглобінемії, зумовлюється значною гіпергідратацією аерогематичного бар'єру легень та окремих його шарів і супроводжується зниженням обох складових дифузійної здатності легень для кисню: її мембранного та кров'яного компонентів. Виявлено, що введення нітриту натрію чинить подвійний ефект, призводячи до інактивації гемоглобіну, а також до порушення мікроциркуляції, пов'язаного переважно зі змінами в регуляції судинного тонусу. При цьому вихідний рівень перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу, притаманний організму, визначає набір механізмів, котрі при метгемоглобінемії відповідають за зміни тканинного кровотоку.

Ключові слова: нітрит натрію, метгемоглобінемія, тканинна гіпоксія, аерогематичний бар'єр легень, дифузійна здатність легень для кисню, мікроциркуляція.

ВСТУП

Нітрити є розповсюдженими в природі речовинами, котрі містяться в ґрунті, воді, продуктах харчування, лікарських засобах тощо. Доведено, що підвищення допустимого ступеня навантаження організму цими речовинами може негативно впливати на здоров'я [1–4]. Найбільше від впливу нітритів страждають серцево-судинна та система крові [5–8]. В крові відбуваються суттєві зміни з боку еритроцитів та гемоглобіну. Внаслідок інактивації гемоглобіну та переходу його у неактивну форму – метгемоглобін – порушується киснетранспортна функція крові [7, 9]. Однією з провідних ланок у забезпеченні транспорту O₂ є периферичний кровообіг і мікроциркуляція, які забезпечують трофіку тканин. Швидкість кровотоку у мікросудинах не є абсолютно стабільним параметром, а піддається часовим просторовим варіаціям, котрі відображають процес життєдіяльності

© К.В. Розова, Н.Г. Сидоряк

тканин і дають змогу отримати інформацію про співвідношення різних механізмів, що визначають стан мікроциркуляції [10–12].

Серед механізмів, що впливають на периферичний кровообіг, особливу роль відіграють зміни ультраструктури біологічних бар'єрів, через які відбувається дифузія кисню, та судинної стінки [5–7]. Створюється «хибне коло», коли при погіршенні доставки кисню в тканини розвивається тканинна гіпоксія, яка, в свою чергу, призводить до порушення функції судин завдяки активації процесів перекисного окиснення ліпід (ПОЛ) з пошкодженням структурно-функціональної цілісності клітинних мембран, що є передумовою негативних змін мікроциркуляції [7, 9]. При цьому до теперішнього часу не сформовано чітких уявлень про взаємозв'язок зростання шляху дифузії для O₂ через аерогематичний бар'єр легень (АГБ) – першу перешкоду на шляху кисню з навколишнього повітря, і

формуванням тканинної гіпоксії та станом мікроциркуляції при метгемоглобінемії.

Метою нашої роботи було дослідження особливостей мікроциркуляції та механізмів, що їх зумовлюють, при гострому введенні щурам нітриту натрію.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 30 статевозрілих щурах-самцях масою 160–220 г відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1986), та за принципами Гельсінської Декларації (2000). Експериментальною моделлю було обрано метгемоглобінемію, яка розвивалася при підшкірному введенні водного розчину нітриту натрію (NaNO_2) в дозі 5 мг сухої речовини на 100 г маси тіла [13]. Усі показники визначалися до (контроль) та через 60 хв після введення NaNO_2 . Наркотизованим тваринам (5 мг хлоралози та 50 мг уретану на 100 г маси тіла) в устя порожнистих вен та сонну артерію вводили поліетиленові катетери для відбору проб змішаної венозної та артеріальної крові. Загальний вміст гемоглобіну (C_{Hb}) та метгемоглобіну (C_{MetHb}) у крові визначали ціанідним методом в модифікації Кушаковського [14]. Напруження кисню в артеріальній ($P_a\text{O}_2$) та змішаній венозній крові ($P_v\text{O}_2$) досліджували за допомогою газоаналізатора «Corning» (Угорщина, Великобританія). Оцінку дифузійної здатності легень для O_2 її мембранного та кров'яного компонентів виконували згідно з запропонованою нами математичною моделлю [7].

Оцінку стану мікроциркуляції крові у щурів проводили згідно з методом лазерної доплерівської флоуметрії (ЛДФ) за допомогою лазерного аналізатора капілярного кровотоку ЛАКК-01 (Росія). Для реєстрації ЛДФ-грами датчик аналізатора ЛАКК-01 нерухомо фіксували біля основи хвоста тварини. Аналіз ЛДФ-грами виконували згідно з Інструкцією до приладу [10, 11]. Вираховували такі показ-

ники: – середнє значення перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу – параметр мікроциркуляції (ПМ); амплітуду коливань кровотоку відносно середнього значення перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу – флаксу; коефіцієнт варіації ($K_v = \delta / \text{ПМ} \times 100 \%$), котрий характеризує співвідношення мінливості перфузії (флаксу) і середньої перфузії в ділянці тканини.

При аналізі амплітудно-частотного спектра визначали внесок (у відсотках) фізіологічно найбільш значущих коливань швидкості кровотоку у потужність усього спектра ЛДФ-грами: низькочастотних коливань (A_{LF}), зумовлених активністю гладеньком'язових клітин в артеріолах (вазомотій); високочастотних коливань (A_{HF}), зумовлених періодичними змінами тиску у венозному відділі кров'яного русла при диханні; пульсових коливань (A_{CF}), синхронізованих з кардіоритмом [12].

Оцінювали активний механізм модуляцій, спричинений двома факторами: біогенною та нейрогенною активністю прекапілярних вазомоторів, що визначається як $A_{\text{LF}}/\text{ПМ}$; власне судинним тонусом, котрий визначається як δ/A_{LF} . Також оцінювали і пасивний механізм модуляцій кровотоку, що включає два інших фактори: флуктуації кровотоку, синхронізовані з кардіоритмом, пов'язані зі співвідношенням A_{CF}/δ , де A_{CF} – максимальна амплітуда коливань у діапазоні $50\text{--}60 \text{ хв}^{-1}$ ($0,8\text{--}1,5 \text{ Гц}$); флуктуації кровотоку, синхронізовані з дихальним ритмом (респіраторний ритм флуктуацій), які зумовлюються співвідношенням A_{HF}/δ , де A_{HF} – максимальна амплітуда коливань кровотоку у діапазоні $12\text{--}24 \text{ хв}^{-1}$ ($0,2\text{--}0,4 \text{ Гц}$). Співвідношення активних і пасивних модуляцій кровотоку вираховували як індекс флаксомотій (ІФМ), що дорівнює $A_{\text{LF}} / (A_{\text{HF}} + A_{\text{CF}})$ [15, 16].

Зразки тканин для електронно-мікроскопічних досліджень відбирали у декапітованих тварин з ідентичних ділянок нижніх часток обох легень. Фіксацію біологічного матеріалу проводили миттєво, вносячи зразки

в забуферений 2,5%-й розчин глютарового альдегіду. Дофіксацію матеріалу проводили за допомогою реактиву Колфілда (на основі 2 % OsO_4 , pH 7,4; «Sigma», США); зневоднення матеріалу виконували в спиртах зростаючої концентрації, абсолютному спирті та ацетоні. Наступну заливку в епон-аралдит («Fluka», Швейцарія) робили згідно з загальноприйнятою методикою [17]. Ультратонкі зрізи товщиною 40–60 нм контрастували 1%-м розчином уранілу ацетату та цитрату свинцю за методикою Рейнольдса («Sigma», США) [18]. Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEM 100CX (Японія). На електронних мікрофотографіях проводили морфометричну оцінку середньої арифметичної товщини біологічних бар'єрів (τ) та їх окремих шарів, за котрими оцінюють масу тканини між одиницями площі зовнішньої та внутрішньої поверхонь бар'єрів, та середньої гармонічної товщини (τ_h), котра являє собою загальну ефективну товщину досліджуваної структури з урахуванням опору дифузії, за принципом випадкового відбору зразків (по 80 при кожному впливі) [19].

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали із застосуванням критерію t Стюдента. Різницю між середніми значеннями вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Через годину після введення NaNO_2 концентрація метгемоглобіну зростала у 16 разів порівняно з вихідним рівнем (з $2,1 \pm 0,25$ до $33,65 \pm 2,6$ %). Це призводило до суттєвого зниження концентрації активного гемоглобіну (на 38 %), в результаті чого спостерігалось відповідне зменшення кисневої ємності крові з $18,1 \pm 0,4$ до введення нітриту натрію до $11,2 \pm 0,6$ об% через годину після початку розвитку метгемоглобінемії. Подібні зміни слід розглядати як негативні, такі, що погіршують доставку кисню кров'ю за рахунок зменшення вмісту гемоглобіну, здатного його переносити.

Слід відмітити зниження $P_a\text{O}_2$ з $96,8 \pm 2,1$ до $75,9 \pm 5,2$ мм рт.ст. (на 21,6 %), а також $P_v\text{O}_2$ – з $39,7 \pm 2,6$ до $17,6 \pm 2,2$ мм рт.ст. (на 56 %) відносно вихідного рівня. Тобто проведені нами дослідження виявили, що при розвитку гострої метгемоглобінемії спостерігається розвиток не тільки артеріальної, але й венозної гіпоксемії. Така динаміка напруження кисню в крові щурів вказує на розвиток тканинної гіпоксії, свідченням чого є зниження більш ніж удвічі співвідношення його доставки до споживання до значень менших ніж 2 [7] (рис. 1).

Про погіршення умов транспорту O_2 в організмі щурів при розвитку метгемоглобінемії свідчать також зміни, які спостерігаються у морфофункціональному стані АГБ.

При метгемоглобінемії збільшується шлях дифузії для кисню завдяки розвитку гіпергідратації АГБ і окремих його шарів, свідченням чого є зростання середніх арифметичної та гармонічної його товщин – інтегральних показників вмісту рідини в бар'єрі (табл. 1).

Зростання товщини АГБ супроводжувалося вираженими порушеннями його ультраструктури (рис. 2). Окрім тотального набряку АГБ, спостерігалися ділянки підендотеліального набряку, який може бути ознакою певної токсичної дії нітриту натрію на тканину легень [20], а відтак, можливо й інших тканин організму. Оскільки АГБ, а саме його ендотеліальний шар, безпосеред-

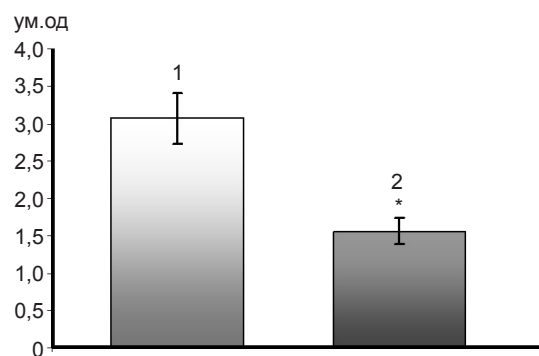


Рис. 1. Зміни співвідношення доставки кисню до його споживання через годину після введення нітриту натрію. 1 – контроль, 2 – метгемоглобінемія. * $P < 0,05$ відмінності достовірні відносно контрольних значень

Таблиця 1. Середні арифметична (τ) і гармонічна (τ_h) товщини (нм) аерогематичного бар'єра легень та окремих його шарів при гострій метгемоглобінемії ($M \pm m$)

Умови експерименту	Аерогематичний бар'єр		Епітелій		Інтерстицій		Ендотелій	
	T	τ_h	τ	τ_h	τ	τ_h	τ	τ_h
Контроль	163 $\pm$ 8	155 $\pm$ 9	71 $\pm$ 5	65 $\pm$ 7	49 $\pm$ 3	46 $\pm$ 3	63 $\pm$ 7	50 $\pm$ 8
Метгемоглобінемія	482 $\pm$ 65*	430 $\pm$ 60*	224 $\pm$ 25*	206 $\pm$ 42*	109 $\pm$ 11*	98 $\pm$ 16*	197 $\pm$ 34*	188 $\pm$ 30*

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 * різниця достовірна відносно контрольних значень ($P < 0,05$).

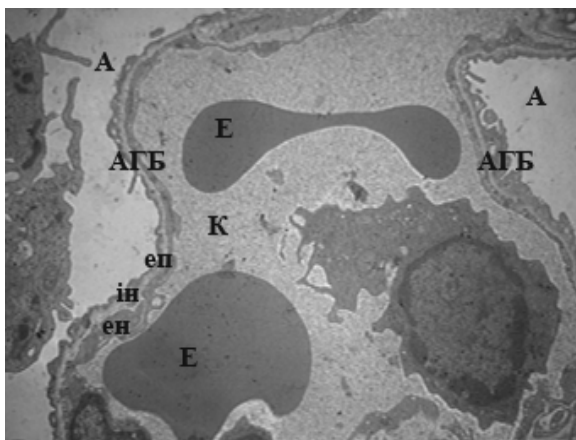
ньо утворює стінку капілярів, можна припустити наявність при метгемоглобінемії змін функціонування останніх, зумовлених саме функцією ендотелію і, відповідно, порушень мікроциркуляції.

Результатом погіршення умов дифузії в легенях при введенні NaNO_2 було значне зниження їх дифузійної здатності для кисню (табл. 2). При цьому достовірно знижувалося значення мембранного компоненту дифузійної здатності легень, що безпосередньо зумовлюється морфологічним станом АГБ [21, 22]. Як було встановлено, при розвитку метгемоглобінемії відбувалося і значне зниження кров'яного компоненту дифузійної здатності легень. Причиною цього процесу, окрім зменшення кисневої ємності крові, виявилось і виражене зменшення об'ємної швидкості кровотоку (на

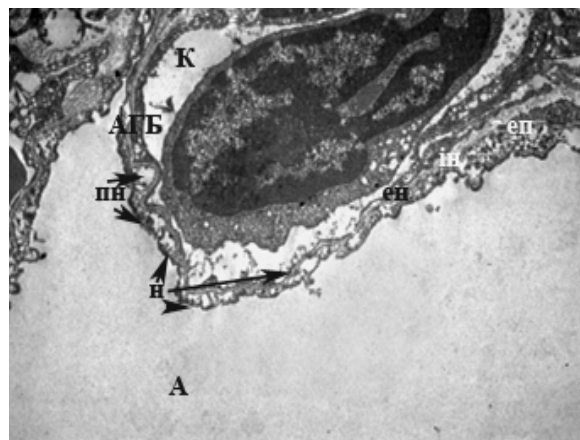
80,6 % – з $34,5 \pm 1,05$ у контролі до $19,1 \pm 1,3$ мл · хв⁻¹/100 г при метгемоглобінемії).

Слід зазначити, що значні зміни швидкості кровотоку через годину після введення NaNO_2 супроводжувалися порушенням мікроциркуляції. Однак вони не були односпрямованими, а залежали від вихідних значень показників, що її характеризують.

Аналіз ЛДФ-грами щурів у стані спокою виявив, що за середнім показником перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу тварини можуть бути розподілені на дві підгрупи: в I – цей показник коливався в межах 6–12 відносних перфузійних одиниць (ПО), а в II – 15–23 ПО (табл. 3). Після введення NaNO_2 середній показник перфузії у тварин I підгрупи зростав на 13 %, а у щурів II підгрупи достовірно не змінювався. При цьому



а



б

Рис. 2. Ультраструктура аерогематичного бар'єра легень (АГБ) при метгемоглобінемії: А – альвеола, К – капіляр, Е – еритроцит, еп – епітелій, ін – інтерстицій, ен – ендотелій, н – набряк, пн – підендотеліальний набряк. х 6400

Таблиця 2. Зміни дифузійної здатності (мл хв⁻¹ мм рт.ст.⁻¹) легень та її складових при гострій метгемоглобінемії (M±m)

Показники	Контроль	Метгемоглобінемія
Дифузійна здатність легень для O ₂	0,35±0,01	0,26±0,01*
Мембранний компонент дифузійної здатності легень	0,52±0,02	0,43±0,04*
Кров'яний компонент дифузійної здатності легень	1,10±0,08	0,64±0,02*

амплітуда коливань δ в I підгрупі збільшувалася на 52 %, а в II – зменшувалася на 26 %. Оскільки вказаний показник характеризує перфузію тканин кров'ю і відображає сукупні процеси, що одночасно відбуваються в усіх мікросудинах, отримані дані вказують на краще функціонування механізмів регуляції мікроциркуляції у тварин I підгрупи при розвитку метгемоглобінемії [23, 24].

Ще одним важливим показником стану мікроциркуляції, який зазнавав суттєвих змін

під дією NaNO₂, був коефіцієнт варіації. Так, його значення через годину після початку експерименту у щурів I підгрупи збільшувалося майже на 71 %, тоді як у II навпаки зменшувалося на 25 % (див. табл. 3). Зростання цього показника в I підгрупі тварин найімовірніше свідчить про суттєвий внесок вазомоторного компонента в модуляцію тканинного кровотоку, тобто чим більшим є значення K_v , тим вищою є вазомоторна активність судин [5, 15, 25].

Таблиця 3. Зміни показників лазерної доплерівської флоуметрії при гострій метгемоглобінемії (M±m)

Показники	I підгрупа		II підгрупа	
	Контроль	Метгемоглобінемія	Контроль	Метгемоглобінемія
Значення перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу, ПО	8,41±0,47	9,53±0,45*	19,18±0,56	19,85±0,27
Індекс ефективності мікроциркуляції, ум. од.	1,05 ±0,11	1,02 ±0,10	1,60 ±0,11	0,99 ±0,05*
Флакс, ПО	0,67 ±0,19	1,02 ±0,21*	1,10 ±0,18	0,82 ±0,08
Коефіцієнт варіації, %	7,53 ±1,96	12,83 ±3,30*	5,64 ±0,75	4,19 ±0,41
Коливання кровотоку, хв ⁻¹				
низькочастотні	1,21 ±0,31	1,72 ±0,34	1,62 ±0,16	1,13 ±0,09*
високочастотні	0,60±0,095	1,30 ±0,07*	0,72±0,08	0,77±0,06
пульсові	0,31±0,06	0,73 ±0,20*	0,31±0,02	0,39 ±0,03
Біогенна та нейрогенна активність прекапілярних вазомоторів, ум. од.	0,14±0,088	0,18 ±0,075*	0,08±0,036	0,06 ±0,003*
Судинний тонус, ум. од.	0,55 ±0,23	0,59 ±0,23	0,68±0,170	0,73 ±0,08
Флуктуації кровотоку, синхронізовані, Гц				
з кардіоритмом	0,46 ±0,11	0,72 ±0,21*	0,28±0,101	0,48 ±0,12*
з дихальним ритмом	1,81 ±0,25	1,67 ±0,19	1,47 ±0,17	1,38 ±0,19

У системі кровообігу мікроциркуляторне русло є зв'язуючим компонентом між артеріальними та венозними судинами. Тому ритми флуктуацій зміщення еритроцитів у системі мікроциркуляції піддається впливам як з боку шляхів притоку – артеріальні або активні модуляції флуктуацій тканинного кровотоку, так і відтоку – пасивні модуляції флуктуацій. Також у капілярах відбуваються обмінні процеси, котрі характеризуються власними ритмами [10, 15]. Експериментальні та клінічні дослідження свідчать про те, що такі флаксомоції, з одного боку, відображають періодичні або аперіодичні процеси функціонування серцево-судинної, дихальної та інших систем організму, з іншого – є показниками пристосувальної реакції мікроциркуляторного русла до зміни умов гемодинаміки та потреби тканин у перфузії їх кров'ю [15, 24]. Тому вивчення цих процесів може розкрити механізми, котрі впливають на мікроциркуляцію при введенні NaNO_2 .

Нами було встановлено, що при метгемоглобінемії відмічалися зміни з боку повільних хвиль флаксомоцій. У I підгрупі щурів спостерігалася виражена тенденція ($0,1 < P < 0,2$) зростання A_{LF} , у II – зниження на 40 % ($P < 0,05$), тобто був суттєвий модулювальний LF-компонент у мікроциркуляцію (див. табл. 3). Така динаміка вказує на те, що для тварин I підгрупи характерною є дещо більша робота вазомоторів гладеньком'язових клітин у прекапілярній ланці резистивних судин, ніж для щупів II підгрупи [26, 27].

Слід зазначити, що високочастотні дихальні хвилі коливань кровотоку у його змінах при метгемоглобінемії відігравали значну роль у щурів I підгрупи, свідченням чого було зростання A_{HF} у 2,2 раза, тоді як у тварин II підгрупи цей показник достовірно не змінювався (див. табл. 3). Отримані результати дають змогу висунути припущення про те, що у щурів I підгрупи, у котрих середній рівень перфузії є нижчим, ніж у тварин II підгрупи, мікроциркуляція зумовлюється переважно відтоком крові та перепадами тиску у веноз-

ній частині кровоносного русла, які пов'язані з дихальними екскурсіями грудної клітки.

Аналізуючи пульсові флаксомоції, що спричинюються відмінностями швидкості еритроцитів у мікросудинах, які викликаються перепадами систолічного та діастолічного тиску, можна відмітити, що більш суттєві зміни цього показника через годину після введення NaNO_2 виявлені в I підгрупі (A_{CF} збільшувався у 2,35 раза; див. табл. 3).

Важливе значення у характеристиці мікроциркуляції має аналіз співвідношень механізмів активної і пасивної модуляції тканинного кровотоку. Характеризуючи активний механізм модуляції мікроциркуляції, котрий включає міогенну та нейрогенну активність ($A_{LF}/\text{ПМ}$) і мікросудинний тонус (δ/A_{LF}), можна констатувати, що його внесок при метгемоглобінемії у щурів I підгрупи був значною мірою зумовлений міогенною та нейрогенною активністю: значення показника $A_{LF}/\text{ПМ}$ зростало в середньому на 29 %. Водночас для II підгрупи тварин було притаманним зниження впливу міогенної та нейрогенної активності на тканинний кровотік: спостерігалася зниження $A_{LF}/\text{ПМ}$ середньому на 25 %. Мікросудинний тонус у щурів обох підгруп достовірно не впливав на стан мікроциркуляції при метгемоглобінемії (див. табл. 3).

При аналізі пасивного механізму модуляції мікроциркуляції, який визначається серцевим (A_{CF}/δ) і респіраторним (A_{HF}/δ) ритмами флуктуацій встановлено, що через годину після введення нітриту натрію він більшою мірою пов'язаний зі змінами серцевого ритму флуктуацій: у щурів I і II підгруп відбувалося зростання цього показника – на 56 і 71 % відповідно. Величина респіраторного ритму флуктуацій в обох підгрупах достовірно не змінювалася (див. табл. 3).

При метгемоглобінемії реальний вплив на тканинний кровотік чинять одна зі складових: для активного компоненту – міогенна та нейрогенна активність, а для пасивного компоненту – серцевий ритм флуктуації. Ін-

тегральна оцінка співвідношень механізмів активної і пасивної модуляції кровотоку за індексом ефективності мікроциркуляції виявила, що у щурів І підгрупи цей показник достовірно не змінювався при розвитку метгемоглобінемії, тоді як у тварин ІІ підгрупи – знижувався на 39 %. Це є свідченням пригнічення вазомоторного механізму регуляції мікрокровотоку [11].

Отже, отримані результати вказують на значний вплив нітриту натрію на мікроциркуляцію. У щурів з відносно меншим вихідним середнім значенням перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу зміни мікроциркуляції зумовлювалися пасивними механізмами регуляції, а саме високочастотними та пульсовими коливаннями тканинного кровотоку; зміни активних механізмів модуляції були значно меншими. У тварин з відносно підвищеним рівнем перфузії одиниці об'єму тканини спостерігалось різке зниження потужності активних механізмів модуляції. Найбільше зниження виявлялося з боку міогенної та нейрогенної активності прекапілярних вазомоторів, що, ймовірно, спричинено токсичним впливом NaNO_2 на серцево-судинний центр, а також зниженням доставки O_2 до тканин організму, що погіршує трофічні процеси в них [28]. Водночас потужність пасивних механізмів модуляції зростала внаслідок збільшення показників серцевого ритму флуктуацій. Таким чином, можна дійти висновку, що рівень перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу, притаманний організму, визначає набір механізмів, котрі при метгемоглобінемії відповідають за зміни тканинного кровотоку.

ВИСНОВКИ

Гостре введення нітриту натрію призводить до розвитку метгемоглобінемії, яка супроводжується артеріальною та венозною гіпоксемією, вираженою тканинною гіпоксією зі зниженням співвідношення доставки O_2 до його споживання до значень менших ніж 2.

Зростання шляху дифузії для O_2 при метгемоглобінемії, зумовлене значною гіпергідратацією АГБ та окремих його шарів супроводжується зниженням обох складових дифузійної здатності легень для кисню: її мембранного та кров'яного компонентів. Зміни першого безпосередньо спричинюються морфологічним станом АГБ, а другого – зменшенням кисневої ємності крові та об'ємної швидкості кровотоку.

Введення нітриту натрію чинить подвійний ефект, призводячи, з одного боку, до інактивації гемоглобіну, що порушує постачання кисню до тканин, з іншого – супроводжується змінами мікроциркуляції, пов'язаними переважно зі змінами в регуляції судинного тонусу. При цьому, вихідний рівень перфузії одиниці об'єму тканини за одиницю часу, притаманний організму, визначає набір механізмів, котрі при метгемоглобінемії відповідають за зміни тканинного кровотоку.

Е.В. Розова, Н.Г. Сидоряк

МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У КРЫС ПРИ ОСТРОЙ МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИИ

В работе были исследованы особенности микроциркуляции и механизмов, ее обуславливающих, при остром введении нитрита натрия в дозе 5 мг сухого вещества на 100 г массы тела. Показано, что острое введение нитрита натрия приводит к развитию метгемоглобинемии, артериальной и венозной гипоксемии, выраженной тканевой гипоксии. Увеличение пути диффузии O_2 при метгемоглобинемии обуславливается значительной гипергидратацией аэрогематического барьера легких и отдельных его слоев, и сопровождается снижением обеих составляющих диффузионной способности легких для кислорода: ее мембранного и кровяного компонентов. Выявлено, что введение нитрита натрия оказывает двойное воздействие, приводя к инактивации гемоглобина, а также к нарушению микроциркуляции, связанному преимущественно с изменениями в регуляции сосудистого тонуса. При этом исходный уровень перфузии единицы объема ткани в единицу времени, присущий организму, определяет набор механизмов, которые при метгемоглобинемии ответственны за изменения тканевого кровотока.

Ключевые слова: нитрит натрия, метгемоглобинемия, тканевая гипоксия, аэрогематический барьер легких, диффузионная способность легких для кислорода, микроциркуляция.

K.V. Rozova¹, N.G. Sydoryak²

MECHANISMS OF CHANGES OF MICROCIRCULATION IN RATS UNDER ACUTE METHEMOGLOBINEMIA

It was investigated the features of microcirculation and mechanisms it's conditioned, under acute administration of sodium nitrite in 5 mg of dry substance per 100 g of body weight. It was shown that acute administration of sodium nitrite leads to the development of methemoglobinemia, arterial and venous hypoxemia, and severe tissue hypoxia. Increase in the diffusion path O_2 at methemoglobinemia is caused due to significant hyperhydration of lung air-blood barrier and its individual layers, and is accompanied by a decrease in both components of the diffusion capacity of the lungs for oxygen: its membrane and blood components. It was revealed that the administration of sodium nitrite has a double effect, leading to inactivation of hemoglobin, as well as to microcirculatory disturbances associated primarily with changes in the regulation of vascular tone. In this initial perfusion per unit volume of tissue per time unit intrinsic for the organism defines a set of mechanisms which are responsible for changes in tissue blood flow under methemoglobinemia.

Key words: sodium nitrite, methemoglobinemia, tissue hypoxia, the air-blood barrier of lung, diffusion capacity of the lungs for oxygen, microcirculation.

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

Bogdan Khmelnytsky Melitopol State Pedagogical University

REFERENCES

1. Zhuravlea IA, Melentyeva IA, Vinogradov IA. Role of nitric oxide in cardiology and gastroenterology. Clin Med.. 1997; (4): 18-21.
2. Panichev KV, Serednyak VG, Korzhan MV. Poisoning in children by methemoglobin forming agents. Anesthesiol and Reanimatol. 2000; (1): 56-59.
3. Dunn Robert J. Massive sulfalazine and paracetamol ingestion causing acidosis, hyperglycemia, coagulopathy and methemoglobinemia. J Toxicol Clin Toxicol 1998; 36 (3): 239-242.
4. Azhipa JI, Reutov VP, Kayushin LP. Ecological and biomedical aspects of environmental pollution by nitrates and nitrites. Reports USSR Acad of Sci. 1990; 16 (3): 131-148.
5. Volgina GV, Perepechenykh YV, Bykov BT. Risk factors for cardiovascular diseases in patients with chronic renal failure. Nephrol and Dialysis. 2000; (4): 252-258.
6. Lanovenko II, Kotsyuruba AV, Gaschuk AP. Interaction of oxide O_2 and blood oxygen transport during hemic hypoxia of hemic type. Reports of NAS of Ukraine. 2009; (8): 189 - 193.
7. Mechanisms of development and compensation of hemic hypoxia / [ed. M.M.Seredenko]. Kiev: Naukova Dumka; 1987. 200 p.
8. Rynn KO, Jahns BE. Acute myocardial infarction secondary to benzocaine induced methemoglobinemia. J Toxicol Clin Toxicol 1995; 33 (5): 166-170.
9. Sydoryak NG. Features of blood oxygenation in rats during the development of acute methemoglobinemia of low severity. Bul LNU. 2009; (2): 109-117.
10. Kozlov VI, Mag ES, Litvin FB, Sidorov VV. Method of laser Doppler flowmetry. Moscow: Medicina; 2001. 22 p.
11. Krupatkin AI, Sidorov VV. Laser Doppler flowmetry of microcirculation. Moscow: Medicina; 2005. 254 p.
12. Bollinger A, Hoffman UU, Franzeck UK. Evaluation of flux motion in man by the laser Doppler technique. Blood Vessels. 1997; 241 (5): 349-362.
13. Ivanitskaya NF. Method of obtaining the various stages of hemic hypoxia in rats by administration of sodium nitrite. Pathophysiol and Experi Therapy. 1976; (3): 69-71.
14. Kuszakowski MS. Clinical forms of hemoglobin damage. - Moscow: Medicina, 1968. 326 p.
15. Kozlov VI, Sidorov VV. Investigation of blood flow oscillations in the microcirculation system : Proceedings of the II All-Russian Symposium «Application of laser Doppler flowmetry in medical practice.» - Moscow: W. p.; 1998: 8-14.
16. Mayrovitz H, Groseclose E, Markov M, Pilla A. Effect of permanent magnet sonresting skin blood perfusion in healthy persons assessed by laser Doppler flowmetry and imaging. Bioelectromagnetics. 2001; (22): 494-502.
17. Karupu VY. Electron microscopy. - Kiev: Vishcha Shkola; 1984. 208 p.
18. Weekly B. Electron microscopy for beginners. Moscow: Mir; 1975. 326 p.
19. Weibel ER. Human lung morphometry. Moscow: Medicina; 1970. 170.
20. Seredenko MM, Rozova EV, Velikanov EB, Trizno NN. Morphofunctional characteristic of lung air-blood barrier in the rat during breathing by gas mixtures with a high content of hydrogen sulfide. Morphology. 1992; (5): 120-129.
21. Seredenko MM, Pozharov VP, Rozova EV. About the correspondence of blood oxygenation in the lungs and mass transfer O_2 through the air-blood barrier for the oxygen demand of the organism. Actual problems of modern physiology. Kiev: Naukova Dumka; 1986. P. 224-226.
22. Seredenko MM, Rozova EV About the physiological role of structural and functional changes in the lung air-blood barrier in providing the organism with oxygen under the influence of extreme factors. IM Sechenov J Physiol. 1994; 80 (4): 52-59.
23. Gurova OA, Litvin FB. Microcirculation in adolescents according to Doppler flowmetry. Bul of RUDN, series Medicine. 2000; (2): 100-103.
24. Maynugin SV, Fomin AA, Krasavin VA. First experience in the use of the LDI technology when choosing the level of amputation in patients with critical ischemia. 2012: Mode of access to electronic resources: http://www.aimago.ru/purulent_surgery.htm
25. Abdullaeva SS, Yakusevych VV, Petrochenko AS, Tikhomirov IA, Oslyakova AA. Features of rheological and microcirculatory parameters in patients with severe

- chronic heart failure. Yaroslavl Ped J. 2012 (3), Volume III (Natural Sciences): 162-168.
26. Folkow B. Description of myogemis hypothesis. Circ. Res. 1964; 14-15, Suppl 1: 1270 -1279.
27. Zweifach B.W. Microcirculatory homeostasis (1930-1990): Insight into microcirculatory adjustments provided by studies on the Peripheral Circulatory Insufficiency of the Shock Syndrome. Microcirculation. 1995; 2 (1): 1-7.
28. Reutov VP. Research of regulatory and toxic mechanisms of the influence of nitrite and NO-generating substances in biological systems: Abstr. dis. for scientific degree of doctor of biol. Sciences. Moscow; 2004. 79 p.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Мелітон. пед. ун-т ім. Богдана Хмельницького
E-mail: erozova@ukr.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 24.03.2014*

О.В. Бондаренко¹, Н.М. Гула², М.Ю. Макаrchук¹, Т.М. Горідько², О.А. Коваленко¹

Вплив N-стеароїлетаноламіну на емоційність та здатність до навчання у щурів

¹Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Ін-т біології»; ²Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України; E-mail: bondarenko_oleksandr@ukr.net

Після введення щурам ендоканабіноїдподібної сполуки N-стеароїлетаноламіну (NSE) в дозі 0,1 та 5 мг/кг оцінювали тривожність у хрестоподібному припіднятому лабіринті та здатність до навчання тварин у радіальному лабіринті. Виявлено, що NSE може змінювати як вроджену, так і набуту поведінку щурів. З'ясовано, що введення NSE загалом зменшує тривожну поведінку хоча і не впливає на кількість і тривалість реакцій ґрунгу. Введення NSE в дозі 5 мг/кг хоча і знижує тривожність тварин, але зменшує рухову активність. Встановлено, що введення впродовж 7 діб NSE в дозі 0,1 мг/кг сильніше виявляє анксіолітичні властивості в хрестоподібному припіднятому лабіринті та покращує здатність до навчання в радіальному лабіринті, ніж введення цієї речовини в дозі 5 мг/кг. Застосування NSE в дозі 0,1 мг/кг вже на першу добу вироблення умовної реакції з харчовим підкріпленням у радіальному лабіринті достовірно зменшувало загальну кількість помилок порівняно з контролем. Латентний період взяття 3-го підкріплення у тварин цієї групи був меншим на 1-шу, 5-ту ($P<0,05$) і 6-ту ($P<0,01$) добу. У поведінці щурів, які отримували NSE в обох дозах, не виявлено достовірних відмінностей протягом усього періоду навчання. Таким чином, введення NSE змінює поведінку щурів, але не викликає характерних для канабіноїдних препаратів негативних наслідків на когнітивні функції.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, хрестоподібний припіднятий лабіринт, радіальний лабіринт, тривожність, пам'ять.

ВСТУП

Ендоканабіноїдна система людини та тварин відіграє важливу роль у забезпеченні цілої низки фізіологічних (формування апетиту, статеву поведінку, пам'ять, імунні функції, нейропротекція та ноцицепція) та патологічних (розвиток раку, серцево-судинні захворювання) процесів [1,2]. До складу цієї системи належать канабіноїдні рецептори (CB), ендогенні ліганди (ендоканабіноїди) та білки, що беруть участь у їх біосинтезі, деградації і, можливо, у транспортуванні. Вважається, що ендоканабіноїди діють через канабіноїдні рецептори, які включають 1-й та 2-й тип (CB1 та CB2) рецепторів [3]. Нещодавно також було виявлено здатність деяких канабіноїдів зв'язуватися з білком GPR55 (від англ. G protein-coupled receptor 55) [4, 5], тому

припускається, що він може діяти як новий «3-й тип (CB3)» канабіноїдних рецепторів [6]. Показано, що ендогенними лігандами CB-рецепторів є деякі N-ацилетаноламіни (NAE) – біологічно активні сполуки, молекули яких складаються з етаноламіну, ацильованого за азотом залишками різних жирних кислот. Встановлено значні відмінності у властивостях насичених і ненасичених NAE. До складу ненасичених NAE входять найбільш відомий ендоканабіноїд анандамід та 2-арахідоноїлгліцерол (2-AG), котрі імітують фармакологічну дію Δ^9 -тетрагідроканабінолу – активної сполуки коноплі [7,8]. Насичені NAE не зв'язуються з канабіноїдними рецепторами, а впливають переважно за участю позарецепторних механізмів [9]. Зокрема показано, що вони, ймовірно, гальмують

© О.В. Бондаренко, Н.М. Гула, М.Ю. Макаrchук, Т.М. Горідько, О.А. Коваленко

розпад ненасичених NAE і у такий спосіб посилюють їхню дію [10, 11]. До їх складу входять N-пальмітоїлетаноламін (PEA) та N-стеароїлетаноламін (NSE). Механізм впливу окремих представників як насичених, так і ненасичених NAE може також бути пов'язаним з активацією каналного так званого ванілоїдного TRPV1 (від англ. transient receptor potential vanilloid 1) та ядерних PPAR (від англ. peroxisome proliferator-activated receptors) рецепторів [12].

Протягом останніх 10 років виявилось, що порушення регуляції ендоканабіноїдної системи пов'язано з низкою патологічних станів, а, отже її модуляція має величезне значення для здоров'я людини. Проте останнім часом все більше з'являється даних про побічні ефекти тих ендоканабіноїдів, які опосередковано діють через CB1- або CB2-залежні механізми. Так, результати досліджень деяких авторів свідчать, що вживання агоністів CB1-рецепторів погіршує навчання та пам'ять [13, 14]. З іншого боку, використання найвідомішого блокатору CB1 рецепторів римонабанту сприяє посиленню депресії, тривожності, збільшенню кількості самогубств [15], а також негативно впливає на репродуктивну функцію [16]. Крім того, застосування канабіноїдних препаратів часто обмежене наркогенним і психотропним потенціалом, а також порівняно швидким розвитком залежності до її найбільш виражених поведінкових проявів. Тому актуальним є використання лікарських засобів з потенційними канабіміметичними властивостями, які б не мали побічної дії. Однак вплив одного із представників цієї групи сполук NSE і досі недостатньо вивчено. Слід зазначити, що в мозку щурів [17], мишей і людини NSE становить 11–14 % від загального вмісту N-ацилетаноламінів, тоді як частка анандаміду не перевищує 7–8 % [18]. Разом з тим показано, що NSE виявляє антиоксидантні, мембранопротекторні, адаптогенні властивості [19–21], має протизапальний вплив на експериментальну опікову травму у щурів

[22], а також гальмує ріст і метастазування карциноми Льюїса [23]. Ця сполука діє подібно до ендогенного канабіноїда анандаміду на катаlepsію, рухливість, біль та температуру тіла. У мозку мишей існує специфічний сайт для NSE – SBS (від англ. stearoylethanolamine bindang site), котрий найбільше представлений у корі. Описано наявність специфічного мембранного NSE-транспортера SMT (від англ. stearoylethanolamine membrane transporter) у різних ділянках мозку мишей [24]. Детальні дослідження показали, що NSE не є справжнім ендоканабіноїдом, а скоріше ендоканабіноїдоподібною сполукою, одним із механізмів реалізації біологічної активності якої є опосередкований вплив на деградацію анандаміду [7,25].

Мета нашої роботи – вивчити вплив NSE на вроджену та набуту поведінку щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено в умовах хронічного експерименту на 37 білих щурах-самцях масою 150–200 г. (на початку досліджень), яких утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та їжі. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до біоетичних норм.

На початку експерименту всіх тварин тестували в методиках «відкрите поле» та «чорно-біла камера», які дають змогу оцінити вроджений рівень їх тривожності, локомоторну та орієнтувально-дослідницьку активність в умовах новизни [26, 27]. Після закінчення тестувань тварин було поділено на 3 зрівноважені групи: I – контрольна (n=13) – інтактні тварини, яких не піддавали жодним маніпуляціям, тваринам II та III групи (по n=12 у кожній групі) інтрагастрально, використовуючи пластиковий зонд, протягом 7 діб вводили водні суспензії NSE в дозі 0,1 мг/кг та 5 мг/кг відповідно.

Сполука NSE синтезована в відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. Перевірку впливу самої про-

цедури введення екзогенної речовини при порівнянні контрольних тварин та так званих умовно дослідних (щури, яким проводили контрольну процедуру воду вводили через зонд) нами було проведено в попередніх експериментах [28, 29].

По закінченні введення NSE для визначення рівня тривожності всіх тварин тестували в хрестоподібному припіднятому лабіринті (ХПЛ), який складався з двох відкритих і двох закритих рукавів без стелі та центральної платформи. Рукава були розміщені перпендикулярно. Дослідження поведінки щурів і мишей у ХПЛ широко використовується в доклінічній оцінці терапевтичної ефективності можливих анксиолітиків, адже індуковане препаратами збільшення часу перебування у відкритих рукавах свідчить про анксиолітичний ефект, а у закритих рукавах – про ансіогенний [30]. В усіх щурів упродовж 5 хв реєстрували: час, проведений у відкритих і закритих рукавах та в центрі, кількість заходів у відкриті та закриті рукава, перетинань центральної платформи, заглядань вниз з рукавів лабіринту та виглядань з центральної платформи, кількість і тривалість грумінгу, а також стійок на стіну. Тестування починали з розміщення тварини на центральну платформу головою до закритого рукава.

Далі оцінювали здатність до навчання тварин у радіальному лабіринті (РЛ) протягом 15 діб за методикою Буреша [31]. РЛ в цьому дослідженні являв собою платформу від якої відходили 6 пронумерованих коридорів. У кінці кожного коридора знаходилася пластикова шторка, за якою лежало підкріплення – шматочок твердого сиру. Перед початком тестувань протягом доби всі щури підлягали харчовій деривації при вільному доступі до води. В першу добу експерименту проводили процедуру ознайомлення тварини з РЛ та після попадання до нього давали можливість отримати підкріплення в усіх коридорах. Упродовж наступних 15 діб в 3-х коридорах (№2, 3 та 5) доступ до їжі залишався вільним, а в 3-х був обмеженим – блокувалася

можливість відкривання шторки в коридорах №1, 4 та 6. Оцінка здатності до навчання в РЛ тривала від моменту розміщення щура в його центрі до взяття останнього підкріплення, але не більше ніж 10 хв. Щури мали змогу здійснювати по одній пробіжці в день до годівничок. При аналізі тієї чи іншої пробіжки враховували латентний період взяття кожного підкріплення (ЛП-1, ЛП-2, ЛП-3) (с), кількість взятих підкріплень, а також загальну кількість і характер помилок (вибір неправильного коридора без підкріплення, повторний захід у коридори з підкріпленням) [31].

Для статистичного аналізу результатів використовували програму Statistica for Windows 7.0 (StatSoft). За критерієм Шапіро–Вілکا було визначено, що результати активності поведінки належать до ненормально розподілених, тому для порівняння незалежних вибірок (між групами в одну з досліджуваних діб) використовували критерій Манна–Уїтні, а на графіках представлені у вигляді медіани та 25 і 75 % кватилів. Значення $P < 0,05$ вважали достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

По завершенні введення NSE з'ясувалося, що час перебування в закритих рукавах ХПЛ у тварин III групи був статистично значуще менший порівняно з контролем ($P < 0,05$). У тварин II групи достовірної різниці за цим показником не виявлено, проте спостерігається тенденція до збільшення часу перебування у відкритих рукавах ($P = 0,07$) (рис. 1,а). Виявлено тенденцію до збільшення показника співвідношення між часом перебування у відкритих/закритих рукавах (оцінка прагнення до дослідження нової території) у щурів II ($P = 0,09$) та III ($P = 0,06$) груп щодо контролю (див. рис. 1,б). Результати можуть свідчити про деяке зниження тривожності у щурів, яким вводили NSE в дозі 5 мг/кг і таку саму тенденцію до зниження у тварин, які її отримували в дозі 0,1 мг/кг. Показано, що досто-

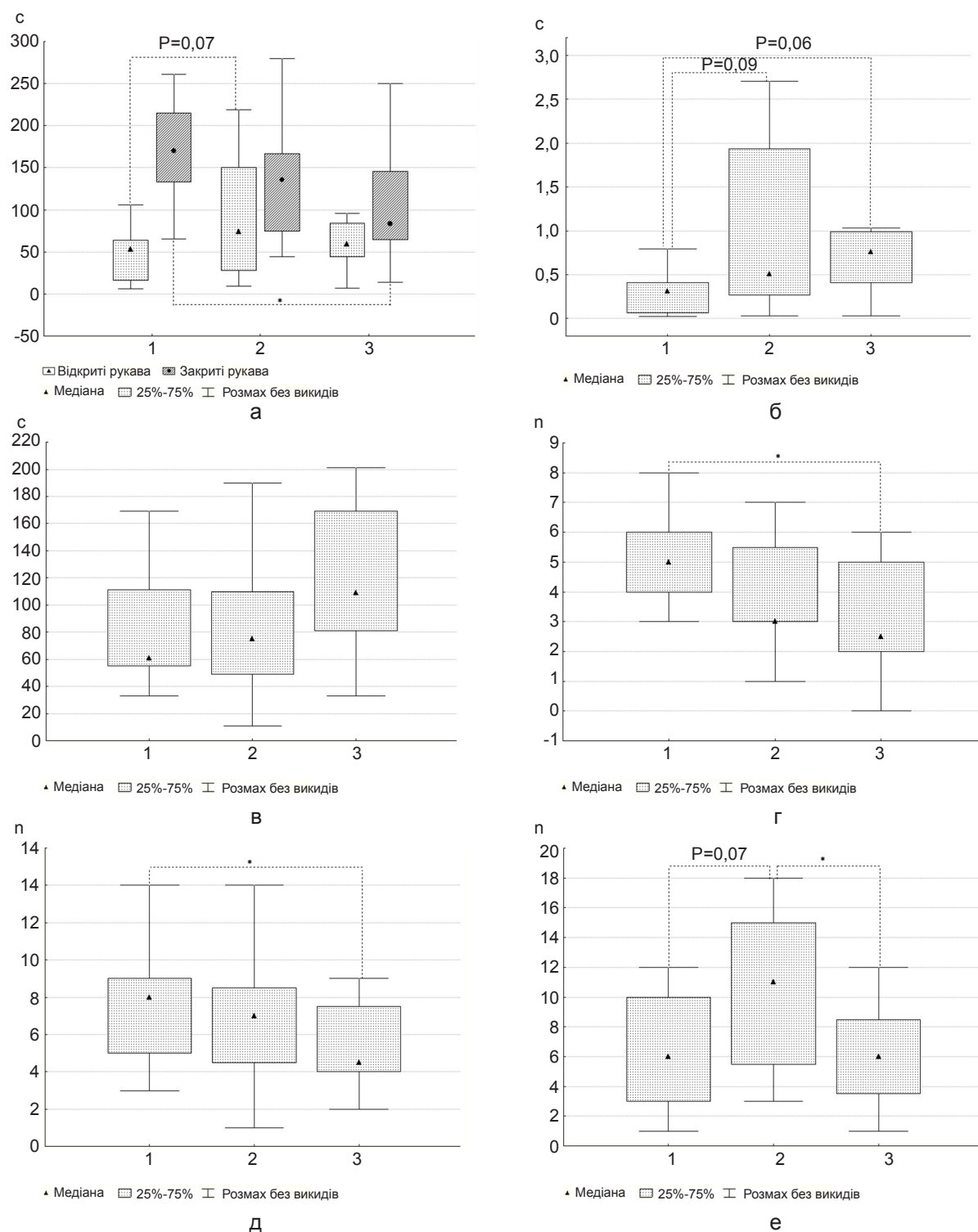


Рис. 1. Основні показники поведінки шурів I–III групи в хрестоподібному припіднятому лабіринті: а – час перебування у відкритих і закритих рукавах; б – співвідношення часу перебування у відкритих і закритих рукавах; в – час перебування на центральній платформі; г – кількість заходів у закриті рукава; д – кількість перетинань центральної платформи; е – кількість заглядань вниз. 1 – контроль, 2 – введення N-стероїлетаноламіну у дозі 0,1 мг/кг, 3 – у дозі 5 мг/кг. * $P < 0,05$

вірних відмінностей між групами тварин за часом перебування на центральній платформі немає (див. рис. 1,в). Не виявлено достовірної різниці між групами щодо кількості заходів у відкриті рукава, але показано зменшення кількості заходів у закриті рукава (див. рис. 1,г) та перетинань центральної платформи (див. рис. 1,д) у тварин III групи порівняно з контролем ($P<0,05$). У тварин II групи спостерігається тенденція до збільшення кількості заглядань вниз (див. рис. 1,е) порівняно з контролем ($P=0,07$). У щурів III групи цей показник достовірно не відрізняється від контролю, але менший порівняно з тваринами II групи ($P<0,05$). Отже, це може означати, що у тварин, які отримували NSE в дозі 5 мг/кг знижується дослідницька активність. Слід зазначити, що між тваринами, яким вводили NSE в обох дозах та контрольними щурами не виявлено достовірної різниці за числом стійок на стіну, кількістю та тривалістю ґрунтігу, що свідчить про відсутність впливу NSE на емоційну активність щурів.

Загалом нами встановлено, що у тварин, яким вводили NSE в обох дозах виявлено деяке зменшення тривожної поведінки, але на емоційну активність ця сполука не впливала. Однак у тварин, які отримували NSE в дозі 5 мг/кг анксиолітичний ефект є меншим, адже у таких щурів зменшується дослідницька активність. У попередніх дослідженнях ми виявили достовірне зменшення локомоторної активності в тесті «відкрите поле» у тварин, які отримували NSE в дозі 5 мг/кг [28]. У літературних джерелах описано, що такі типові ефекти після введення анандаміду, як каталепсія (завмирання) та зменшення рухливості спостерігалися і після використання досліджуваної нами речовини [24]. Проте результати цих досліджень уперше показали, що у тварин, яким вводили NSE в дозі 0,1 мг/кг, дослідницька активність не зменшується порівняно з контролем. Крім того, у таких щурів спостерігається тенденція до збільшення часу перебування у відкритих рукавах, кількості заглядань вниз, а також показника

співвідношення часу перебування у відкритих/закритих рукавах, що теоретично може свідчити про інший механізм дії цієї дози NSE, а, отже, потребує подальшого дослідження.

Показано, що не всі щури були здатні до навчання в РЛ. Частина тварин (I група – 2 щура, II – 3 щура, III – 1 щур), незважаючи на штучно підвищену харчову мотивацію, взагалі не брала підкріплення і не виконувала поставлене завдання, а відтак і не виробляла умовну реакцію. Оскільки такі щури були виявлені і в контролі, то при статистичній обробці результатів показники їх поведінки не враховувалися. Взагалі в РЛ тварина навчається стратегії загального вирішення проблеми і «записує» її в довготривалу пам'ять, але успіх виконання роботи залежить від того, наскільки вона згадає в момент прийняття рішення про змінні сигнали (коридор лабіринту, в який уже заходила). Оптимальними вважалися результати, коли тварина за найменший час лише раз брала підкріплення в кожному з тих 3 коридорів, в яких був доступ до годівниць і повторно в них більше не заходила. Теоретично це можливо лише за умови, коли короткотривала робоча пам'ять про вже пройдені коридори та взяте підкріплення визначає подальший вибір. Збільшення або зменшення кількості помилок в РЛ може вказувати на вплив різноманітних фармакологічних речовин на конкретний вид пам'яті.

Показано, що після 15 діб вироблення умовної реакції в РЛ в останні 4 доби навчання різниці за всіма поведінковими показниками між групами немає, тому ці результати не було представлено графічно. Однак у тварин II групи загальна кількість помилок вже на 1-шу добу була меншою ($P<0,05$; рис. 2,а) порівняно з контролем. В наступні дні експерименту цей показник у таких щурів знижувався, що може вказувати на кращу здатність до навчання у тварин, які отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг. Разом з тим достовірної різниці за кількістю помилок між тваринами I та III групи нами не виявлено. Важливим для розуміння впливу речовин на конкретний вид

пам'яті є оцінювання характеру виявлених помилок – повторних заходів у коридори, в яких уже було взято підкріплення (показник короткотривалої пам'яті) та кількості заходів у коридори з обмеженим доступом до їжі (показник довготривалої пам'яті). За

кількістю повторних заходів у коридори з підкріпленням спостерігалася тенденція до їх зменшення у тварин II та III групи на 6-ту добу навчання порівняно з контролем (див рис.2,б.). Це може свідчити про відсутність негативного впливу NSE як у дозі 0,1 мг/

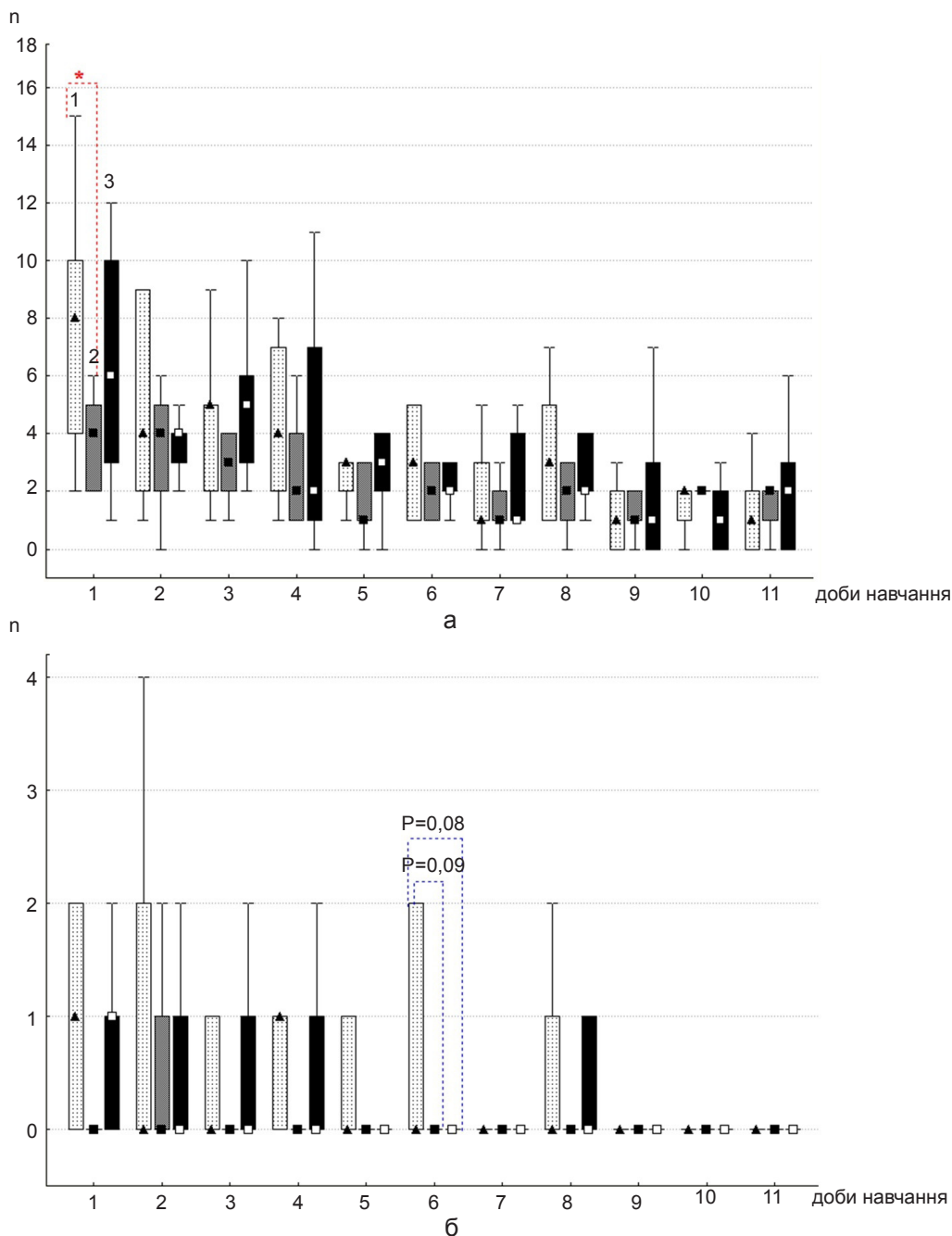


Рис. 2. Основні показники поведінки щурів в радіальному лабіринті: а – загальна кількість помилок, б – кількість повторних заходів в коридори з підкріпленням у щурів I–III групи. 1 – контроль, 2 – введення N-стероїлетаноламіну у дозі 0,1 мг/кг, 3 – у дозі 5 мг/кг. * $P < 0,05$

кг, так і 5 мг/кг на короткотривалу пам'ять. Щодо кількості заходів у коридори без доступу до підкріплення, то упродовж усіх діб навчання між тваринами, яким вводили NSE в різних дозах, та контрольними щурами достовірних відмінностей не виявлено. Між тваринами II та III групи за всіма описаними вище показниками відмінностей немає.

За кількістю узятих підкріплень достовірної різниці між групами протягом всього експерименту не було, проте є відмінності у швидкості їх взяття (ЛП-1, ЛП-2, ЛП-3). Більш інформативними є зміни ЛП-1 та ЛП-3, оскільки вони можуть указувати на те, як швидко тварина починає та закінчує виконання поставленого завдання, тому при статистичній обробці результатів показник ЛП-2 не враховувався. Виявлено, що у тварин II групи порівняно з контрольними щурами ЛП-1 був дещо меншим, починаючи з перших діб навчання, а показник ЛП-3 у тварин цієї групи достовірно меншим на 1-шу, 5-ту ($P<0,05$) і 6-ту ($P<0,01$) добу та мав тенденцію до зниження на 2-гу ($P=0,08$) та 3-тю ($P=0,07$) добу. У тварин III групи ЛП-1, навпаки, був

більшим, ніж у контрольних щурів на 1-шу та 3-тю добу, а ЛП-3 хоча і зменшувався, проте такі зміни не були достовірними, що може вказувати на повільніше виконання умовної реакції у тварин, яким вводили NSE в дозі 5 мг/кг. Між щурами II та III групи достовірних відмінностей за обома показниками немає (рис. 3). Отже, дослідження в РЛ показало, що тварини, які отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг краще виробляють умовну реакцію з харчовим підкріпленням. Це проявляється меншою кількістю помилок і нижчим показником ЛП порівняно з інтактними тваринами. Також існує тенденція до зменшення кількості повторних заходів у коридори з підкріпленням, що може свідчити про провідну роль саме пам'яті, а не більш вираженої харчової мотивації в успішності проходження цього тесту. У тварин, яким вводили NSE в дозі 5 мг/кг таких відмінностей порівняно з інтактними тваринами немає, а є лише тенденція до зменшення кількості повторних заходів і ЛП-3. У поведінці щурів, які отримували NSE в обох дозах не виявлено достовірних відмінностей протягом усіх

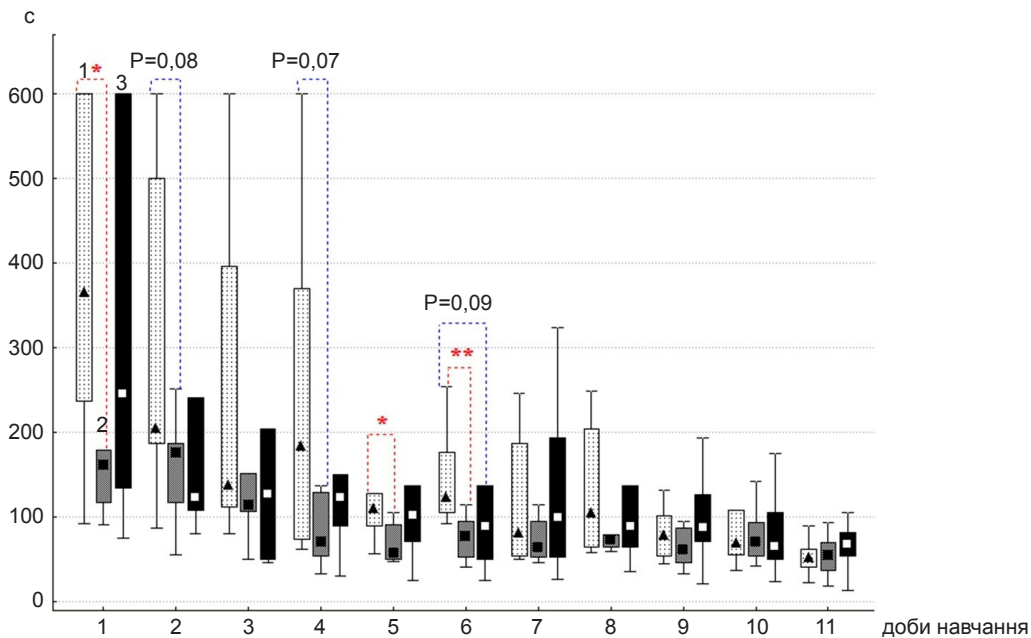


Рис. 3. Латентний період взяття 3-го підкріплення в щурів I–III групи в радіальному лабіринті. 1 – контроль, 2 – введення N-стероїлетаноламіну у дозі 0,1 мг/кг, 3 – у дозі 5 мг/кг. * $P<0,05$; ** $P<0,01$

діб навчання. Слід відмітити, що у тварин III групи основні показники успішності навчання мають проміжні значення між відповідними значеннями у тварин I та II групи, а тому у щурів III групи наявна лише тенденція до покращення навчання, тоді як у тварин II групи воно є статистично достовірним. Разом з тим після введення NSE в дозі 5 мг/кг, можливо, внаслідок зменшення рухової активності збільшується час успішного проходження даного тесту.

Таким чином, введення NSE змінює поведінку щурів, але не викликає характерних для канабіноїдних препаратів негативних наслідків на когнітивні функції, а навпаки сприяє їх покращенню. Ці ефекти більшою мірою проявляються за умови його введення в дозі 0,1 мг/кг. Крім того, за такої дози NSE не змінюється рівень тривожності та рухова активність тварин, у той час як введення NSE в дозі 5 мг/кг хоча і дещо знижує тривожність, але зменшує рухову активність і не впливає на навчання щурів.

**А.В. Бондаренко, Н.М. Гула, Н.Е. Макачук,
Т.Н. Горидько, О.А. Коваленко**

ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА НА ЭМОЦИОНАЛЬНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ У КРЫС

После введения крысам эндоканнабиноидоподобного соединения N-стеароилэтанолamina (NSE) в дозе 0,1 и 5 мг / кг оценивали тревожность в крестообразном приподнятом лабиринте и способность к обучению животных в радиальном лабиринте. Выявлено, что NSE способно изменять как врожденное, так и приобретенное поведение крыс. Выяснено, что введение NSE в целом уменьшает тревожное поведение и не влияет на количество и продолжительность реакций груминга. Введение NSE в дозе 5 мг/кг хотя и снижает тревожность животных, но уменьшает двигательную активность. Установлено, что введение в течение 7 суток NSE в дозе 0,1 мг/кг сильнее проявляет анксиолитические свойства в крестообразном приподнятом лабиринте и улучшает способность к обучению в радиальном лабиринте чем введении этого вещества в дозе 5 мг/кг. Применение NSE в дозе 0,1 мг/кг уже в первые сутки выработки условной реакции с пищевым подкреплением в радиальном лабиринте достоверно уменьшало общее количество ошибок по сравнению с контролем. Латентный период

взятия 3-го подкрепления у животных этой группы был меньше на 1-е, 5-е ($P < 0,05$) и 6-е ($P < 0,01$) сутки. При этом между крысами, которые получали NSE в обеих дозах, не выявлено достоверных различий в поведении в течение всего периода обучения. Таким образом, NSE меняет поведение крыс, но не вызывает характерных для каннабиноидных препаратов негативных влияний на когнитивные функции, а наоборот способствует их улучшению.

Ключевые слова: N-стеароилэтанолamin, крестообразный приподнятый лабиринт, радиальный лабиринт, тревожность, память.

**O.V. Bondarenko¹, N.M. Hula², M.Yu. Makarchuk¹,
T.M. Horid'ko², O.A. Kovalenko¹**

EFFECTS OF N-STEAROYLETHANOL- AMINE ON THE EMOTIONALITY AND LEARNING ABILITY OF RATS

After administration of endocannabinoid-like compound N-stearoylethanolamine (NSE) at a dose of 0,1 and 5 mg/kg the anxiety level of rats in the elevated plus maze and learning ability of rats in the radial maze were investigated. It was revealed that NSE can change both innate and acquired behavior of rats. It was found that the administration of NSE decreased of anxious behavior in general, although number and duration of grooming were not affected. Administration of NSE at a dose of 5 mg/kg decreases of anxious behavior in rats but also decreases locomotor activity. Higher anxiolytic effect of the substance in the elevated plus maze and growth of learning ability in the radial maze were shown during 7 days' introduction of NSE at a dose of 0,1 mg/kg that administration of this substance at a dose of 5 mg/kg. Administration of NSE at a dose of 0.1 mg/kg significantly reduced the total number of errors in the radial maze compared to the control at the first day of conditioning with food reinforcement. The latent period of 3rd reinforcement's taking in animals in this group was lower on the 1st, 5th ($P < 0.05$) and 6th ($P < 0.01$) days. Nevertheless, it was found no significant differences in the behavior in rats treated with NSE in both doses throughout the study period. Therefore, NSE changes the behavior of rats and contributes to the improvement of cognitive function without negative effects specific to cannabinoid drugs.

Key words: N-stearoylethanolamine, elevated plus maze, radial maze, anxiety, memory.

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre;

²Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Ligresti A, Petrosino S, Di Marzo V. From endocannabinoid profiling to "endocannabinoid therapeutics".

- Curr Opin Chem Biol. 2009 Jun;13(3):321-31. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.04.615. Epub 2009 Jun 3.
2. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. Trends Biochem Sci. 2010 Nov;35(11):601-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.008. Epub 2010 Jun 8.
3. Sugiura T, Waku K. Cannabinoid Receptors and Their Endogenous Ligands. J Biochem. 2002 Jul;132(1):7-12.
4. Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? Br J Pharmacol. 2007 Dec;152(7):984-6. Epub 2007 Sep 17.
5. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol. 2007 Dec;152(7):1092-101. Epub 2007 Sep 17.
6. Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. Curr Med Chem. 2010;17(14):1411-29.
7. Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E. Cannabinoids and brain injury: Therapeutic implications. Trends Mol Med. 2002 Feb;8(2):58-61.
8. Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. Chem Phys Lipids. 2000 Nov;108(1-2):89-106.
9. Welch SP, Eads M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. Brain Res. 1999 Nov 27;848(1-2):183-90.
10. Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Eur J Pharmacol. 2005 Jul 11;517(3):174-81.
11. Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. Eur J Biochem. 2004 May;271(10):1827-34.
12. Di Marzo V, De Petrocellis L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. Curr Med Chem. 2010;17(14):1430-49.
13. Sullivan JM. Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. Learn Mem. 2000 May-Jun;7(3):132-9.
14. Varvel SA, Anum EA, Lichtman AH. Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in. Psychopharmacology (Berl). 2005 Jun;179(4):863-72. Epub 2004 Dec 24.
15. Christopoulou FD, Kiortsis DN. An overview of the metabolic effects of rimonabant in randomized controlled trials: potential for other cannabinoid 1 receptor blockers in obesity. J Clin Pharm Ther. 2011 Feb;36(1):10-8. doi: 10.1111/j.1365-2710.2010.01164.x.
16. Bari M, Battista N, Pirazzi V, Maccarrone M. The manifold actions of endocannabinoids on female and male reproductive events. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:498-516.
17. Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in rat brain. J Neurosci. 1997 Feb 15;17(4):1226-42.
18. Maccarrone M, Attinà M, Bari M, Cartoni A, Ledent C, Finazzi-Agrò A. Anandamide degradation and N-acylethanolamines level in wild-type and CB1 cannabinoid receptor knockout mice of different ages. J Neurochem. 2001 Jul;78(2):339-48.
19. Horid'ko TM, Hula NM, Stohniï NA, Mehedi' OF, Klimashevs'kyi VM, Shovkun SA, et al. Influence of N-stearoylethanolamine on the lipid peroxidation process and lipid composition of the rat liver under acute morphine intoxication. Ukr Biokhim Zh. 2007 Sep-Oct;79(5):175-85 [Ukrainian].
20. Hula NM, Marhitych VM, Artamonov MV, Zhukov OD, Horid'ko TM, Klimashevs'kyi VM. Neuroprotective effect of N-acylethanolamines under chronic morphine dependence. i. rat brain phospholipids as a rational target of their action. Ukr Biokhim Zh. 2004 Sep-Oct;76(5):123-31 [Ukrainian].
21. Artamonov M, Zhukov O, Shuba I, Storozhuk L, Khmel T, Klimashevsky V, et al. Incorporation of labelled N-acylethanolamine (NAE) into rat brain regions in vivo and adaptive properties of saturated NAE under X-ray irradiation. Ukr Biokhim Zh. 2005;77(6):51-62.
22. Hula NM, Chumak AA, Berdyshev AH, Mehedi' OF, Horid'ko TM, Kindruk NL, et al. Anti-inflammatory effect of N-stearoylethanolamine on experimental burn wound in rats. Ukr Biokhim Zh. 2009 Mar-Apr;81(2):107-16 [Ukrainian].
23. Hula NM, Khmel' TO, Klimashevs'kyi VM. The influence of N-stearoylethanolamine on lipid composition of the metastases and conditionally normal lung tissue in mice with Lewis carcinoma. Ukr Biokhim Zh. 2006 Mar-Apr;78(2):97-105 [Ukrainian].
24. Maccarrone M, Cartoni A, Parolaro D, Margonelli A, Massi P, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide with in the mouse central nervous system. Mol Cell Neurosci. 2002 Sep;21(1):126-40.
25. Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: Are these two fatty acid amides cannabimimetic? Curr Med Chem. 1999 Aug;6(8):757-73.
26. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. Behav Brain Res. 2001 Nov 1;125(1-2):141-9.
27. Bogdanov VB, Bogdanova OV, Koulchitsky SV, Chauvel V, Multon S, Makarchuk MY, et al. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats // Behav Brain Res. 2013 Jan 1;236(1):90-3. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.004. Epub 2012 Aug 14.
28. Bondarenko O, Gulaya N, Makarchuk M, Goridko T, Baban V, Kovalenko O. Effects of n-stearoylethanolamine and chronic alcoholization on behavioral reactions of rats

- in "open-field". Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2013;62:285–293 [Ukrainian].
29. Bondarenko OV, Hula NM, Makarchuk MYu, Horid'ko TM. Effects of N-stearoylethanolamine on anxiety-like behavioral reactions of rats after chronic alcoholization. Biologija. 2014;60(1): 23–31.
30. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav. 1996 May;54(1):21-30.
31. Buresh J, Bureshova O, Houston JP. Methods and Main Experiments for Studies of the Brain and Behavior [Russian]. Moscow: Higher School;1991.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Ін-т біології»;

Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

E-mail: bondarenko_oleksandr@ukr.net

Матеріал надійшов

до редакції 27.03.2014

Л.С. Насіб'ян, І.Б. Філіппов

Модуляція скорочення міометрія щурів пептидогліканом клітинної стінки золотистого стафілокока

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: phil@biph.kiev.ua

Вивчено вплив компонента клітинної стінки золотистого стафілокока пептидоглікану (0,003 мг/мл) на динаміку скоротливої активності міометрія невагітних самиць щурів після прийому естрогену та після моделювання псевдовагітності. Показано, що чутливість міометрія щурів до пептидоглікану залежить від гормонального фону. Цей компонент модифікує спонтанну скоротливу активність матки як невагітних, так і псевдовагітних щурів. У тварин після введення естрогену він зменшує тривалість і частоту скорочень міометрія (подовжує матковий цикл), тоді як у псевдовагітних щурів збільшується не тільки амплітуда, але і тривалість та частота скорочень (зменшує матковий цикл). Доведено, що пептидоглікан відносно простагландину F_{2α} (10 мкмоль/л) є більш потужним утеротоніком. Зроблено висновок, що зміни скоротливої активності міометрія під дією цього компонента можуть впливати на фертильність та на перебіг вагітності.

Ключові слова: міометрій, скорочувальна активність, золотистий стафілокок, пептидоглікан, псевдовагітність.

ВСТУП

Запальні захворювання органів малого тазу є найбільш частою причиною порушення репродуктивного здоров'я жінок, створюючи серйозну медичну, соціальну та економічну проблеми в усьому світі. В основному, вони мають інфекційну природу, специфічну або неспецифічну. Структура збудників інфекційних процесів за останні роки на тлі погіршення екологічного стану, урбанізації суспільства, широкого розповсюдження інфекцій, що передаються статевим шляхом, збільшення числа імунodefіцитних станів, кількості внутрішньоматкових маніпуляцій (у тому числі абортів), частого безконтрольного застосування антибіотиків помітно змінилася, що пов'язано з постійною еволюцією бактерій і включенням у патологічні процеси умовно-патогенних мікроорганізмів і мікстинфекції [1–4].

Під час вагітності інфекційно-запальні захворювання мають деякі особливості: в умовах природного пригнічення імунітету при

© Л.С. Насіб'ян, І.Б. Філіппов

наявності позаматкових вогнищ хронічного запалення посилюється вірогідність інфікування матки; перебіг більшості таких захворювань латентний або субклінічний, що ускладнює своєчасну діагностику та лікування; активація персистуючої інфекції можлива при порушенні будь-якого показника гомеостазу в організмі вагітної; плод може інфікуватися як при гострому інфекційному захворюванні матері, так і при активації хронічних форм [5].

Лише в 5 % випадків інфекція проникає в ендометрій з екстрагенітальних вогнищ гематогенним, лімфогенним або низхідним шляхами, в інших випадках збудники потрапляють у матку висхідним шляхом із піхви після внутрішньоматкових маніпуляцій. Серед неспецифічних збудників найчастіше запалення внутрішніх статевих органів спричинюють стрептококи групи В, стафілококи, кишкова паличка та віруси [6]. Існують дані про те, що внутрішньоматкова інфекція може ускладнити пологи, викликати переривання вагітності та передчасні пологи без видимих ознак інфекції [7–9].

Золотистий стафілокок не входить до складу нормальної мікрофлори зовнішніх статевих органів, але він часто в невеликій кількості виділяється з піхви здорових жінок. Тому сам факт виділення стафілокока не свідчить про патологію. Патогенні його властивості проявляються при імуносупресивних та імунодифіцитних станах жінки, тривалій внутрішньоматковій контрацепції, невиліковному бактеріальному вагінозі з м'яким перебігом, променевої терапії органів малого тазу, вагітності [6, 10]. Ключовим компонентом клітинної стінки грампозитивних (в тому числі золотистого стафілокока), грамотрибних і мікобактерій є пептидоглікан (ПГ), який забезпечує підтримання цілісності плазматичної мембрани. Крім того, він – основний фактор патогенності цих бактерій. Його вивільнення під час росту або руйнування клітинної стінки мікроорганізму розповсюджується течією крові абсорбується на клітинах-мішенях та ініціює адаптивні імунні реакції. Саме з дією ПГ пов'язують розвиток виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, виразковий коліт і хворобу Крона, реактивний артрит [11, 12].

ПГ золотистого стафілокока може викликати запальну реакцію [13]. При інтраперитонеальному введенні експериментальним тваринам стимулює напрацювання макрофагами та моноцитами прозапальних цитокінів і хемокінів (фактор некрозу пухлин- α , інтерлейкін-1, інтерлейкін-6 та інтерлейкін-8), максимальний пік яких при грампозитивній інфекції спостерігають на 50–75-ту годину після інфікування [14]. При запаленні, викликаному ПГ грампозитивних і грамотрибних бактерій, експресія інтерфероніндуцибельних генів не відбувається [13]. Для стимуляції клітинної відповіді *in vitro* потрібна значно більша, порівняно з ліпополісахаридами грамотрибних бактерій, концентрація ПГ – 0,001 до 0,005 мг/мл [15, 16]. Наприклад, для ліпополісахаридів *Escherichia coli* вона становить у середньому 100 нг/мл [13]. ПГ утворює впорядковану структуру комірчастої

будови, яка складається з N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних β -1,4-глікозидними зв'язками. Залишки N-ацетилмурамової кислоти зшиті між собою за допомогою коротких пептидів. Типовий пептидний ланцюг містить L-аланін, D-глютамінову кислоту, мезо-діамінопімелінову кислоту (DAP), L-лізін, D-аланін [17]. Така тривимірна структура надає клітинній стінці бактерій міцність і захист від осмотичного лізису. Грампозитивні бактерії у другій позиції ланцюга пептидної субодиниці містять лізін, у той час як у грамотрибних – DAP. Важливо, що ці пептидні субодиниці містять DAP і D-ізомери амінокислот, що не характерно для еукаріотів.

Мета цієї роботи – дослідити вплив ПГ на скоротливу активність міометрія щурів, які отримували препарат естрогена, а також псевдовагітних тварин.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на смужках міометрія статевозрілих самиць щурів лінії Вістар масою 200–250 г при дотримуванні положень Конвенції з біоетики Ради Європи [Страсбург, 1986].

Створення гормонального фону. Щурам протягом 2 діб перорально вводили препарат 17- β -естрадіолу («Schering», Німеччина) в дозі 1 мкг на тварину. Потім їх розділили на три групи (по 10 щурів у кожній): до I увійшли щури, які отримували тільки 17- β -естрадіол, II та III групи отримували медроксипрогестерон («Пфайзер», Бельгія) в дозі 0,2 мг на тварину протягом 14 і 22 діб відповідно. Самиці III групи вводили медроксипрогестерон протягом 22 діб, що відповідає середній тривалості вагітності у щурів. Використана послідовність введення спочатку 17- β -естрадіолу створює високий вміст рецепторів прогестерону, який зумовлює подальші зміни морфології матки. Такий підхід дає можливість відтворити повну морфологічну картину вагітної матки

з характерною для неї функціональною проліферацією ендометрію, гіпертрофією міометрія та утворенню щільних контактів між гладеньком'язовими клітинами (ГМК) [18].

Підготовка смужок міометрія та вимірювання скорочення. Усіх тварин наркотизували ефіром і декапітували. Роги матки швидко видаляли та поміщали в оксигенований (95 % O_2 і 5 % CO_2) розчин Кребса (ммоль/л): NaCl – 120,4; KC – 15,9; $CaCl_2$ – 1,8; $MgCl_2$ – 1,2; NaH_2PO_4 – 1,2; $NaHCO_3$ – 15,5; глюкози – 11,5 (pH 7,4; 37 °C). Потім їх розрізали уздовж, очищали від сполучної тканини та ендометрію і нарізали смужки довжиною 0,7–1,0 см, шириною 0,2–0,3 см, які поміщали в проточну камеру з одним кінцем зафіксованим нерухомо, а другим – прикріпленим до ємнісного датчика сили з базовим навантаженням 3 мН. Скоротливу активність записували через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер і паралельно на чорнильний самописець.

Про характер скоротливої діяльності ГМ матки й впливу на неї ПГ судили за середньою частотою й амплітудою скорочень протягом 10 хв, їх тривалістю, пауз між ними, матковим циклом, а також за індексом активності скорочень (відношення тривалості скорочень до тривалості пауз між ними). Також визначали середню швидкість наростання скорочення T_{max}/t . Цей показник характеризує ступінь координації між ГМК у стінці матки [19]. Його розраховували за амплітудами 3 циклів скорочень, поділених на час, необхідний для досягнення максимальної амплітуди скорочення [20]. Визначали коефіцієнт асиметрії (відношення тривалості систоли до тривалості діастоли скорочення). Скоротливу активність матки оцінювали в одиницях Монтевідео (MU) і в Олександрійських одиницях (OU). MU визначали як добуток середньої амплітуди й частоти скорочення за 10 хв [21]. OU є модифікацією одиниць MU і визначаються як добуток значень MU й середньої тривалості скорочень за 10 хв [22]. Застосовують OU у разі, коли тривалість циклів маткових скорочень змінюється.

Оцінювали вплив ПГ на потоки кальцію до міоплазми ГМК міометрія за методом Лаптева та співав. [23]. Для цього визначали максимальні швидкості наростання напруження (dP/dt_{max}) та розслаблення (dP/dt_{min}) до і після дії досліджуваного препарату, потім розраховували приріст швидкості напруження й швидкості розслаблення м'яза відношенням цих показників. Залежно від співвідношення отриманих результатів судили про механізм дії речовини на м'яз.

Усі досліджувані речовини були від фірми «Sigma-Aldrich» (США). ПГ розводили 0,9%-м розчином NaCl в концентрації 2 мг/мл і додавали до розчину Кребса в концентрації 0,003 мг/мл. Простагландин F2 α розводили в базовій концентрації етанолу 20 ммоль/л і додавали до розчину Кребса в концентрації 10 мкмоль/л.

Аналіз результатів і статистика. Для кожного типу експерименту результати подавали у вигляді середнє $\pm$ стандартна похибка середнього з позначенням числа смужок «n», на яких вони отримані. Статистичне порівняння контрольних значень показників і значень під впливом ПГ та простагландину F2 α , а також порівняння між групами проводили за допомогою критерію t Стьюдента, вважаючи відмінності з $P < 0,05$ значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спонтанна скоротлива активність міометрія щурів за умов моделювання псевдовагітності. Проведені експерименти показали, що спонтанна скоротлива активність міометрія щурів з модельованою псевдовагітністю та у тварин, які отримували лише препарат естрогену, різко відрізняються (рис. 1). Насамперед це виражалось в зміні сили та частоти скорочень, а також зміні структури скоротливого акта. У порівнянні з тваринами контрольної групи амплітуда спонтанних скорочень міометрія на 14-ту добу псевдовагітності зменшувалася в середньому на 80 %. На 20–22-ту добу вона була дещо відмінна. Досліджувані

смужки міометрія протягом усього періоду врівноваження генерували періодичні спонтанні скорочення, амплітуди яких були менші у середньому на 16 % порівняно з контролем.

Частота скорочень теж зменшувалася: якщо смужки міометрія щурів І групи скорочуються в середньому 7 разів за 10 хв, то у тварин II і III груп їхня частота була меншою в се-

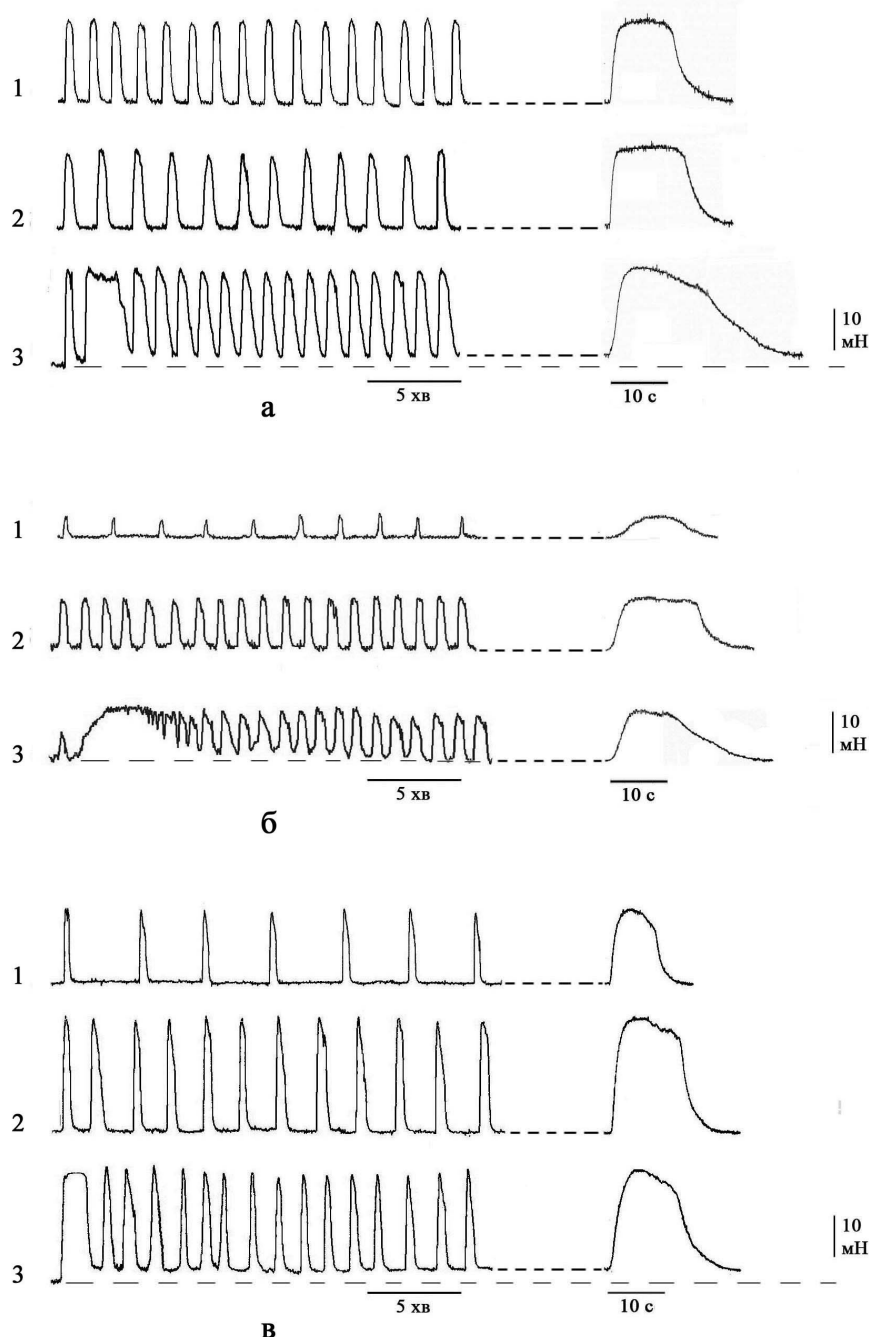


Рис. 1. Спонтанна скоротлива активність міометрія щурів під дією пептидоглікану та простагландину F2α. Тварини, яким вводили препарат естрогену (а), щури на 14-ту (б) та 20-ту (в) добу псевдовагітності. 1 – спонтанна активність; 2 – скорочення під впливом пептидоглікану; 3 – скорочення під впливом простагландину F2α. Пунктирна лінія під кривою скорочення – вихідний тонус

редньому на 30 і 50 % відповідно. Її зниження зумовлено значним збільшенням тривалості маткового циклу. Треба зазначити, що моделювання псевдовагітності призводить до різких змін структури скоротливого циклу, а саме до змін співвідношень фаз скоротливого акта: тривалості скорочень до тривалості пауз між ними. Таке співвідношення або індекс активності цих показників для тварин I групи має значення $0,72 \pm 0,03$ ум.од., а для II та III – $0,15 \pm 0,01$ і $0,14 \pm 0,01$ ум.од. відповідно. Тобто за умов моделювання псевдовагітності його значення зменшується в середньому на 80 %. Також знижується і потужність маткових скорочень у тварин цих груп порівняно з тваринами I групи, на що вказує збільшення значень коефіцієнта асиметрії (таблиця). Різниця в скоротливості матки між трьома групами тварин демонстративно проявляється при зіставленні показників скоротливих індексів: MU і AU. Для тварин II і III груп MU зменшувалися в середньому на 84 і 42 %, а AU – на 88 і 42 % відповідно.

Вплив ПГ на спонтанну скоротливу активність міометрія щурів. ПГ модифікував спонтанну скоротливу активність міометрія щурів усіх груп. Він впливав на силу, частоту та тривалість маткового циклу. Слід зазначити, що дія ПГ на міометрій I, II та III груп тварин неоднакова (див. таблицю, рис. 1). Реєстрація скоротливої активності міометрія щурів I групи показала, що на 30-й хвилині дії ПГ сповільнював її функціональну активність: зменшував частоту, амплітуду і тривалість скорочень у середньому на 19; 4,5 та 15 % відповідно, а їхню тривалість збільшував у середньому на 110 %. Різницю скорочення матки під дією ПГ і контрольним значенням добре видно при зіставленні показників індексу активності скорочень і скоротливих індексів. Індекс активності скорочень зменшувався в середньому на 60 %, а MU і AU – на 22 і 33 % відповідно. Зовсім по-іншому ПГ впливає на спонтанну скоротливу активність міометрія псевдовагітних тварин. Характерною рисою є виражене її

посилення. У тварин II і III груп на дію ПГ відносно контрольного значення збільшувалася частота скорочень в середньому на 45 і 58 %, тривалість скорочень – на 114 та 38 %, амплітуда скорочень – на 90 і 60 % відповідно, тоді як тривалість маткового циклу зменшувалася тільки у тварин III групи в середньому на 48 %. Індекс активності скорочень збільшився в середньому в 5,7 і 3,7 рази відповідно, тоді як MU і AU – 194 і 152 % та 297 і 47 % відповідно. Для тварин усіх груп зареєстровано значне зростання швидкості досягнення максимуму скорочення порівняно з контролем.

Таким чином, отримані результати показують, що чутливість міометрія щурів до ПГ залежить від гормонального статусу тварин. Він модифікує спонтанну скоротливу активність матки щурів як контрольної групи, так і псевдовагітних щурів без впливу на базальний тонус ГМ. Викликані ним зміни скоротливої активності міометрія в трьох групах тварин різні. У тварин I групи ПГ більшою мірою впливає на тривалість пауз між скороченнями (призводить до зменшення частоти), ніж на тривалість самих скорочень (див. таблицю; рис. 1,а,б). Для тварин II і III груп реакція включає зростання сили, тривалості та частоти скорочень (див. таблицю; рис. 1,б,в).

Порівняльна дія простагландину F2 α та ПГ на скорочення міометрія щурів. Ми порівняли дію ПГ на скорочення гладеньких м'язів матки з простагландином F2 α . Відомо, що він здатний усувати прогестеронову блокаду [24], викликаючи передчасні пологи [25] через підсилення скоротливої діяльності матки, що проявляється у збільшенні частоти, амплітуди та тривалості скорочень ГМ матки. У тварин I–III груп простагландин F2 α : збільшував частоту в середньому на 26, 110, 110 % і зменшував тривалість пауз між скороченнями смужок міометрія в середньому на 40, 35, 72 % відповідно відносно контролю. У зв'язку з цим значення скоротливих індексів на його дію були дещо більшими порівняно

Скоротлива активність міометрія щурів, що піддавалися естрогенізації та «псевдовагітних» щурів під дією пептидоглікану та простагландину F_{2α}. (M ± m, n=15). *P<0,05 порівняно з контрольним значенням; **P<0,05 вірогідність щодо ефекту простагландину F_{2α}

Показники, схема досліджу	Контроль	Простагландин F _{2α}	Пептидоглікан
Частота, 10 хв ⁻¹			
щери після естрогенізації	7,04±0,35	8,89±0,36*	5,70±0,29*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	5,00±0,00	10,50±0,50*	7,50±0,50*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	3,50±0,75	7,18±0,27	5,40±0,50
Амплітуда скорочення, мН			
щери після естрогенізації	19,59±0,98	18,64±1,28	18,80±0,80
псевдовагітні на 14-ту добу	4,45±0,26	7,00±0,15*	8,75±0,00*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	16,5 ±0,75	22,33±0,46	26,69±1,22
Тривалість систоли, с			
щери після естрогенізації	7,90±0,28	9,28±0,27*	7,00±0,35*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	8,50±0,26	15,00±0,03*	7,50±0,00*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	9,0±0,12	7,19±0,38 *	6,88±0,53*
Тривалість діастолі, с			
щери після естрогенізації	18,44±0,57	22,49±0,71*	14,40±1,97*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	9,00±0,06	21,84±1,48*	11,00±0,84**
псевдовагітні на 22-гу добу	12,10±0,42	11,12±0,87	10,05±0,99
Тривалість скорочення, с			
щери після естрогенізації	25,03±1,53	34,86±4,21*	21,40±1,69*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	19,00±1,01	36,17±1,17*	25,71±0,78*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	25,10±1,37	23,82±1,28	21,25±1,50
Тривалість пауз між скороченнями, с			
щери після естрогенізації	35,24±5,45	21,38±1,34*	72,50±12,71*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	70,90±4,08	47,63±1,77*	52,26±5,36*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	181,00±9,00	49,75±2,46*	72,50±4,29*,**
Тривалість маткового циклу, с			
щери після естрогенізації	60,27±4,03	56,21±3,17	93,90±6,40*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	83,24±4,60	83,80±3,79	77,97±3,55
псевдовагітні на 22-гу добу	196,80±6,55	73,57±2,16*	93,75±5,79*,**
Індекс активності скорочення, ум.од.			
щери після естрогенізації	0,72±0,03	1,63±0,06*	0,31±0,03*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	0,15±0,01	0,76±0,03*	0,85±0,03*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	0,14±0,01	0,47±0,03*	0,51±0,03*
Одиниці Монтевідео, ум.од.			
щери після естрогенізації	138,26±7,89	174,94±10,68*	107,54±5,79*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	22,25±0,75	73,45±1,11*	65,63±2,53*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	58,14±8,66	160,41±5,39*	146,19±12,99*
Олександрійські одиниці, ум.од.			
щери після естрогенізації	3474,48±319,86	6150,24±798,52*	2312,71±228,97*,**
псевдовагітні на 14-ту добу	423,26±21,20	2656,69±102,12*	1681,39±66,82*,**
псевдовагітні на 22-гу добу	1453,58±216,11	3814,54±187,46*	3119,58±286,05*,**

Примітка. *P<0,05 порівняно з контрольним значенням; ** вірогідність щодо ефекту простагландину F_{2α}.

з ПГ (див. таблицю). Слід зазначити, що скоротливі реакції смужок міометрія тварин цих груп на прикладання простагландину F2 α мають свої особливості, які насамперед стосуються змін базального тону – скорочення спостерігаються на тлі підвищеного тону. У тварин I та III груп він збільшується на $2,29 \pm 0,19$ і $2,54 \pm 0,57$ мН відповідно (див. рис. 1,а,в). Для смужок міометрія тварин II групи характерним було збільшення амплітуди скорочень з одночасним поверненням тону до вихідного рівня (див. рис. 1,б).

Обчислення коефіцієнта асиметрії [26] відображає потужність маткових скорочень: чим менше його значення, тим більша потужність. З таблиці і рис. 2 видно, що на прикладання ПГ і простагландину F2 α його значення у тварин I групи змінювалося статистично недостовірно відносно контролю ($0,43 \pm 0,03$ ум.од.). Для тварин II і III груп коефіцієнт асиметрії зменшувався відносно контрольного значення ($0,95 \pm 0,05$ ум.од. і $0,91 \pm 0,06$ ум.од. відповідно) в середньому на 27 % ($P < 0,001$), але не сягав контролю, отриманого для тварин I групи. Тобто, ПГ і простагландин F2 α однаковою мірою збільшували потужність маткових скорочень. На рис. 3 видно, що порівняно з контрольними

значеннями для тварин II та III груп ($0,55 \pm 0,0$ і $0,24 \pm 0,05$ мН/с відповідно) ($T_{\max}/t$) найбільше зростає під дією ПГ ($1,17 \pm 0,01$ і $3,88 \pm 0,12$ мН/с відповідно), ніж простагландину F2 α ($0,47 \pm 0,01$ і $2,99 \pm 0,41$ мН/с відповідно). Слід зазначити, що $T_{\max}/t$ підвищується під дією простагландину F2 α тільки у тварин III групи. Відмінність значень $T_{\max}/t$ між ПГ та простагландином F2 α , можливо, пов'язана зі здатністю останнього підвищувати базальний тонус і впливати на тривалість систоли скорочення.

Наведені результати дають можливість припустити, що ПГ змінює показники скорочення міометрія внаслідок модифікації процесів, що беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного вмісту іонів кальцію в ГМК. Це підтверджується тим, що порівняльний аналіз фазової структури скорочення міометрія під дією ПГ і простагландину F2 α , який показав, що у тварин II–III груп більшою мірою змінювалася швидкість скорочення ($dP/dt_{\max}$), порівняно зі швидкістю розслаблення ($dP/dt_{\min}$). З рис. 4 видно, що приріст швидкості скорочення в усіх випадках має значення більше, ніж 1,0. Для I групи тварин цей показник трохи більше одиниці, тоді як для II і III він значно збільшується. Приріст

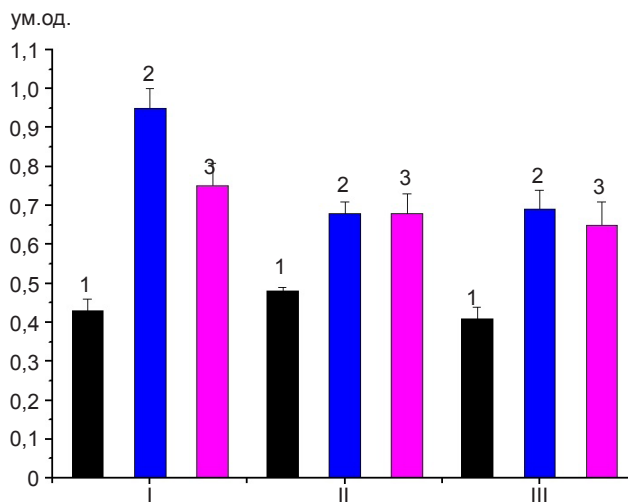


Рис. 2. Зміни коефіцієнта асиметрії під впливом пептидоглікану і простагландину F2 α . I – контроль; II – скорочення під впливом пептидоглікану; III – скорочення під впливом простагландину F2 α ; 1 – щури, яким вводили препарат естрогену; 2 і 3 – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності відповідно

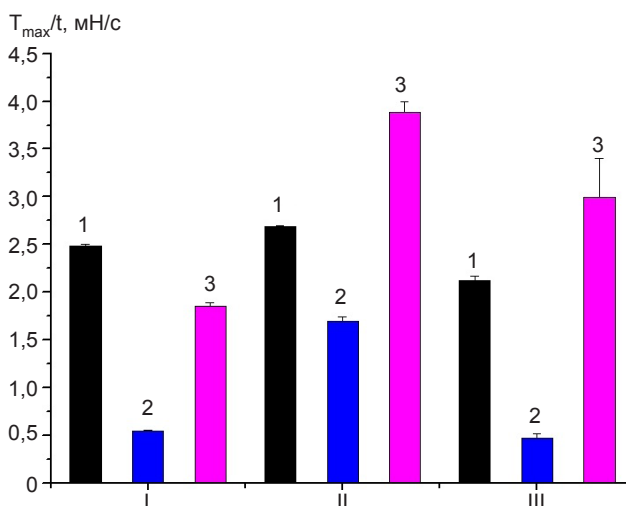


Рис. 3. Зміни середньої швидкості наростання скорочення на тлі дії пептидоглікану (II) і простагландину F2 α (III). I – контроль; 1 – щури, після прийому препарату естрогену; 2 і 3 – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності

швидкості розслаблення під дією ПГ і F2 α для тварин I групи знаходиться в межах 1,0 ($1,09 \pm 0,01$ і $1,16 \pm 0,01$ відповідно), для II групи він менше 1,0 ($0,49 \pm 0,15$ і $0,58 \pm 0,02$ відповідно), і найбільший – для тварин III групи ($1,69 \pm 0,11$ і $1,41 \pm 0,06$ відповідно). Таким чином, можна зробити припущення, що дія ПГ, і простагландину F2 α більшою мірою пов'язана з активацією мобілізації кальцію з саркоплазматичного ретикулума,

ніж його надходженням до міоплазми через мембрану ГМК під час маткового скорочення. Тільки для тварин II групи активація скорочення обумовлена збільшенням мобілізації кальцію з саркоплазматичного ретикулума, при одночасному зменшенні надходження позаклітинного кальцію до ГМК.

Таким чином, наведені дані вказують на те, що ПГ здатен активувати механізми регуляції внутрішньоклітинного вмісту кальцію в ГМК

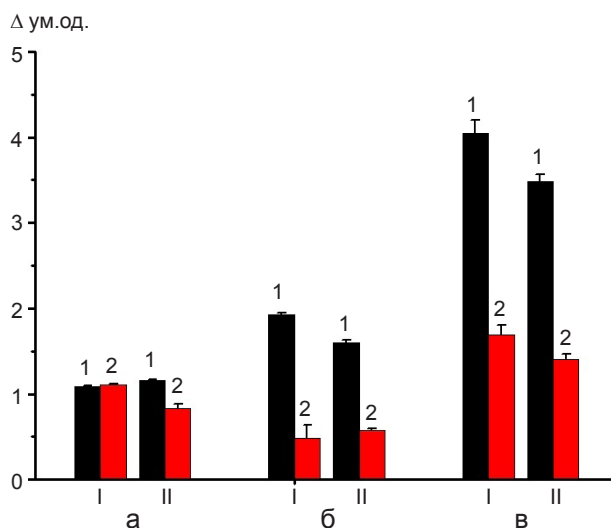


Рис. 4. Зміни приросту швидкості досягнення максимуму скорочення та розслаблення міометрія щурів під дією пептидоглікану (I) та простагландину F2 α (II). а – щури, після прийому препарату естрогену; б і в – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності. 1 – приріст швидкості скорочення; 2- приріст швидкості розслаблення

міометрія шурів, а також на відміну від простагландину F2 α проявляє більш потужну утеротонічну дію на міометрій псевдовагітних шурів і може бути індуктором передчасних пологів.

Відомо, що стратегія розпізнавання мікроорганізмів ефекторами вродженого імунітету еукаріотів заснована на визначенні доменних структур, які називаються патогенасоційованими молекулярними образами (від англ. pathogen associated molecular pattern, PAMPs), а розпізнаються вони образ (патерн) розпізнавальними рецепторами (від англ. pattern recognition receptors, PRRs). ПГ розпізнається вродженою імунною системою за допомогою PAMPs родини сигнальних Toll-подібних рецепторів 2 (від англ. toll like receptors, TLR2), які локалізовані на плазматичній мембрані імунокомпетентних клітин [27]. Ці рецептори після зв'язування з лігандом зазнають конформаційних змін і формують молекулярний каскад передачі сигналу до ядра клітини, що призводить до транскрипції генів прозапальних цитокінів, молекул адгезії та коstimулювальних молекул, які ініціюють розвиток адаптивної імунної відповіді. Реакція вродженого імунітету на продукти деградації ПГ відбувається внаслідок їхньої взаємодії з нуклеотидзв'язувальним олігомеризуючим доменом (від англ. nucleotide binding oligomerization domain, NOD), що локалізований внутрішньоклітинно. Всередині клітини стрижнева складова частина (продукт деградації) ПГ зв'язується двома внутрішньоклітинними сенсорними протеїнами: Nod1 і Nod2. Останній взаємодіє з мураміддипептидом – фрагментом молекули, що є спільним для грампозитивних і грамнегативних бактерій [28]. Nod1 розпізнає фрагмент ПГ DAP-типу та мінімальний фрагмент iE – DAP (D- γ – Glu-mDAP), що виявлений у грамнегативних і деяких штаммах грампозитивних бактерій [28]. NOD розпізнає PAMPs незалежно від участі TLRs, активує ядерний фактор κ B та підсилює продукцію цитокінів і хемокинів. Експресія TLR2 виявлена в епітелії маткових (фалопієвих) труб, ендометрія,

шийки матки й піхви, а також ГМК шийки матки й піхви, клітинах строми ендометрія та маткових натуральних кілерах [27]. У кожному відділі жіночих статевих органів TLR експресовані нерівномірно. Їхня експресія залежить від фази менструального циклу та терміну вагітності [29]. Зміна секреції статевих гормонів з різних причин може впливати на стан імунореактивності жіночих статевих шляхів.

Нині достовірно відомо, що компоненти клітинної стінки золотистого стафілокока можуть впливати на механізми перерозподілу іонів кальцію в клітинах внаслідок впливу на його потенціал- і рецепторкерованийні шляхи надходження, функціонування внутрішньоклітинного кальцієвого депо, а також модифікувати білки скоротливого апарату ГМК шлунково-кишкового тракту [5, 30–32]. Також є відомості, що ПГ може впливати на механічні властивості міжклітинного сполучнотканинного матриксу стінки судин, що супроводжується зменшенням жорсткості (модуля еластичності) кондуктивних судин [33].

Механізм скоротливої активності міометрія визначається нейрогуморальною регуляцією скорочень ГМ за участю гормонів, медіаторів і біологічноактивних речовин, дія яких послаблюється або підсилюється залежно від терміну вагітності. ПГ, зв'язуючись з рецепторами вродженого імунітету, змінюватиме активність регуляторних протеїнкіназ, що врешті-решт посилить транскрипцію прозапальних генів [34], і, ймовірно, зміна в їх активності впливатиме на згаданий процес раніше, ніж прозапальні цитокіни і хемокини. Тим більше, що запальний процес за його участі розвивається доволі повільно [19].

Наші експерименти показали, що характер впливу ПГ на скоротливу активність міометрія шурів залежить від гормонального фону. Так, у шурів, яким вводили лише препарат естрогену, ПГ гальмував цю активність міометрія внаслідок зменшення тривалості скорочення і збільшення тривалості маткового циклу. На противагу цьому він підсилював

скоротливість міометрія псевдовагітних щурів внаслідок зростання частоти й амплітуди скорочень, зменшення тривалості маткового циклу. Ці зміни в скоротливості ГМК матки будуть підсилюватися зі збільшенням терміну псевдовагітності.

Однією з характерних особливостей імунomodulatorів бактеріального походження є здатність ініціювати клітинну відповідь незалежно від TLRs- і NOD-механізмів. Так, наприклад, мураміддипептид може викликати виражену нейрофармакологічну дію, яка опосередкована прямою активацією серотонінових рецепторів нервової та м'язової тканин. Цей ефект ПГ розглядають як побічну дію [35–38]. Не можна виключати і можливості активації продуктом його деградації мураміддипептидом певних підтипів метаботропних серотонінових рецепторів міометрія, що змінить характер скоротливої активності матки тварин, яким вводили препарат естрогену, або псевдовагітних тварин. Відомо, що серотонін здатен підсилювати скоротливість міометрія вагітних тварин на тлі активації аденілатциклазної регуляторної системи [39].

Проведена робота розширила уявлення про спектр фізіологічної активності ПГ. Вивчено його вплив на скоротливу активність ГМ матки щурів після введення їм естрогену, і щурів з модельною псевдовагітністю. Показано, що ПГ може впливати на скоротливу активність міометрія щурів. Його моделювальна дія на матковий цикл і спонтанну активність міометрія залежить від комбінації факторів (гормональний фон, термін псевдовагітності), які й визначають особливості скоротливої відповіді та сприяють формуванню того чи іншого варіанту поведінки матки. Зміни міометрія під дією ПГ можуть впливати не тільки на фертильність, а й перебіг вагітності.

За підтримки Національної академії наук України і Державного фонду фундаментальних досліджень грант F46.2/001 (Державна ключова лабораторія).

Л.С. Насиб'ян, И.Б. Филиппов

МОДУЛЯЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИОМЕТРИЯ КРЫС ПЕПТИДОГЛИКАНОМ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

Изучено влияние компонента клеточной стенки золотистого стафилококка пептидогликана (0,003 мг/мл) на динамику сократительной активности миометрия эстрогенизированных и псевдобеременных самок крыс. Показано, что чувствительность миометрия крыс к пептидогликану зависит от гормонального фона. Этот компонент модифицирует спонтанную сократительную активность матки как животных после введения препарата эстрогена, так и псевдобеременных крыс. У небеременных самок пептидогликан уменьшает длительность и частоту сокращений миометрия (удлиняет маточный цикл), тогда как у псевдобеременных животных наблюдается не только увеличение амплитуды, но и длительности и частоты сокращений (уменьшает маточный цикл). Показало, что пептидогликан относительно простагландина F2 α (10 мкмоль/л) является более сильным утеротоником. Сделан вывод, что изменения в сократительной активности миометрия под действием пептидогликана может влиять не только на фертильность, но и на протекание беременности. Ключевые слова: миометрий, сократительная активность, золотистый стафилококк, пептидогликан, псевдобеременность.

L.S. Nasibyan, I.B. Philippov

MODULATION OF RAT MYOMETRIUM CONTRACTILE ACTIVITY BY PEPTIDOGLYCAN OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS CELL WALL

Peptidoglycan of Staphylococcus aureus cell wall impact on the both estrogen- treated and pseudopregnant rat myometrium contractile activity dynamics was studied. The results of experiments shown that rat myometrium sensitivity to peptidoglycan depends on the hormonal background. Peptidoglycan modified the myometrium contractile activity of both estrogen-treated and pseudopregnant rats. In estrogen-treated rat myometrium peptidoglycan reduces frequency and duration of contractions (elongated the uterine cycle) while in the pseudopregnant rat myometrium it increased the amplitude as well as the duration and the frequency (shortened the uterine cycle). During the experiments we found that peptidoglycan has stronger uterotonic effect than prostaglandin F2 α . In this connection we conclude that the changes of myometrial contractile activity after peptidoglycan action may have negative effects for fertility and course of pregnancy.

Key words: Myometrium, contractile activity, Staphylococcus aureus, peptidoglycan, pseudopregnancy.

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

REFERENCES

1. Ancyrskaja AS, Muraveva VV. Laboratory diagnosis of opportunistic infections of the vagina. Consiliummedicum. 2006; 7(3):206-10. [Russian].
2. Petersen EE, Magnani P. Efficacy and safety of vitamin C tables in the treatment of non-specific vaginitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Nov 10;117(1):70-5.
3. Melenevs'ka NV, Miroshnychenko MS, Filippov IB, Kholodna LS, Shuba MF. Effects of Staphylococcus aureus cell-bound protein A on adenosine triphosphate and nitric oxide inhibitory actions in smooth muscles. Fiziol Zh. 2006;52(1):22-9. [Ukrainian].
4. Rudakova EB, Mozhovej SI, Pilipenko MA. Chronic endometritis: from improving the diagnostic approach to optimize treatment. Lechaschii vrach. 2008;(10):6-10. [Russian].
5. Romero R., Mazor M. Infection and preterm labor. Clin Obstet Gynecol. 1988;31:553-84.
6. Ross RG, Sathishkumar K, Naik AK, Bawankule DU, Sarkar SN, Mishra SK, Prakash VR. Mechanisms of lipopolysaccharide-induced changes in effects of contractile agonists on pregnant rat myometrium. Am J of Obstet Gynecol. 2004 Feb;190(2):532-40.
7. Allison CC, Kufer TA, Kremmer E, Kaparakis M, Ferrero RL. Helicobacter pylori induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):8099-109.
8. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. Clin. Microbiol. Rev. 2005 Jul;18(3):521-40.
9. Filippov IB, Davidovskaya TL, Shuba MF, Holodna LS, Pozur VI. Effect of active substances of Staphylococcus aureus (protein A and peptidoglycan) on smooth muscle contraction caused by the action of neurotransmitters. Neurophysiology. 1996, 28(1):30-6. [Ukrainian].
10. Kusunoki T, Hailman E, Juan TS, Lichenstein HS, Wright SD. Molecules from Staphylococcus aureus that bind CD14 and stimulate innate immune responses. J Exp Med. 1995 Dec 1;182(6):1673-82.
11. Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic Implications. Bacteriol Rev. 1972 Dec;36(4):407-77.
12. MacKenzie LW, Cole WC, Garfield RE. Structural and functional studies of myometrial gap junctions. Acta Physiol Hung. 1985;65(4):461-72.
13. Coren RL, Csapo AI. The intra-amniotic pressure. Am J Obstet Gynecol. 1963 Feb 15;85:470-83.
14. Csapo A, Sauvage J. The evolution of uterine activity during human pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 1968;47(2):181-212.
15. Caldeyro-Barcia R, Sica-Blanco Y, Poseiro JJ, Gonzáles Panizza V, Mendez-Bauer C, Fielitz C, Alvarez H, Pose SV, Hendricks CH. A quantitative study of the action of synthetic oxytocin on the pregnant human uterus. J Pharmacol Exp Ther. 1957 Sep;121(1):18-31.
16. El-Sahwi S, Gaafar AA, Topozada HK. A new unit for evaluation of uterine activity. Am J Obstet Gynecol. 1967 Aug 1;98(7):900-3.
17. Laptev BI, Bogomaz SA, Kulagin EM, Afanasiev SA and WA Prokop'ev. A method of determining substances cardiotropic activity. USSR patent SU 1635133A1. 1991 April 15. [Russian].
18. Leung S, Cheng Z, Sheldrick E L, Derecka K, Flint APF, Wathes D C. The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1 α , -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. Journal of Endocrinology. 2001 Mar;168(3):497-508.
19. Olson D M, Zaragoza DB, Shallow MC, Cook JL, Mitchell BF, Grigsby P, Hirst J. Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor - a review. Placenta. 2003 Apr;24 Suppl A:S47-54.
20. Caras Yu M. Diagnosis of uterine contractions activity of the uterus during labor. Medicine, 1982. 224 p. [Russian].
21. Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. Human Reprod. 2005 May;20(5):1372-8.
22. Sorbara MT, Philpott DJ. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. Immunological Rev. 2011 Sep;243(1):40-60.
23. Lin Z, Xu J, Jin X, Zhang X, Ge F. Modulation of expression of Toll-like receptors in the human endometrium. Am J Reprod Immunol. 2009 May;61(5):338-45.
24. Davydov's'ka TL, Tsybaliuk OV, Danylova VM, Miroshnychenko MS, Kholodna LS, Posur VK. Effect of staphylococcus active substances on ATPase activity of smooth muscle actomyosin and myosin. Ukr Biokhim Zh. 2001 Jul-Aug;73(4):24-8. [Ukrainian].
25. Melenevs'ka NV, Miroshnychenko MS, Filippov IB, Artemenko OIu, Shuba MF. Effects of cell-binding protein A of Staphylococcus aureus on the level of intracellular calcium ions and actomyosin ATP-ase activity in the smooth muscles. Ukr Biokhim Zh. 2006 Jan-Feb;78(1):107-16. [Ukrainian].
26. Filippov IB, Davydovska TL, Savinaynen LP, Shuba MF, Pozur VC. Peptidoglycan modifies the mechanical properties of the vessel walls of elastic type. Biopolymers and cells. 2000, 16 (1) :35-9.
27. Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors. II. Distribution and Pathways Involved in TLR Signalling. Folia Biol (Praha). 2005;51(6):188-97.
28. Sevcik J, Růicka V, Slánský J, Masek K. Muramyl dipeptide (MDP) and 5-HT receptors. Neuroimmunomodulatory effects of MDP are probably not mediated through 5-HT4 or 5-HT1A receptors. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2002 Feb;24(1):43-53.
29. Cordeaux Y, Missfelder-Lobos H, Charnock-Jones DS and Smith GCS. Stimulation of Contractions in Human Myometrium by is Unmasked by Smooth Muscle Relaxants. Reprod Sci. 2008 Sep;15(7):727-34.

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

Матеріал надійшов
до редакції 25.12.2013

А.Б. Котлярова^{1,2}, В.М. Мерлавський¹, О.М. Дорош¹, В.В. Манько¹

Роль мітохондріального уніпортера у підтриманні кальцієвого гомеостазу секреторних клітин слюзової залози

¹Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка; ²Ін-т фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;
E-mail: annkotliarova@gmail.com.ua

Для встановлення ролі кальцієвого уніпортера мітохондрій у підтриманні кальцієвого гомеостазу в секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура досліджували його взаємозв'язки з іншими кальційтранспортними системами. Експерименти проведено на інтактних і пермеабілізованих дигітоніном клітинах. Ступінь взаємозалежності функціонування кальцієвого уніпортера та інших кальційтранспортних систем визначали на основі адитивності ефектів їхніх інгібіторів/агоністів, дія яких супроводжується зменшенням вмісту Ca^{2+} у тканині залоз. З'ясувалося, що за одночасного пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула і кальцієвого уніпортера мітохондрій Ca^{2+} пасивно вивільняється з різних депо, оскільки ефекти інгібіторів цих кальційтранспортних систем (тапсигаргіну і рутенію червоного) є адитивними. Подібно адитивними є процеси активації інозитол-1,4,5-трифосфатчутливих кальцієвих каналів і пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій. На відміну від цього, ефекти ріанодину і рутенію червоного на вміст Ca^{2+} у клітинах є статистично достовірно неадитивними. Крім того, ріанодин у концентраціях 1–3 мкмоль/л дозозалежно зменшував швидкість дихання досліджуваних клітин, і ефект зберігався за преінкубації клітин з рутенієм червоним чи тапсигаргіном. Отже, крім активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулула ріанодин пригнічує надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, яке нечутливе до рутенію червоного.

Ключові слова: кальцієвий уніпортер мітохондрій, рутеній червоний, кальцієва помпа ендоплазматичного ретикулула, інозитол-1,4,5-трифосфатчутливі кальцієві канали, ріанодинчутливі кальцієві канали, слюзові залози, секреторні клітини.

ВСТУП

Мітохондрії здійснюють комплексний вплив на регулювання кальцієвих сигналів у секреторних клітинах [1, 2]. Поглинання Ca^{2+} мітохондріями реалізується за рахунок функціонування у їхній внутрішній мембрані, зокрема, кальцієвого уніпортера, котрий є каналом [3] і для пригнічення якого часто застосовують рутеній червоний [4]. Нині є лише одна публікація, яка присвячена безпосередньому дослідженню функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій у клітинах слюзових залоз [5]. Автор статті з використанням флуоресцентних зондів вста-

новив, що рутеній червоний у концентрації 30 нмоль/л повністю пригнічував надходження Ca^{2+} у мітохондрії клітин слюзових залоз мишей. Крім того, пролонгована (протягом 2 год) стимуляція цих клітин агоністом М-холінорецепторів метахоліном супроводжується акумуляцією Ca^{2+} у мітохондріях. Ці дані є підтвердженням функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій в секреторних клітинах слюзових залоз, але його взаємодія з іншими кальційтранспортними системами клітини залишається нез'ясованою.

Метою нашої роботи було дослідити роль кальцієвого уніпортера мітохондрій у підтриманні кальцієвого гомеостазу в сек-

реторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура, а також його можливі взаємозв'язки з функціонуванням інших кальційтранспортних систем.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 52 нелінійних щурах масою 190–250 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Ізолювання секреторних клітин слюзової залози щура. Після наркотизації хлороформом і декапітації тварини швидко виділяли зовнішньоорбітальну слюзову залозу (glandula orbitalis externa) та очищали її від сполучної тканини. Для ізолювання секреторних клітин використали модифікований метод Herzog і співавт. [6], як описано нами раніше [7]. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально під світловим мікроскопом з використанням барвника трипанового синього.

Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин. Плазматичну мембрану секреторних клітин слюзових залоз пермеабілізували дигітоніном («Fisher scientific», Великобританія); 50 мкг/мл у розрахунку на 0,5 млн клітин [7].

Визначення вмісту Ca^{2+} у клітинах слюзових залоз. Функціональну активність кальційтранспортних систем оцінювали за зміною вмісту Ca^{2+} у тканині залоз після інкубації (15 хв, 37°C) із відповідними інгібіторами чи агоністами. Склад середовища інкубації інтактних клітин (ммоль/л) був таким: NaCl – 119, KCl – 6, MgCl_2 – 1,2, HEPES – 10, глюкоза – 10, NaHCO_3 – 25; (pH 7,4), а пермеабілізованих клітин: KCl – 140, MgCl_2 – 1,5, CaCl_2 – 0,0274, EGTA – 0,1 ($[\text{Ca}^{2+}] \approx 10^{-7}$ моль/л), HEPES – 10; (pH 7,2). CaCl_2 використано фірми «Merck Chemicals» (Німеччина), інші речови-

ни-компоненти середовища інкубації фірми «Sigma-Aldrich» (США). Концентрацію Ca^{2+} визначали спектрофотометричним методом з використанням металохромного барвника арсеназо III за допомогою стандартного набору реактивів («Simko Ltd», Львів), як було описано раніше [8]. Для пригнічення кальцієвого уніпортера використовували рутеній червоний (10 мкмоль/л), кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула – тапсигаргін («Sigma-Aldrich», США; 1 мкмоль/л), інозитол-1,4,5-трифосфат, ($\text{I}\Phi_3$)-чутливих кальцієвих каналів – 2-аміноетоксидифенілборат (2-АФБ; «Sigma-Aldrich», США; 10 мкмоль/л). Для активації $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів застосовували $\text{I}\Phi_3$ («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 2 мкмоль/л і карбахолін у концентрації 10 мкмоль/л, а ріанодинчутливих кальцієвих каналів – ріанодин («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 0,1 мкмоль/л.

Для з'ясування ступеня взаємозалежності функціонування кальцієвого уніпортера та інших кальційтранспортних систем визначали адитивність ефектів їхніх інгібіторів/агоністів, дія яких супроводжується зменшенням вмісту Ca^{2+} у тканині залоз. Для цього в одній серії порівнювали зміни вмісту Ca^{2+} під впливом рутенію червоного ($[K - A]$), інгібітора/активатора іншої кальційтранспортної системи ($[K - B]$) та за дії обох речовин ($[K - \{A + B\}]$). Адитивними вважали ефекти таких речовин, за дії яких сума ефектів статистично достовірно з $P_a \geq 0,05$ не відрізняється від їхнього ефекту за одночасної дії:

$$[K - A] + [K - B] \approx [K - \{A + B\}].$$

Відповідно, неадитивними є ефекти тих речовин, для яких статистично достовірно $P_a \leq 0,05$:

$$[K - A] + [K - B] > [K - \{A + B\}].$$

Дослідження інтенсивності поглинання клітинами кисню. Інтенсивність споживання кисню інтактними клітинами визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі полярографа YSI 5300, електрода Кларка, цифрового вольтме-

тра, комп'ютера та закритої термостатованої комірки об'ємом 1,6 мл при 37 °С. Інтенсивність поглинання кисню обчислювали виходячи із того, що в 1 мл суспензії розчинено 200 нмоль O_2 .

Склад середовища, яке використовували для полярографії, був таким (ммоль/л): NaCl – 119, KCl – 6, $MgCl_2$ – 1,2, HEPES – 10, $CaCl_2$ – 2, глюкоза – 10, $NaHCO_3$ – 25, глютамін – 2, піруват – 2; pH 7,4. Для роз'єднання дихання та окисного фосфорилування застосовувався FCCP (1 мкмоль/л; «Sigma-Aldrich», США).

Статистичний аналіз результатів досліджень. Математично-статистичне опрацювання результатів здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за критерієм t Стюдента, за статистично достовірні приймали зміни з $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виявлення можливих взаємозв'язків функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій і кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула секреторних клітин слюзових залоз спочатку ми перевірили, як впливає рутеній червоний на вміст Ca^{2+} в інтактних і пермеабілізованих клітинах у контролі та

за наявності у середовищі специфічного інгібітора усіх відомих ізоформ кальцієвих помп ендоплазматичного ретикулула – тапсигаргіну.

З'ясувалося, що рутеній червоний зменшував вміст Ca^{2+} в інтактних клітинах на $14,22 \pm 5,42$ %, а у пермеабілізованих – на $24,59 \pm 9,09$ % (рис. 1, а, б). Статистично достовірної різниці між ефектами рутенію червоного на вміст Ca^{2+} у інтактних і пермеабілізованих клітинах не зареєстровано; спостерігалася лише певна тенденція до більш вираженого ефекту рутенію червоного у пермеабілізованих клітинах, що може бути зумовлено кращою доступністю інгібітора до мітохондрій.

Додавання тапсигаргіну до інтактних і пермеабілізованих клітин спричиняло статистично достовірне зменшення вмісту Ca^{2+} у них на $17,72 \pm 5,82$ і $21,06 \pm 6,52$ % відповідно – за рахунок пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула, що узгоджується з отриманими раніше даними [9]. Як в інтактних, так і у пермеабілізованих клітинах сумарні ефекти рутенію червоного і тапсигаргіну становили $29,62 \pm 5,37$ і $33,15 \pm 7,73$ % відповідно ($P < 0,01$) і були такими самими, як сума ефектів кожної з цих речовин окремо, тобто адитивними ($P_a = 0,74$ і $0,19$). Це свідчить про те, що Ca^{2+} за дії цих двох інгібіторів пасивно вивільняється з різних депо.

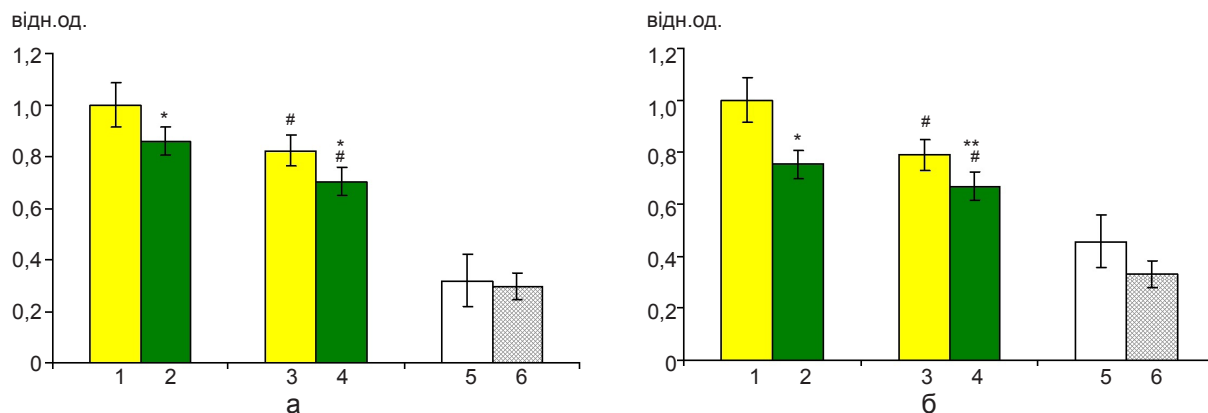
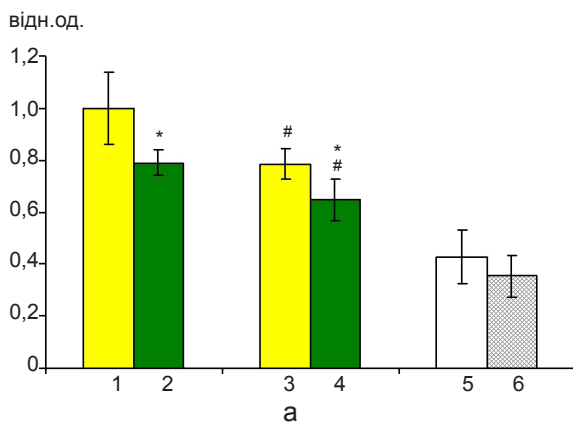


Рис. 1. Вплив рутенію червоного на вміст Ca^{2+} у інтактних (а) і пермеабілізованих (б) клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура залежно від наявності тапсигаргіну у середовищі інкубації: 1 – контроль, 2 – рутеній червоний, 3 – тапсигаргін, 4 – одночасна дія обох інгібіторів, 5 – алгебраїчна сума змін вмісту Ca^{2+} за окремої дії рутенію червоного і тапсигаргіну, 6 – зміна вмісту Ca^{2+} за одночасної дії тапсигаргіну і рутенію червоного; вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила інгібіторів/агоністів; * різниця достовірна стосовно контролю з $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; # різниця достовірна стосовно відповідної проби без інгібітора/агоніста з $P < 0,05$; $n = 6-7$

Цікавим є і те, що 2-АФБ – речовина, яку використовують як інгібітор $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів [10], також спричиняла достовірне зменшення вмісту Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз на $24,44 \pm 7,05$ % ($P < 0,01$, $n = 7$). Це узгоджується з нашими попередніми даними [11] і зумовлене інгібуванням кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулула, оскільки за пригнічення $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів вміст Ca^{2+} у тканині залоз повинен збільшуватися. У разі пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій рутенієм червоним 2-АФБ-індуковане зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах було практично таким самим і становило $19,23 \pm 2,42$ % ($P < 0,01$). Ефекти 2-АФБ і рутенію червоного на вміст Ca^{2+} у досліджуваних клітинах є адитивними ($P_a = 0,27$).

Для виявлення можливих взаємозалежностей функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій і систем вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулула ми вирішили перевірити, як впливає рутеній червоний на вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах досліджуваних залоз за умов активації $\text{I}\Phi_3$ - і ріанодинчутливих кальцієвих каналів. Активация $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів за допомогою $\text{I}\Phi_3$ спричиняла зменшення вмісту



Ca^{2+} у них на $21,03 \pm 5,05$ %, що узгоджується з даними, отриманими раніше [8]. На тлі дії рутенію червоного це $\text{I}\Phi_3$ -індуковане зменшення становило $18,32 \pm 5,67$ % (рис. 2,а), але сума змін вмісту Ca^{2+} за дії цих речовин окремо не відрізнялася від зміни вмісту Ca^{2+} за одночасної їх дії. Отже, і у цьому разі ефекти досліджуваних речовин є адитивними ($P_a = 0,13$), що свідчить про дію $\text{I}\Phi_3$ та рутенію червоного на різні кальцієві депо. Цей висновок підтвердився і під час дослідження адитивності ефекту агоніста М-холінорецепторів – карбахоліну та рутенію червоного на цілісні клітини. Відомо, що в інтактних секреторних клітинах слюзових залоз ефект карбахоліну значною мірою реалізується активацією $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів [8]. У цій серії дослідів клітини інкубували у номінально безкальцієвому середовищі з метою запобігання депокерованого входу Ca^{2+} . За таких умов під впливом карбахоліну вміст Ca^{2+} у клітинах зменшувався на $20,78 \pm 2,96$ % (див. рис. 2,б). Пригнічення рутенієм червоним кальцієвого уніпортера мітохондрій не впливає на карбахолініндуковані зміни вмісту Ca^{2+} в інтактних і пермеабілізованих секреторних клітинах слюзових залоз. Тобто ефекти цих речовин також виявились адитивними ($P_a = 0,32$).

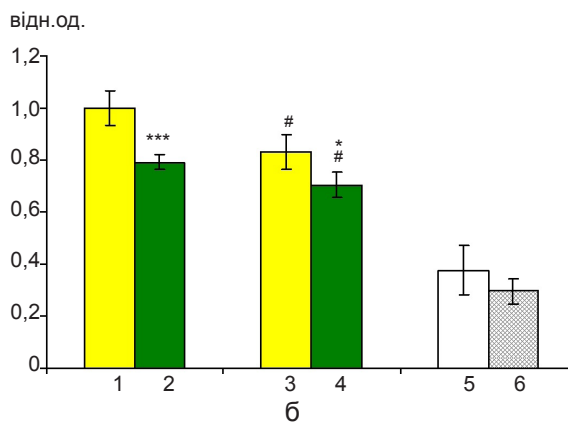


Рис. 2. Залежність впливу інозитол-1,4,5-трифосфату ($\text{I}\Phi_3$) (а) і карбахоліну (б) на вміст Ca^{2+} у пермеабілізованих клітинах зовнішньoorбітальної слюзової залози щура від наявності рутенію червоного у середовищі інкубації: 1 – контроль, 2 – $\text{I}\Phi_3$ чи карбахолін, 3 – рутеній червоний, 4 – дія обох речовин, 5 – алгебраїчна сума змін вмісту Ca^{2+} за окремої дії $\text{I}\Phi_3$ /карбахоліну і рутенію червоного, 6 – зміна вмісту Ca^{2+} за одночасної дії обох речовин. Вміст Ca^{2+} у тканині нормалізували, прийнявши за одиницю його значення у пробі, котра не містила інгібіторів/агоністів; * різниця достовірна стосовно контролю з $P < 0,05$, *** $P < 0,001$; # різниця достовірна стосовно відповідної проби без інгібітора/агоніста з $P < 0,05$; $n = 6-7$

Активация рiанодинчутливих кальцiєвих каналiв пермеабiлiзованих клiтин слiзових залоз рiанодином супроводжувалася зменшенням вiмсту Ca^{2+} у них на $34,00 \pm 7,24$ % (рис. 3,а). Одночасне додавання до середовища iнкубацiї рiанодину i рутенiю червоного супроводжувалося дещо бiльш вираженим зменшенням цього показника Ca^{2+} у клiтинах – на $50,11 \pm 6,37$ % ($P < 0,001$). Але ефекти цих дiючих речовин – рiанодину i рутенiю червоного – виявилися статистично достовiрно ($P_a = 0,04$) неадитивними.

Вiдсутнiсть ефекту рiанодину на тлi рутенiю червоного може бути зумовлена кiлькама чинниками. По-перше, рутенiй червоний пригнiчує рiанодинчутливі кальцiєві канали ендоплазматичного ретикулула, що ранiше було продемонстровано, зокрема, для незбудливих клiтин [12]. Але описанi ефекти цiєї сполуки на вiмст Ca^{2+} у тканинi слiзової залози, на нашу думку, не пов'язанi з цим, оскiльки зниження функцiональної активностi таких каналiв повинно супроводжуватися збiльшенням (а не зменшенням) цього показника.

Можна припустити також, що ефект рiанодину зумовлений не лише вивiльненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулула, але i з активацiєю рiанодинчутливих кальцiєвих

каналiв у мiтохондрiях, якi iдентифiкованi, наприклад, у внутрiшнiй мембранi мiтохондрiй кардiомiоцитiв i пригнiчуються рутенiєм червоним [13]. Цiлком можливо, що цi канали вiдiграють важливу роль у кальцiєвiй сигналiзацiї i в секреторних клiтинах слiзових залоз. Для пiдтвердження чи спростування такого припущення ми перевiрили адитивнiсть ефектiв $\text{I}\Phi_3$ та рiанодину. Одночасне додавання їх до середовища iнкубацiї супроводжувалося зменшенням вiмсту Ca^{2+} у клiтинах, яке було таким самим, як за дiї кожної з цих речовин окремо ($n = 5$; рис. 3,б). Їх ефекти були статистично достовiрно ($P_a = 0,03$) неадитивними. Отже, рiанодин та $\text{I}\Phi_3$ вивiльняють Ca^{2+} з одного i того самого депо. Даних про наявнiсть $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцiєвих каналiв у мiтохондрiях немає. Це дає змогу нам припустити, що рiанодинчутливі кальцiєві канали мiтохондрiй дослiджуваних клiтин або вiдсутнi, або чутливі до рiанодину в iншому дiапазонi концентрацiй. У 2007 р., використовуючи метод patch-clamp мiтохондрiальної мембрани, показано [14], що вже за концентрацiї 10 мкмоль/л рiанодину рiанодинчутливі кальцiєві канали переходять у стан субнормальної провiдностi (субпровiдностi). Для рiанодинчутливих кальцiєвих

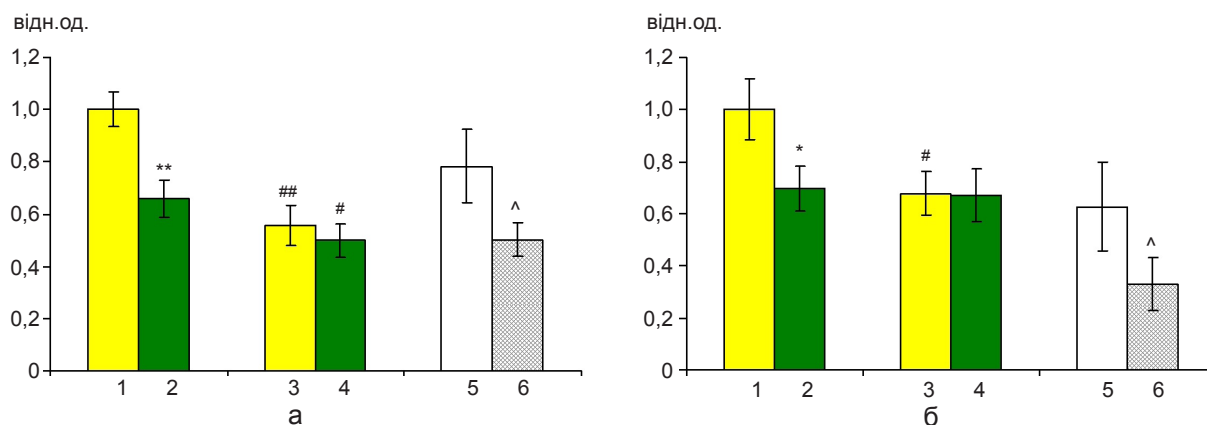


Рис. 3. Вплив рiанодину на вiмст Ca^{2+} у пермеабiлiзованих клiтинах слiзових залоз за наявностi рутенiю червоного (а) та iнозитол-1,4,5-трифосфату ($\text{I}\Phi_3$) (б): 1 – контроль, 2 – рiанодин, 3 – рутенiй червоний чи $\text{I}\Phi_3$, 4 – за одночасної дiї обох речовин, 5 – алгебраїчна сума змiн вiмсту Ca^{2+} за окремої дiї рiанодину та рутенiю червоного/ $\text{I}\Phi_3$, 6 – змiна вiмсту Ca^{2+} за одночасної дiї обох речовин. Вiмст Ca^{2+} у тканинi нормалiзували, прийнявши за одиницю його значення у пробi, котра не мiстила iнгiбiторiв/агонiстiв; * рiзниця достовiрна стосовно контролю з $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; # рiзниця достовiрна стосовно вiдповiдної проби без iнгiбiтора/агонiста з $P < 0,05$, ## $P < 0,001$; ^ достовiрна рiзниця мiж сумою змiн за окремої дiї двох речовин та змiною за їхньої одночасної дiї ($P_a < 0,05$); $n = 5-6$

каналів ендоплазматичного ретикулула цей стан настає за концентрації ріанодину понад 70 мкмоль/л [15].

Для того, щоб з'ясувати, чи впливає ріанодин на акумуляцію Ca^{2+} у мітохондріях досліджуваних клітин, ми вивчили його вплив на споживання ними кисню. Вважається, що Ca^{2+} у матриксі мітохондрій активує ферменти циклу Кребса – піруват-, α -кетоглутарат- та ізоцитратдегідрогеназу, що супроводжується збільшенням інтенсивності мітохондріального дихання [16].

На підставі отриманих даних ми зробили висновок, що ріанодин (1–3 мкмоль/л) пригнічує (!) надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, оскільки дозозалежно зменшує швидкість дихання (рис. 4).

Статистично достовірних змін у диханні за дії ріанодину у концентрації 100 нмоль/л не виявлено, а у концентрації 1, 2 і 3 мкмоль/л швидкість дихання досліджуваних клітин зменшувалася на $11,22 \pm 3,25$, $19,61 \pm 4,10$ і $30,06 \pm 5,60$ % відповідно. Це є наслідком, на нашу думку, пригнічення надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій. І цей ефект зберігався за преінкубації клітин з рутенієм червоним чи тапсигаргіном.

Роз'єднувач дихання і окисного фосфорилювання ціанід-р-трифлуорометоксифенілгідрозон (FCCR) у контролі збільшував інтен-

сивність дихання секреторних клітин слизових залоз на $96,79 \pm 8,09$ %, що свідчить про високу їхню життєздатність [17]. Збільшення інтенсивності дихання під впливом (FCCP) при додаванні до середовища ріанодину статистично достовірно не відрізняється від такого у контролі у жодному із наведених варіантів досліду.

Отже, ріанодин у зазначених концентраціях не лише активує ріанодинчутливі кальцієві канали ендоплазматичного ретикулула чи інших немітохондріальних депо, а й пригнічує нечутливий до рутенію червоного транспорт Ca^{2+} у матрикс мітохондрій. В обох випадках така дія ріанодину повинна спричиняти зменшення вмісту Ca^{2+} у клітинах.

Відомо, що у багатьох клітинах активація акумуляції Ca^{2+} у мітохондріях відбувається завдяки тісному контакту мембран ендоплазматичного ретикулула та мітохондрій [1, 18, 19]. Зокрема, продемонстровано наявність складної взаємодії $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів і кальцієвого уніпортера мітохондрій [2, 20]. У 2012 р. групою авторів [1] запропоновано модель такої взаємодії. Вона передбачає формування ендоплазматично-мітохондріального зв'язку, утворення і функціонування якого регулюється великою кількістю шаперонів, сигнальних і регулятор-

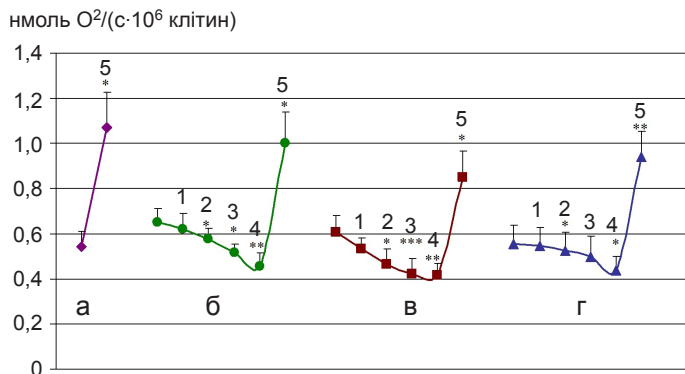


Рис. 4. Вплив ріанодину та FCCP на інтенсивність дихання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слизової залози за пригнічення кальційтранспортних систем: а – контроль, б – дія ріанодину, в – дія ріанодину на тлі рутенію червоного, г – на тлі тапсигаргіну; 1, 2, 3, 4 – додавання ріанодину до кінцевої концентрації 0,1, 1, 2 і 3 мкмоль/л, 5 – додавання FCCP (1 мкмоль/л), * різниця достовірна стосовно проби без додавання ріанодину чи FCCP з $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, $n = 5$

них білків. У міжмембранному просторі мітохондрії виникають кальцієві мікродомени (ділянки з підвищеною концентрацією Ca^{2+}) у відповідь на активацію потенціалкеро-ваних аніонних каналів зовнішньої мембрани мітохондрії. Після цього Ca^{2+} акумулюється у матриксі мітохондрій завдяки функціонуванню кальцієвого уніпортера у внутрішній мітохондріальній мембрані. Взаємодію потенціалкеро-ваних аніонних та $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів опосередковує шаперон GRP75, пришвидшуючи цим поглинання Ca^{2+} мітохондріями [1]. Тим не менше, у гладеньком'язових клітинах аорти [21], вен-трикулярних міоцитах [22], хромафінних клітинах [23] наявний виражений зв'язок між кальцієвим уніпортером мітохондрій і ріанодинчутливими кальцієвими каналами.

Вищенаведені дані є свідченням важливої ролі кальцієвого уніпортера мітохондрій у кальцієвій сигналізації різних клітин. Про функціонування кальцієвого уніпортера мітохондрій секреторних клітин слизових залоз і його взаємозв'язок з іншими кальційтранс-портними системами дійсно відомо мало.

Нами встановлено, що за одночасного пригнічення кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулума і кальцієвого уніпортера мітохондрій секреторних клітин слизових залоз Ca^{2+} пасивно вивільняється з різних депо, оскільки ефекти інгібіторів цих кальційтранспортних систем є адитивними. Адитивними є і процеси активації $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів і пригнічення кальцієвого уніпортера мітохондрій.

Тим не менше, депонований Ca^{2+} вивільняється з ендоплазматичного ретикулума під час стимуляції клітин слизових залоз агоністами (наприклад, карбахоліном) $\text{I}\Phi_3$ -чутливими кальцієвими каналами [8]. Цей процес супроводжується підвищенням цитозольної концентрації Ca^{2+} , як наслідок, активацією ріанодинчутливих кальцієвих каналів. Це в свою чергу спричиняє акумуляцію Ca^{2+} у мітохондріях [5] і наступну активацію мітохондріального дихання [24],

що має важливе загальнобіологічне значення, оскільки дає змогу реалізувати регуляцію мітохондріального дихання за рахунок прямого позитивного зв'язку – заздалегідь до того, як виникає нестача АТФ і запускається зворотні регуляторні впливи, гомеостатичні (а не сигнальні) за своєю суттю. Здійснюється така акумуляція Ca^{2+} у матриксі кальцієвим уніпортером і чутливими до рутенію червоного ріанодинчутливими кальцієвими каналами внутрішньої мембрани мітохондрій.

Отже, у секреторних клітинах слизових залоз функціонує кальцієвий уніпортер мітохондрій, який пригнічується рутенієм червоним. За одночасного його інгібування і кальцієвої помпи ендоплазматичного ретикулума Ca^{2+} вивільняється з різних депо. Подібну картину спостерігали і за активації $\text{I}\Phi_3$ -чутливих кальцієвих каналів. Ріанодин, крім активації ріанодинчутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулума, пригнічує надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, нечутливе до рутенію червоного.

**А.Б. Котлярова, В.М. Мерлавський,
О.М. Дорош, В.В. Манько**

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО УНИПОР- ТЕРА В ПОДДЕРЖАНИИ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Для исследования роли кальциевого унипортера митохондрий в поддержании кальциевого гомеостаза в секреторных клетках *внеглазничной* слезной железы крысы изучали его взаимосвязи с другими кальцийтранспортными системами. Эксперименты выполнены на интактных и пермеабилизированных дигитонином клетках. Степень взаимозависимости функционирования кальциевого-унипортера и других кальцийтранспортных систем определяли на основе аддитивности эффектов их ингибиторов/агонистов, действие которых сопровождается уменьшением содержания Ca^{2+} в ткани желез. Выяснилось, что при одновременном ингибировании кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума и кальциевого унипортера митохондрий Ca^{2+} пассивно высвобождается из различных депо, поскольку эффекты ингибиторов этих кальцийтранспортных систем (тапсигаргина и рутения красного) являются аддитивными. Также аддитивные процессы активации инозитол-1,4,5-трифосфатчувствительных кальциевых каналов и ингибирования кальциевого унипортера митохондрий. В

отличие от этого, эффекты рианодина и рутения красного на содержание Ca^{2+} в клетках являются статистически достоверно неаддитивными. Кроме того, рианодин в концентрации 1–3 мкмоль/л дозозависимо уменьшал скорость дыхания исследуемых клеток, и этот эффект сохранялся после преинкубации клеток с рутением красным или тапсигаргином. Это позволяет предположить, что кроме активации рианодинчувствительных кальциевых каналов эндоплазматического ретикула рианодин ингибирует поступление Ca^{2+} в матрикс митохондрий, которое нечувствительно к рутению красному.

Ключевые слова: кальциевый уніпортер мітохондрій, рутений червоний, кальциевый насос ендоплазматического ретикула, инозитол-1,4,5-трифосфат чувствительные кальциевые каналы, слезные железы, секреторные клетки.

A.B.Kotliarova^{1,2}, V.M. Merlavs'ky¹, O.M. Dorosh¹, V.V. Manko¹

THE ROLE OF MITOCHONDRIAL UNI-PORTER IN CALCIUM-HOMEOSTASIS OF THE EXORBITAL LACRIMAL GLAND SECRETORY CELLS

The role of mitochondrial calcium-uniporter in calcium-homeostasis maintenance and correlations of calcium-uniporter with other calcium-transport systems of the rat exorbital lacrimal gland secretory cells were studied. The experiments were performed on intact and digitonin-permeabilized cells. The interdependence of calcium-uniporter and other calcium-transporting systems functioning was estimated on the basis of additivity of their inhibitors/agonists effects, which was accompanied with a decrease in the Ca^{2+} content in the gland cells. It was found that in conditions of simultaneously inhibition of sarco endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and mitochondrial calcium-uniporter Ca^{2+} passively released from different calcium stores, because the effects of these calcium-transport systems inhibitors (thapsigargin and ruthenium red, respectively) were additive. Similarly, the processes of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs) activation and Calcium-uniporter inhibition were additive. In contrast, the effects of ryanodine and ruthenium red on the Ca^{2+} content in cells were significantly non-additive. In addition, ryanodine at concentrations 1–3 μM reduced respiration rate of studied cells in dose-dependent manner, and this effect was persisted at cells preincubation with ruthenium red or thapsigargin. Thus, besides the activation of ryanodine receptors (RyRs) in endoplasmic reticulum, ryanodine inhibits Ca^{2+} influx to the mitochondrial matrix, that was insensitive to ruthenium red.

Key words: Calcium-uniporter of mitochondria, ruthenium red, sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs), ryanodine receptors (RyRs), lacrimal glands, secretory cells.

¹Ivan Franko National University of L'viv;

²Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):566–78.
2. Zimmermann B. Control of InsP_3 -induced Ca^{2+} oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol.* 2000;525(3): 707–19.
3. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 2004;427(6972):360–4.
4. Griffiths EJ. Use of ruthenium red as an inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uptake in single rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2000; 486(3):257–60.
5. Bird G St J, Obie JF, and Putney JW Jr. Functional homogeneity of the non-mitochondrial Ca^{2+} pool in intact mouse lacrimal acinar cells. *Biol Chem Journ.* 1992;267(26):18382–86.
6. Herzog V, Sies H, Miller F. Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. Peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation. *J Cell Biol.* 1976;70:692–706.
7. Kotliarova A, Manko V. Permeabilized secretory cells of rats exorbital lacrimal glands as a model for Ca^{2+} -transport systems study. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Biological series.* 2013;64(2):11–5.
8. Kotliarova AB, Manko VV. IP_3 -sensitive Ca^{2+} -channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland. *Ukr Biochem Journ.* 2013;85(5):27–36. [Ukrainian].
9. Kotliarova AB, Manko VV. Ca^{2+} transporting systems in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland I Ca^{2+} pumps of plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Studia Biologica.* 2012;6(2):99–114. [Ukrainian].
10. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. *J Biochem.* 1997;122(3):498–505.
11. Kotliarova A., Manko V. Effect of 2-APB on SERCA of lacrimal gland secretory cells. *Exp Clin Physiol Biochem.* 2013;(3):38–43. [Ukrainian].
12. Ozawa T. Ryanodine-sensitive Ca^{2+} release mechanism in non-excitable cells. *Int J Mol Med.* 2001;7(1):21–5.
13. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci D, Yule D, Sheu S-S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21482–8.
14. Altschaff BA, Beutner G, Sharma VK, Sheu SS, Valdivia HH. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmacokinetic profile. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(7):1784–95.
15. Buck E, Zimanyi I, Abramson JJ, Pessah IN. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 1992; 267:23560–7.

16. Denton RM, McCormack JG. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS Lett. 1980;119(1):1–8.
17. Brand DM, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem J. 2011;435:297–312.
18. Kohlhaas M, Maack Ch. Calcium release microdomains and mitochondria. Cardiovasc Res. 2013;98(2):259–68.
19. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F, Fogarty K, Lifshitz L et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. Science. 1998;280(5370):1763–66.
20. Hajnóczky G, Hager R, Thomas AP. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by Ca^{2+} . J Biol Chem. 1999;274:14157–62.
21. Vallot O, Combettes L, Lompré A-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca^{2+} store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. Biochem J. 2001;357(Pt 2):363–71.
22. Sharma VK., Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu S-S. Transport of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. J Bioenerg Biomembr. 2000;32(1):97–104.
23. Montero M, Alonso M, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García A et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. Nat Cell Biol. 2000;2(2):57–61.
24. Kotliarova AB, Manko BO, Manko VV. The effect of carbacholine on respiration of the rat exorbital lacrimal cells. Actual problems of Humanities and Sciences. 2013;12(2):41–3. [Russian].

*Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка;
Ин-т фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: annkotliarova@gmail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 28.03.2014*

Н.М. Шпакова¹, О.Є. Ніпот¹, І.О. Іщенко¹, С.В. Прилуцька², К.І. Богуцька²,
В.В. Черепанов³, Б.П. Сандомирський¹, Ю.І. Прилуцький²

Вплив C_{60} -фулерену на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів людини

¹Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; E-mail: bsan38@yahoo.com;

²Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка; E-mail: prylut@ukr.net; ³Ін-т фізики НАН України, Київ

Досліджено вплив водного колоїдного розчину C_{60} -фулерену (ВКРФ) на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів людини. Встановлено, що його дія на еритроцити залежить від осмотичності середовища і концентрації у ньому C_{60} -фулерену. Зокрема, додавання C_{60} -фулерену в ізотонічний розчин (0,15 моль/л NaCl) у концентраціях від 0,7 до 28 мкмоль/л не викликало гемолітичного пошкодження клітин. У гіпотонічному середовищі при внесенні C_{60} -фулерену (концентрація 7 мкмоль/л) на початку гемолізу його стимулювальний ефект був максимальним, а при додаванні ВКРФ через 20 с після початку гемолізу стимуляції цього процесу не спостерігалось. Це свідчить про те, що зміни в'язко-еластичних властивостей мембрани еритроцитів відбуваються вже в перші секунди її взаємодії з C_{60} -фулереном.

Ключові слова: водний колоїдний розчин C_{60} -фулерену, еритроцити людини, в'язко-еластичні властивості мембрани, атомно-силова мікроскопія.

ВСТУП

Практичне використання C_{60} -фулерену у біомедичних дослідженнях потребує всебічного вивчення можливих проявів його токсичної дії як на рівні цілого організму, так і ізольованих клітин. Маючи унікальну структуру, фізико-хімічні властивості і біологічну активність *in vitro* та *in vivo* [1], ця алотропна форма нановуглецю характеризується токсичністю [2]. Відомо, що токсичний ефект C_{60} -фулерену та його похідних суттєво залежить від концентрації, модифікації поверхні, умов синтезу та обробки, а також відрізняється відносно різних клітинних ліній [2, 3]. Передбачається, що основними механізмами цитотоксичної дії є викликане перекисне окиснення ліпідів, розвиток оксидативного стресу і, як наслідок, генотоксичність та некроз [4]. Водночас наявні дані про здатність C_{60} -фулерену попереджати розвиток окисного стресу в тимоцитах [5]. Завдяки на-норозміру та гідрофобності C_{60} -

фулерен здатний взаємодіяти з біомолекулами [6], вбудовуватись/проникати у мембрани клітин [7, 8] та виявляти специфічні біологічні ефекти, наприклад протипухлинні [9], що може включати модифікацію адгезивного потенціалу клітин та пов'язану з ним здатність до ділення [10].

Модель суспензії еритроцитів абсолютно наближена до умов *in vivo*. Реологічні властивості крові багато в чому визначаються станом еритроцитарної мембрани, на який можуть впливати різні фізико-хімічні чинники середовища. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження впливу водного колоїдного розчину C_{60} -фулерену (ВКРФ) на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів людини.

МЕТОДИКА

Одержання ВКРФ та його характеристика. Для приготування ВКРФ використовували

насичений розчин чистого C_{60} -фулерену в толуолі (чистота понад 99,5 %), де його концентрація відповідала максимальній розчинності близько 2,9 мг/мл [11–12]. Дві одержані фази піддавали ультразвуковому впливу до повного випаровування толуолу та набуття водною фазою жовтого кольору. Фільтрацією водного розчину відділяли потрібний продукт від нерозчиненого C_{60} -фулерену. За допомогою цього методу отримували різні концентрації C_{60} -фулерену у воді – від 0,1 до 1,2 мг/мл. Одержаний таким чином ВКРФ є стабільним близько 12 міс за +4 °С.

Вимірювали спектр поглинання отриманого ВКРФ з вихідною концентрацією C_{60} -фулерену близько 127 мкмоль/л у діапазоні довжин хвиль від $\lambda=200$ до 700 нм за кімнатної температури. Виявилося, що домінують три інтенсивні широкі смуги поглинання з максимумами при 208, 265 та 347 нм в УФ-ділянці спектра, що узгоджується з нашими попередніми даними [12, 13].

Дані з динамічного розсіювання світла [14] свідчать, що при концентрації C_{60} -фулерену у ВКРФ 127 мкмоль/л основна фракція світлорозсіюючих сферично подіб-

них частинок розподіляється на ділянці з характерним діаметром до 140 нм. Тому для відокремлення великих частинок ВКРФ попередньо (перед експериментом) обробляли на центрифугі (5424R, «Eppendorf», ФРН) упродовж 10 хв при 15000 xv^{-1} . У результаті обробки колоїдна суспензія змінювала колір з насичено-жовтого до майже безбарвного.

Одержане зображення за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ; комерційна система Solver Pro M; NT-MDT, Росія) демонструє як окремі C_{60} -молекули (0,7 нм у діаметрі), так і їхні агрегати з характерним розміром 1,5–60 нм, які є у ВКРФ (рис. 1), що збігається з теоретичними розрахунками [14–15] і даними нейтронної спектроскопії [12].

Одержання еритроцитів людини. Еритроцити виділяли з крові чоловіків групи А (II)⁺, що була надана обласним центром переливання крові м. Харкова. Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням (центрифуга ОПН-ЗУ4.2, 3000 xv^{-1} , 3 хв) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4).

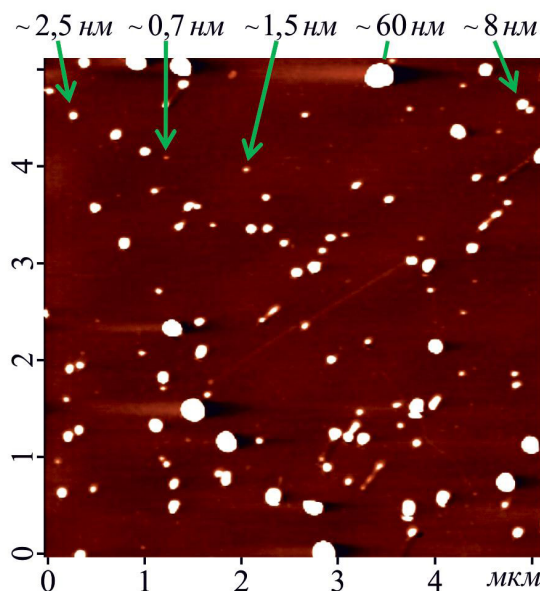


Рис. 1. Зображення, одержане методом атомно-силової мікроскопії, C_{60} -фулерену та його агрегатів у водному колоїдному розчині (концентрація 127 мкмоль/л) на склі (напівконтактний режим)

Лейкоцитарну плівку та супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше ніж 4 год при 0°C .

Досліджували вплив C_{60} -фулерену на еритроцити людини у фізіологічному середовищі (0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, pH 7,4), для чого аліквоту ВКРФ вносили у суспензію еритроцитів та вивчали зміну оптичної густини середовища.

Гіпотонічний і гіпертонічний лізис еритроцитів. Для одержання вихідної суспензії еритроцитів 50 мкл осаду клітин переносили у 0,5 мл фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, pH 7,4).

Гіпотонічний і гіпертонічний лізиси еритроцитів проводили внесенням аліквоти вихідної суспензії клітин (10 мкл) у 2 і 4 мл розчину NaCl (40–120 ммоль/л), відповідно, що містив C_{60} -фулерен (0,7–28 мкмоль/л), при 20°C .

Реєстрацію динаміки гіпотонічного гемолізу еритроцитів проводили на оригінальному обладнанні для вимірювання світлорозсіювання клітинних суспензій, створеному на базі монохроматора СФ-4А (Росія).

Рівень гемолізу еритроцитів як функцію часу визначали реєстрацією зміни у часі оптичної густини суспензії еритроцитів ($\lambda=720$ нм). Концентрація суспензії еритроцитів у кюветі становила $(1,7\text{--}3,5) \cdot 10^6$ клітин/мл. У цьому концентраційному діапазоні оптична густина клітинної суспензії була прямо пропорційна кількості інтактних клітин. Світлорозсіювання тіней, що утворюються у процесі лізису еритроцитів, та поглинання світла гемоглобіном за вказаної довжини хвилі незначно малі. Рівень гемолізу розраховували за формулою: $\text{гемоліз} = (1 - A/A_0) 100\%$, де A і A_0 – оптична густина досліджуваного зразка після завершення гемолізу та контрольного зразка відповідно.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили параметричним і непараметричним методами з використанням програми SPSS Statistica 17.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив C_{60} -фулерену на еритроцити в умовах ізотонії. Одержані результати вказують на те, що додавання C_{60} -фулерену (0,7–28 мкмоль/л) до еритроцитів, що знаходяться у фізіологічному середовищі, не супроводжується зміною оптичної густини суспензії. Це свідчить про відсутність морфологічних змін і гемолітичного пошкодження еритроцитів. Крім того, у цих умовах не був виявлений витік катіонів калію та натрію, що говорить про відсутність порушення бар'єрних властивостей мембрани еритроцитів.

Вплив C_{60} -фулерену на гіпотонічний лізис еритроцитів. C_{60} -фулерен у концентрації 0,7–28 мкмоль/л добавляли у гіпотонічне середовище, після чого вносили еритроцити та за зміною оптичної густини суспензії визначали рівень гемолітичного пошкодження клітин (рис. 2). Додавання ВКРФ у середовище інкубації призводить до значного збільшення пошкодження еритроцитів людини. За невеликих концентрацій C_{60} -фулерену (1–10 мкмоль/л) воно прямо пропорційне вмісту ВКРФ. Подальше збільшення концентрації C_{60} -фулерену (до 28 мкмоль/л) спричинює лише незначне зростання гіпотонічного гемолізу. Цей факт можна пояснити тим, що лише певна кількість C_{60} -фулерену (його агрегатів) може зв'язуватися з мембраною клітини, а при насиченні її наступні зміни вже не стільки виражені.

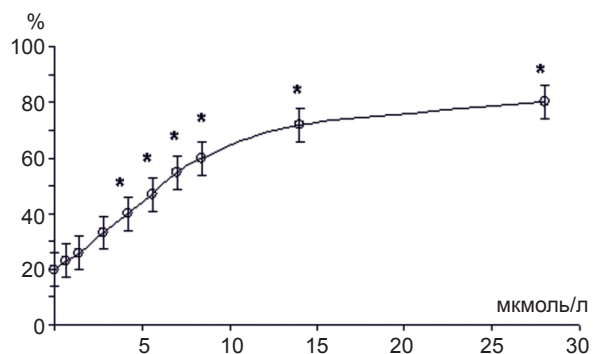


Рис. 2. Вплив різних концентрацій C_{60} -фулерену на рівень гемолізу еритроцитів людини в гіпотонічному середовищі. * $P < 0,05$ порівняно з контролем (за відсутності C_{60} -фулерену)

Виходячи з того, що застосування C_{60} -фулерену підвищує чутливість еритроцитів до гіпотонічного середовища, важливо було дослідити осмотичну крихкість клітин за його наявності. На рис. 3 представлено криві осмотичної крихкості еритроцитів людини у нормі та при використанні двох концентрацій C_{60} -фулерену – 7 і 28 мкмоль/л. Збільшення чутливості еритроцитів людини до гіпотонічного пошкодження відбувається практично у всьому концентраційному діапазоні досліджуваних середовищ при обох використаних концентраціях ВКРФ. Найбільшим виявився пошкоджувальний ефект C_{60} -фулерену на клітини у середовищах 80–100 ммоль/л NaCl. За цих осмотичних умов гемолітичне пошкодження нативних клітин ще фактично відсутнє, а їхній стан можна охарактеризувати як метастабільний. Імовірно, введення ВКРФ провокує за цих умов різку зміну стану клітин, що проявляється у розвитку гемолітичного процесу.

З одержаних залежностей осмотичної крихкості еритроцитів були визначені значення порогових концентрацій (I_{10}) та індексу осмотичної крихкості (I_{50}), які представлено у таблиці. Різниця між значеннями для контрольних клітин була 5 одиниць, тоді як за наявності C_{60} -фулерену вона збільшувалась у 3–4 рази. Отже, за умов дії C_{60} -фулерену популяція еритроцитів стає

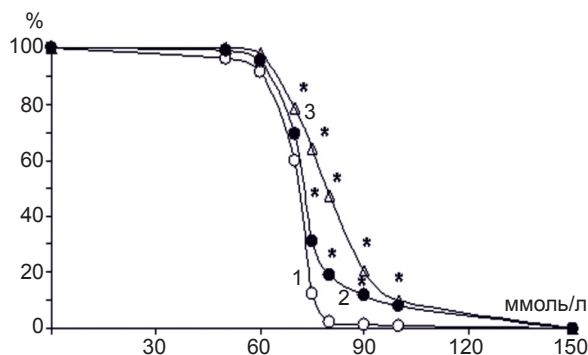


Рис. 3. Залежність рівня гемолізу еритроцитів людини у гіпотонічному середовищі від концентрації C_{60} -фулерену та NaCl у середовищі: 1 – контроль, 2 – 7 мкмоль/л C_{60} -фулерену, 3 – 28 мкмоль/л C_{60} -фулерену. * $P<0,05$ порівняно з контролем

більш гетерогенною за чутливістю до дії гіпотонічного середовища. Цей факт також видно і як збільшення кута нахилу кривих гіпотонічного лізису еритроцитів (див. рис. 3). Відомо, що вихідна гетерогенність популяції еритроцитів може бути зумовлена різними віковими характеристиками клітин [16]. Наявність агрегатів C_{60} -фулеренів у ВКРФ сприяє їх накопиченню у мембрані і, таким чином, додатково змінює її фізико-хімічні властивості, збільшуючи гетерогенність популяції клітин.

Важливо було з'ясувати, чи здатний C_{60} -фулерен змінювати рівень пошкодження еритроцитів у тому разі, коли ВКРФ вносили після додавання клітин у гіпотонічне середовище. На рис. 4 представлені результати впливу C_{60} -фулерену у концентрації 7 мкмоль/л при додаванні його у гемолітичне середовище через різні проміжки часу після початку гіпотонічного гемолізу. При внесенні ВКРФ у гемолітичне середовище на самому початку гемолітичного процесу його стимулювальний ефект максимальний. Це вказує на практично миттєве проникнення C_{60} -фулерену до клітини, що узгоджується з даними експерименту [8] та розрахунку [17]. Коли ВКРФ вносили у кювету після запуску гемолітичного процесу, його стимулювальний ефект поступово знижувався та зникав повністю через 20 с.

Вплив C_{60} -фулерену на гіпертонічний лізис еритроцитів. На рис. 5 представлено вплив C_{60} -фулерену на рівень гіпертонічного

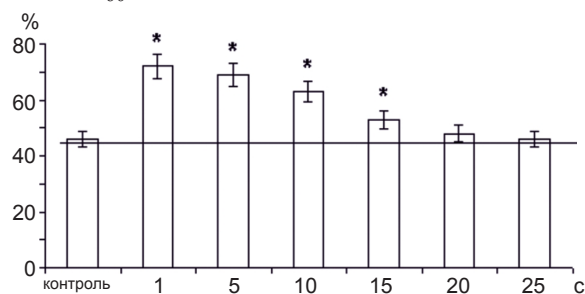


Рис. 4. Динаміка рівня гемолізу еритроцитів людини в гіпотонічному середовищі залежно від часу додавання C_{60} -фулерену (7 мкмоль/л) після початку гемолізу. * $P<0,05$ порівняно з контролем

Значення порогових концентрацій NaCl (I_{10}) та індексу осмотичної крихкості еритроцитів людини (I_{50}) за наявності C_{60} -фулерену

Порогова концентрація, ммоль/л	Контроль	Концентрація C_{60} -фулерену, мкмоль/л	
		7	28
I_{10}	75±6	90±8*	100±5*
I_{50}	70±5	75±7	80±6*

* $P < 0,05$ результати статистично значимі порівняно з відповідним контролем.

гемолізу еритроцитів людини. Останній являє собою пошкодження еритроцитів при перенесенні їх у NaCl (4 моль/л); він зумовлений надлишковою дегідратацією та стисканням клітин [18]. Як видно, при такому осмотичному впливі C_{60} -фулерен викликає захисний ефект клітини. Причому зі зростанням концентрації ВКРФ рівень гемолізу знижується рівномірно та становить близько 20 % при максимальній досліджуваній концентрації ВКРФ (28 мкмоль/л). Можливо зміна в'язко-еластичних властивостей мембрани за наявності C_{60} -фулерену, які спричинюють збільшення чутливості еритроцитів людини до гемолізу, наразі сприяє захисту клітин від різкої зміни осмотичних умов середовища.

Існуюча нині інформація щодо токсичного ефекту C_{60} -фулерену на еритроцити достатньо суперечлива. Так, у праці Solomadin і співавт. [19] показано, що C_{60} -фулерен у концентрації 7 мкмоль/л викликає гемоліз еритроцитів людини. Водночас інші автори [20] не виявили безпосередньої пошкоджувальної дії на клітини. Він легко проникає у модельні

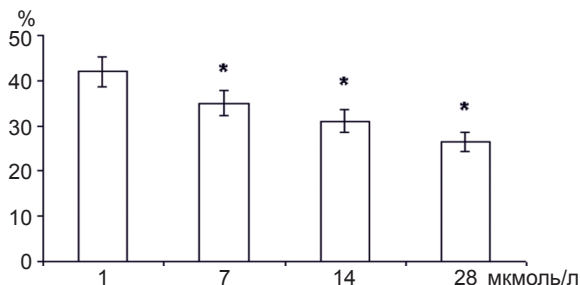


Рис. 5. Вплив C_{60} -фулерену на рівень гемолізу еритроцитів людини в гіпотонічному середовищі (4 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, pH 7,4). * $P < 0,05$ порівняно з контролем

ліпідні мембрани, причому час проникнення складає близько 1 нс, та локалізується у ділянці фосфоліпідних «хвостів» [7, 17]. Крім того, збільшується впорядкованість мембранних ліпідів, потовщується мембрана, знижується її еластичність. Ці дані добре узгоджуються з одержаними вище результатами, оскільки вказані зміни фізико-хімічних характеристик мембрани будуть призводити до зменшення її здатності до розтягу та, як наслідок, збільшення чутливості до гіпотонічної дії.

Таким чином, встановлено, що в ізотонічному середовищі додавання ВКРФ (концентрація C_{60} -фулерену становить 0,7–28 мкмоль/л) не викликає гемолітичного пошкодження еритроцитів людини. Взаємодія як C_{60} -фулерену, так і його агрегатів (до 60 нм у діаметрі) з мембранами еритроцитів людини призводить до зміни їх в'язко-еластичних властивостей і, як наслідок, зменшує здатність клітин до деформації. За умов *in vivo* подібний ефект може спричинити зміни реологічних властивостей крові внаслідок зниження здатності еритроцитів до проходження по капілярах, розміри яких менші, ніж діаметр клітини.

**Н.М. Шпакова, Е.Е. Нипот, И.О. Ищенко,
С.В. Прилуцкая, Е.И. Богуцкая,
В.В. Черепанов, Б.П. Сandomirский,
Ю.И. Прилуцкий**

ВЛИЯНИЕ C_{60} -ФУЛЛЕРЕНА НА ВЯЗКО-ЭЛАСТИЧНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Исследовано влияние водного коллоидного раствора C_{60} -фуллерена (ВКРФ) на вязко-эластичные свойства мембраны эритроцитов человека. Установлено, что его

действие на эритроциты зависит от осмотичности среды и концентрации в ней C_{60} -фуллерена. В частности, в изотоническом растворе (0,15 моль/л NaCl) добавление C_{60} -фуллерена в концентрациях от 0,7 до 28 мкмоль/л не вызывало гемолитического повреждения клеток, в гипотонической среде при внесении в концентрации 7 мкмоль/л в начале гемолиза эритроцитов его стимулирующий эффект максимален. При добавлении ВКРФ через 20 с после начала гемолиза стимуляции этого эффекта не наблюдается, что указывает на изменения вязко-эластичных свойств мембраны эритроцитов уже в первые секунды ее взаимодействия с C_{60} -фуллереном. Ключевые слова: водный коллоидный раствор C_{60} -фуллерена, эритроциты человека, вязко-эластичные свойства мембраны, атомно-силовая микроскопия.

N.M. Shpakova¹, E.E. Nipot¹, I.O. Ishchenko¹, S.V. Prylutska², K.I. Bogutska², V.V. Cherepanov³, B.P. Sandomirskiy¹, Yu.I. Prylutskiy²

EFFECT OF C_{60} FULLERENE ON VISCOELASTIC PROPERTIES OF HUMAN ERYTHROCYTES MEMBRANE

The effect of C_{60} fullerene aqueous colloid solution (C_{60} FAS) on viscoelastic properties of human erythrocytes membrane has been studied. It was established that the effect of C_{60} FAS on erythrocytes depends on the medium osmolality and concentration of C_{60} fullerene in it. In particular, in isotonic solution (0,15 mole/L NaCl) adding C_{60} fullerene in concentrations from 0,7 до 28 μ mole/L did not cause the hemolytic damage of cells. In hypotonic medium when introducing C_{60} fullerene (7 μ mole/L concentration) at the beginning of erythrocyte hemolysis its stimulating effect was maximal and when adding C_{60} FAS in 20 s after hemolysis start no this process stimulation is observed. This points to the changes in viscoelastic properties of erythrocyte membranes even during the first seconds of its interaction with C_{60} fullerene.

Key words: C_{60} fullerene aqueous colloid solution, human erythrocytes, viscoelastic properties of membrane, atomic-force microscopy.

¹*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, Kharkiv;*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv;*

³*Institute of Physics of NAS of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Prylutska S.V., Kichmarenko Yu.M., Bogutska K.I., Prylutskiy Yu.I. C_{60} fullerene and its derivatives as anticancer agents: problems and prospects. *Biotechnol. Acta.* 2012; 5 (3): 9-17 [Ukrainian].
2. Prylutska S.V., Rotko D.M., Prylutskiy Yu.I., Rybalchenko V.K. Toxicity of carbon nanostructures in vitro and in vivo systems. *Modern Problems Toxicol.* 2012; 4: 49-57 [Ukrainian].
3. Su Y., Xu J.Y., Shen P., Li J., Wang L., Li Q., Li W., Xu G.T., Fan C., Huang Q. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fulleranol in different cell lines. *Toxicol.* 2010; 269 (2-3): 155-9.
4. Rouse J.G., Yang J., Barron A.R., Monteiro-Revire N.A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol in Vitro.* 2006; 20 (8): 1313-20.
5. Grebinyk S.M., Grynuk I.I., Prylutska S.V., Matyshevska O.P. Generation of active oxygen forms in rat tymocytes under action of hydrogen peroxide and C_{60} fullerene. *Ukr Biochem J.* 2012; 84 (2): 48-52 [Ukrainian].
6. Andreichenko K.S., Prylutska S.V., Medynska K.O., Bogutska K.I., Nurishchenko N.E., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Effect of C_{60} fullerene on ATPase activity and superprecipitation of skeletal muscle actomyosin. *Ukr Biochem J.* 2013; 85 (2): 20-6.
7. Schuetze C., Ritter U., Scharff P., Fernkorn U., Prylutska S., Bychko A., Rybalchenko V., Prylutskiy Yu. Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine- C_{60} with a bimolecular lipid model membrane. *Mater Sci Engineer. C.* 2011; 31 (5): 1148-50.
8. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M., Bychko A., Andreichenko K., Stoika R., Rybalchenko V., Prylutskiy Y., Tsierkezos N.G., Ritter U. Water-soluble pristine C_{60} fullerenes increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J Biomed Nanotechnol.* 2012; 8(3): 522-7.
9. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutskiy Yu.I., Ritter U., Scharff P. Pristine C_{60} fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol.* 2011; 33 (3): 162-4.
10. Grynuk I.I., Perepelytsina O.M., Prylutska S.V., Garmanchuk L.V., Khranovska N.N., Matyshevska O.P., Sydorenko M.V. Influence of C_{60} fullerenes on the survivability of breast cancer cell line MCFb7 long-term incubation. *Biotechnol. Acta.* 2010; 3 (4): 75-9 [Ukrainian].
11. Prylutska S.V., Matyshevska O.P., Grynuk I.I., Prylutskiy Y.I., Ritter U., Scharff P. Biological effects of C_{60} fullerenes in vitro and in a model system. *Mol Cryst Liq Cryst.* 2007; 468: 265-74.
12. Prylutskiy Yu.I., Petrenko V.I., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Bulavin L.A., Litsis O.O., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V., Naumovets A.G., Ritter U. On the origin of C_{60} fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir.* 2014; 30 (14): 3967-70.
13. Bulavin L., Adamenko I., Prylutskiy Yu., Durov S., Graja A., Bogucki A., Scharff P. Structure of fullerene C_{60} in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys.* 2000; 2 (8): 1627-9.
14. Prylutskiy Yu.I., Buchelnikov A.S., Voronin D.P., Kostjukov V.V., Ritter U., Parkinson J.A., Evstigneev M.P. C_{60} fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys.* 2013; 15 (23): 9351-60.
15. Prylutskiy Yu.I., Durov S.S., Bulavin L.A., Adamenko I., Moroz K.O., Geru I., Dihor I.N., Scharff P., Eklund P.C., Grigorian L. Structure and thermophysical properties of

- C₆₀ fullerene aqueous solution. Int. J. Thermophys. 2001; 22 (3): 943-56.
16. Ghashghaeinia M., Cluitmans J.C., Akel A., Dreischer P., Toulany M., Köberle M., Skabytska Y., Saki M., Biedermann T., Duszenko M., Lang F., Wieder T., Bosman G.J. The impact of erythrocyte age on eryptosis. Br J Haematol. 2012; 157 (5): 606-14.
17. Wong-Ekkabut J., Baoukina S., Triampo W., Tang I.M., Tieleman D.P., Monticelli L. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. Nat Nanotechnol. 2008; 3 (6): 363-8.
18. Shpakova N.M. Temperature and osmotic sensitivity of red blood cells of different mammalian species. Biol Animals. 2010; 12 (1): 382-91 [Ukrainian].
19. Solomadin I.N., Marov N.V., Venediktova N.I., Kosenko E.A., Kaminskii Yu.G. Toxic effect of A β ₂₅₋₃₅ and C₆₀ fullerene on erythrocytes. Biology Bulletin. 2008; 35 (4): 436-40.
20. Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Kleut D., Misirkic M., Janjetovic K., Vucicevic L., Pantovic A., Jovanovic S., Dramicanin M., Markovic Z., Trajkovic V. Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared C₆₀ fullerene nanoparticles. Nanotechnol. 2010; 21 (37): 375102.

Ин-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: bsan38@yahoo.com;

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка

E-mail: prylut@ukr.net;

Ин-т фізики НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 14.03.2014

Ю.О. Божкова, В.В. Кірошка, А.А. Гавас, В.А. Бондаренко

Динаміка структурних змін оваріальної тканини при ішемії

Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; E-mail: tischenko.kh@gmail.com, vvkiroshka@mail.ru

Досліджували кореляційну залежність фолікулогенезу та ендокринну функцію оваріальної тканини від ступеня її структурних пошкоджень і об'ємних змін ооцитів при ішемії. Показано, що морфологічні трансформації структурних компонентів оваріальної тканини є оборотними після 2-годинної ішемії при 37 °С. У цьому разі при відновленні кровотоку в умовах гетеротопічної трансплантації вміст естрадіолу був $25,9 \pm 5,18$ нг/мл, а прогестерону – $18,48 \pm 3,69$ нг/мл, що достовірно вище відносно значень у кастрованих тварин-реципієнтів. Введення ембріональної телячої сироватки в середовище інкубації викликало зменшення об'єму ооцитів зростаючих фолікулів на 5–7 % в умовах ішемії та зниження концентрації естрадіолу до $17,75 \pm 3,55$ нг/мл, а прогестерону – до $10,52 \pm 2,1$ нг/мл на 30-ту добу після трансплантації яєчника. Збільшення часу ішемії до 4 год призводило до незворотних морфологічних трансформацій, зменшення об'єму ооцитів на 40 % і утворення склерозованої тканини після трансплантації ішемізованих фрагментів яєчників.

Ключові слова: оваріальна тканина, ішемічні пошкодження, ендокринна функція, об'єм ооцитів.

ВСТУП

Вивчення патофізіологічних механізмів ішемічних ушкоджень тканин і органів – одне з актуальних завдань сучасної фізіології. Основною причиною ішемії органів і тканин є порушення або повне припинення кровопостачання, яке ініціює каскад реакцій: зниження вмісту макроергічних сполук, порушення ферментативної кінетики, накопичення продуктів розпаду, утворення активних форм кисню, посилення процесу перекисного окиснення ліпідів [1–3]. Для зазначених вище патологічних процесів характерним є запуск мітохондріального механізму клітинної загибелі, який може завершуватися як істинним апоптозом клітини, так і некробіозом [4, 5]. У сучасній літературі обговорюються [6–9] можливості попередження пошкоджень в ішемізованих органах і тканинах через визначення оптимальних часових і температурних параметрів перфузії, а також введенням до

складу перфузійних середовищ різних речовин з антиоксидантними властивостями. Одним з найбільш широко використовуваних компонентів перфузійних середовищ є альбумін, який характеризується як антиоксидантними властивостями, так і здатністю змінювати парацелюлярну ендотеліальну проникність [10]. Однак у літературі існують суперечливі дані щодо його дії залежно від температури і складу перфузійних середовищ. Показано [11], що введення альбуміну або ембріональної телячої сироватки (ЕТС) у середовище інкубації підвищує збереження кератиноцитів в умовах гіпоксії при 4 і 25 °С, тоді як при 37 °С – визначається складом середовища інкубації. Так, введення цих компонентів до складу розчину UW (від англ. University of Wisconsin solution) негативно впливає на збереження ендотеліоцитів при нормотермічному зберіганні, тоді як додавання до розчину НТК (від англ. histidine-tryptophan-ketoglutarate) запобігає

© Ю.О. Божкова, В.В. Кірошка, А.А. Гавас, В.А. Бондаренко

пошкодженню мітохондрій і призводить до повної регенерації клітин у культурі [12]. До теперішнього часу на різних експериментальних моделях (головний мозок, печінка, серце, нирки, м'язи) встановлені максимальні часові терміни оборотності ішемії залежно від температури і складу перфузійних середовищ [13].

Дослідження толерантності яєчників до ішемії, критичний час, а також вплив різних фізико-хімічних факторів на структурно-функціональні пошкодження оваріальної тканини є актуальним завданням у сучасній репродуктивній фізіології [14]. Це зумовлено тим, що трансплантація тканини яєчників є однією з основних стратегій збереження репродуктивної та стероїдогенної функції у жінок після курсів хіміо- та радіотерапії [15]. Однак для широкого впровадження цієї технології в клінічну практику потрібне збереження достатнього пулу життєздатних фолікулів [16, 17]. Наразі залишаються відкритими питання про корелятивну залежність ступеня структурних пошкоджень тканини яєчника, їх оборотність і відновлення ендокринної функції умов моделювання ішемії.

Мета нашої роботи – дослідити динаміку морфологічних трансформацій оваріальної тканини, фолікулогенез та ендокринну функцію залежно від часу ішемії та складу середовища інкубації.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були фрагменти оваріальної тканини 3-місячних щурів лінії Вістар, які знаходилися в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України. Утримання та використання лабораторних тварин відповідало положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин», які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) і загальноприйнятим Національним нормам біоетики.

Ішемію моделювали інкубацією фрагментів яєчників при +37 °C у фосфатно-со-

льовому буфері (ФСБ; моль/л): 130 – NaCl, 20 – KCl, 20 – фосфатного буфера при pH 7,4 – (розчин 1), а також у фосфатно-сольовому буфері з додаванням 10 % ЕТС (розчин 2). Час ішемічного впливу становив 2, 4 і 6 год. Після цього для морфологічних досліджень здійснювали фіксацію оваріальної тканини в 2%-му розчині глутарового альдегіду на 150 ммоль/л фосфатному буфері і виготовлення напівтонких зрізів за стандартною методикою [18]. Кожен третій зріз забарвлювали толуїдиновим синім. Здійснювали морфологічний аналіз гістологічних зрізів, а також визначення загального об'єму фолікулів та ооцитів за допомогою комп'ютерної програми (Fovea Pro®, Reindeer Graphics, Asheville NC, США, and Photoshop®, Adobe Systems, Inc. San Jose, CA, США). Фолікули виміряли від зовнішнього шару теки (якщо він наявний) або від зовнішнього шару клітин гранульози (коли клітини теки відсутні), а ооцити – без зони пелюцида [19]. Співвідношення об'єму ооцита до об'єму фолікула було представлено у вигляді лінійної залежності.

Функцію оваріальної тканини після ішемічного впливу вивчали методом трансплантації під капсулу лівої нирки щурів. Для проведення експериментальної роботи тваринам трансплантували оваріальну тканину: I група – контрольна (свіжовиділена оваріальна тканина), II група – після інкубації в розчині 1, III група – після інкубації в розчині 2. Трансплантацію оваріальної тканини в усіх групах здійснювали одночасно з двобічною оваріоектомією. Операції тваринам проводили в стерильних умовах під комбінованим наркозом (0,1 мг кетаміну, 0,25 мг ксилазину на 100 г маси). Гетеротопічну трансплантацію здійснювалась під капсулу лівої нирки.

На 30-ту добу після трансплантації проводили евтаназію тварин за допомогою ефірного наркозу. Для морфологічних досліджень нирки з трансплантатом фіксували у 10%-му розчині формаліну протягом 48 год [18]. З кожного зразка робили серійні зрізи всього трансплантата товщиною 10 мкм. Кожен

третій зріз фарбували гематоксилін-еозином. Аналіз гістологічних зрізів здійснювали, вивчаючи тільки фолікули з видимим ядром ооцита для виключення повторного рахунку одного і того самого фолікула.

Ідентифікацію стадії розвитку фолікулів проводили згідно з класифікацією: первинний – ооцит оточений поодиноким шаром кубічних клітин гранульози; преантральний – ооцит оточений більш ніж двома шарами гранульозних клітин, розташованих на базальній мембрані, навколо якої знаходяться поодинокі тека-клітини; антральний – ооцит збільшений в об'ємі, оточений кількома шарами гранульозних клітин, формується порожнина, яка містить фолікулярну рідину. На гістологічних зрізах визначали відсоток площі фіброзу тканини відносно загальної площі трансплантата.

Дослідження гістологічних препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа при збільшеннях у 10, 20 і 40 разів. Мікрофотозйомку проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 і пакета прикладних програм для обробки зображення.

Концентрацію естрадіолу і прогестерону в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали за допомогою набору ST AIA-PACK hsE2 і ST AIA-PACK PROG методом хемілюмінесцентного аналізу.

Отримані результати статистично обробляли за допомогою програми Statgraphics v2.1. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено зміни морфологічної структури оваріальної тканини залежно від часу ішемії у ФСБ (розчин 1) та з додаванням 10 % ЕТС (розчин 2). Видно (див. рис. 1, а), що в нормі фолікули мають сферичний ооцит з великим ексцентричним ядром, оточеним однорідною цитоплазмою. Ооцит оточений білковою оболонкою (зона пелюцида), що має

однакову товщину і гомогенність по всьому периметру клітини. До зони пелюцида щільно прилягають клітини гранульози, які контактують між собою і з базальною мембраною. Зовні базальної мембрани знаходяться клітини теки.

При інкубації фрагментів оваріальної тканини протягом 2 год при 37 °С спостерігаються незначні зміни морфологічної структури фолікулів як у розчині 1, так і в розчині 2 (див. рис. 1,б,в). Спостерігається стиснення клітин гранульози та акумуляція між ними, а також біля базальної мембрани. При цьому гранульозні клітини зберігають щільний контакт з ооцитом, який має сферичну форму та незначно гранульовану цитоплазму. Ядро ооцита залишається гомогенним і має чітко виражену мембрану. Зміни структури клітин теки та інтерстиціальних клітин не спостерігається.

При збільшенні часу ішемії до 4 год відзначається акумуляція рідини між усіма структурними елементами оваріальної тканини, тобто відбувається стиснення клітин і втрата контакту як між клітинами гранульози, так і клітинами теки (рис. 2,а,б). Однак контакт між клітинами гранульози і ооцитом все ще існує. Спостерігається грануляція в цитоплазмі ооцита та початкові етапи його стиснення, що проявляється у зміні його форми та утворенні *перивітелінового простору* між ооцитом і білковою оболонкою. Це характерно для виходу з цитоплазми осмотично активних речовин. При цьому зберігається типова структура ядра і гомогенна по всій окружності ооцита зона пелюцида.

Після 6 год інкубації фрагментів оваріальної тканини збільшується вміст рідини між усіма структурними елементами тканини (див. рис. 2,в,г). Спостерігається подальше стиснення ооцита і збільшення *перивітелінового простору*. Ядро ооцита втрачає свою округлу форму і гомогенність. В середині ядра відзначаються скупчення хроматину у вигляді окремих грудочок. Слід зазначити, що зона пелюцида не має чітких меж, тоді як мембрана ооцита і базальна мембрана фолікулів зберігають контури.

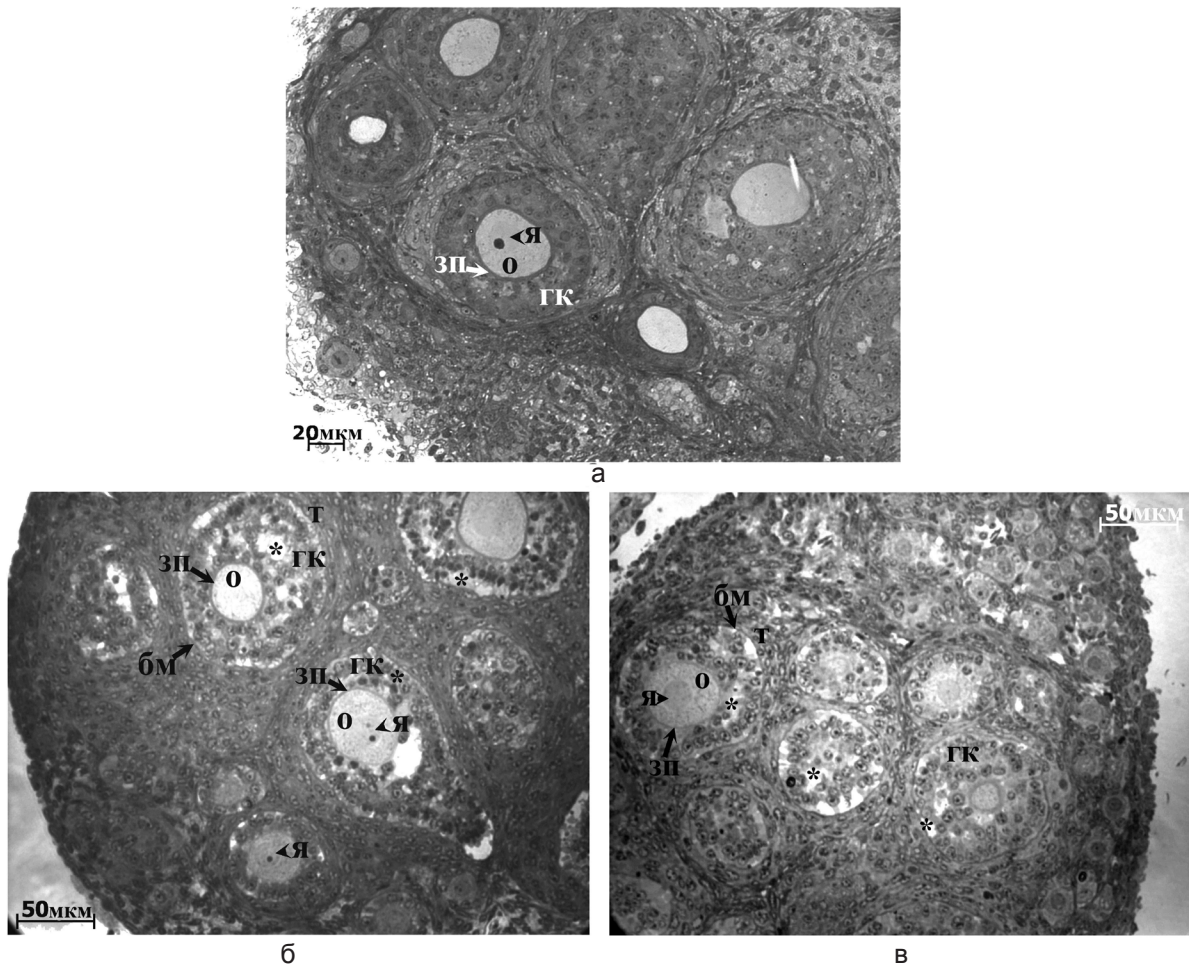


Рис. 1. Гістопрепарати фрагментів оваріальної тканини: а – свіжовиділена, б, в – після 2 год інкубації в розчині 1 і 2 відповідно: о – ооцит, я – ядро, ЗП – зона пелюцида, ГК – гранульозні клітини, БМ – базальна мембрана, Т – тека-клітини, * – акумуляція рідини, + – перивітеліновий простір

Порівнюючи часову динаміку морфологічних трансформацій оваріальної тканини (див. рис. 1, 2) слід вказати на відсутність якісних структурних відмінностей залежно від складу середовища інкубації.

Відомо, що в умовах гіпоксії відбувається енергетичне виснаження клітин, накопичення метаболітів, а також порушення іонного гомеостазу за рахунок зниження активності роботи транспортної системи, деполяризації клітинної мембрани і перерозподілу електrolітів між клітинною і позаклітинною рідиною [20]. Основним фізіологічним процесом, що відображає виникнення дисбалансу

осмотично активних сполук у клітині, є зміна її об'єму. Оскільки структурною одиницею оваріальної тканини є фолікул, ми вважали за доцільне провести аналіз об'ємних змін ооцитів відносно загального об'єму фолікула (рис. 3). Протягом перших 2 год інкубації при 37 °C об'єм ооцитів у розчині 1 достовірно не відрізнявся від контролю. Використання розчину 2 призводило до зменшення об'єму ооцитів антральних фолікулів, тоді як об'єм ооцитів примордіальних і первинних фолікулів залишався на рівні контролю (див. рис. 3). Збільшення часу гіпоксії до 4 і 6 год нівелювало зазначені вище об'ємні відмін-

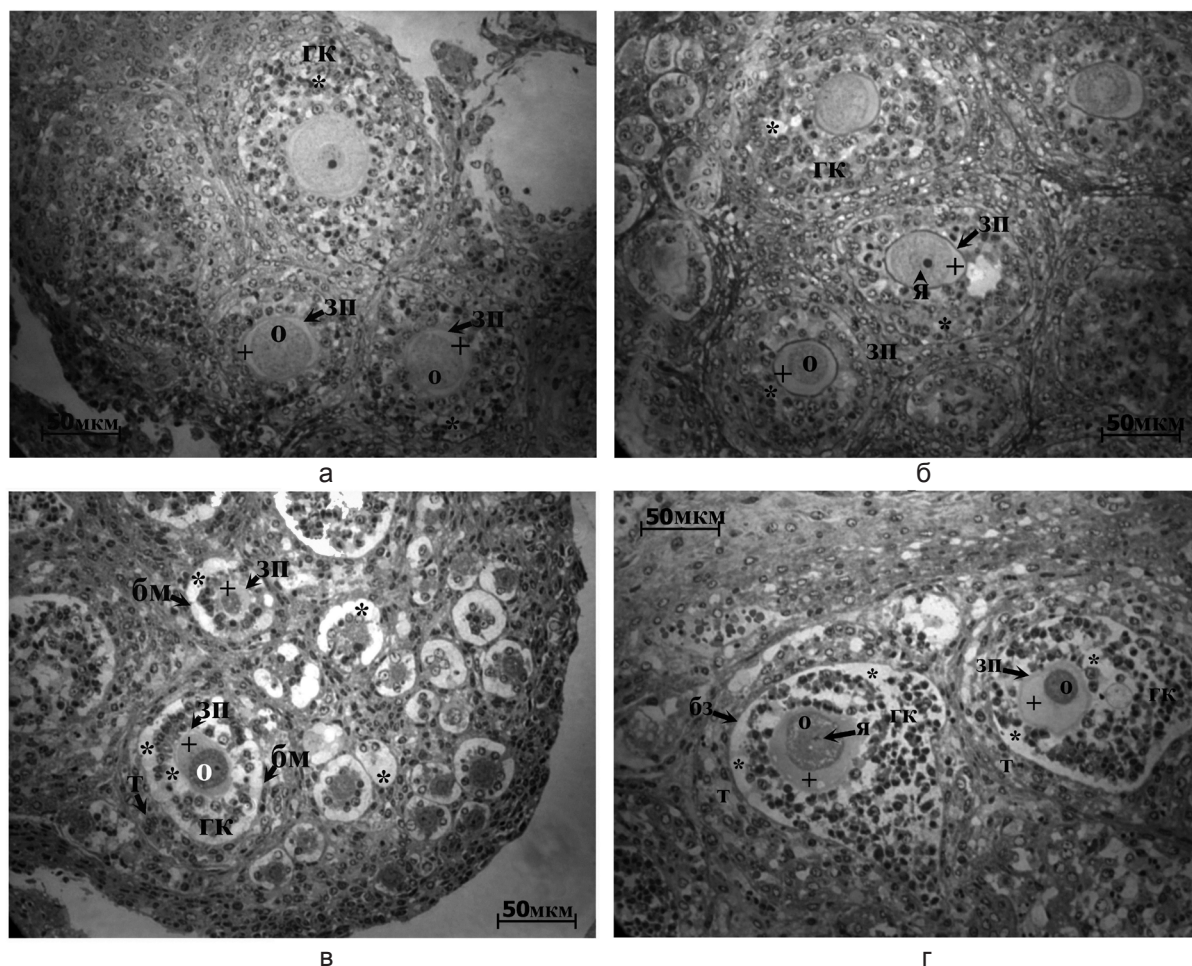


Рис. 2. Гістопрепарати фрагментів оваріальної тканини: після 4 год інкубації в розчині 1 (а) і 2 (б), після 6 год інкубації в розчині 1 (в) і 2 (г): о – ооцит, я – ядро, ЗП – зона пелюцида, ГК – гранульозні клітини, БМ – базальна мембрана, Т – тека-клітини, * – акумуляція рідини, + – перивітеліновий простір

ності ооцитів, що були зумовлені наявністю ЕТС у середовищі інкубації. При цьому відзначалося зменшення об'єму ооцитів в 2 і 2,8 раза через 4 і 6 год, відповідно (див. рис. 3).

Можливість оборотності зазначених вище ішемічних ушкоджень, а також здатність відновлення ендокринної та репродуктивної функції було досліджено методом гетеротопічної трансплантації кастрованим тваринам-реципієнтам. Трансплантацію фрагментів оваріальної тканини здійснювали у разі збереження структурної цілісності ядра ооцита не залежно від об'єму клітин (див. рис. 1, 2), тобто після 2 і 4 год ішемії. Показано (таблиця), що фолікулярний профіль трансплантатів

свіжовиділеної оваріальної тканини (І група) і після 2-годинної ішемії в розчині 1 (ІІ група) і розчині 2 (ІІІ група) був подібним і представлений преантральними і антральними фолікулами, а також жовтими тілами (див. таблицю). Слід зазначити, що площа фіброзу трансплантатів ішемізованої тканини становила 30 і 66 % в ІІ і ІІІ групах відповідно. Трансплантація оваріальної тканини після 4-годинної ішемії призводила до повного її склерозування на 30-ту добу спостереження.

У цей термін концентрація естрадіолу і прогестерону у тварин І і ІІ групи була у межах фізіологічної норми, тоді як у тварин ІІІ групи ці показники знижилися ($P < 0,05$; рис. 4).

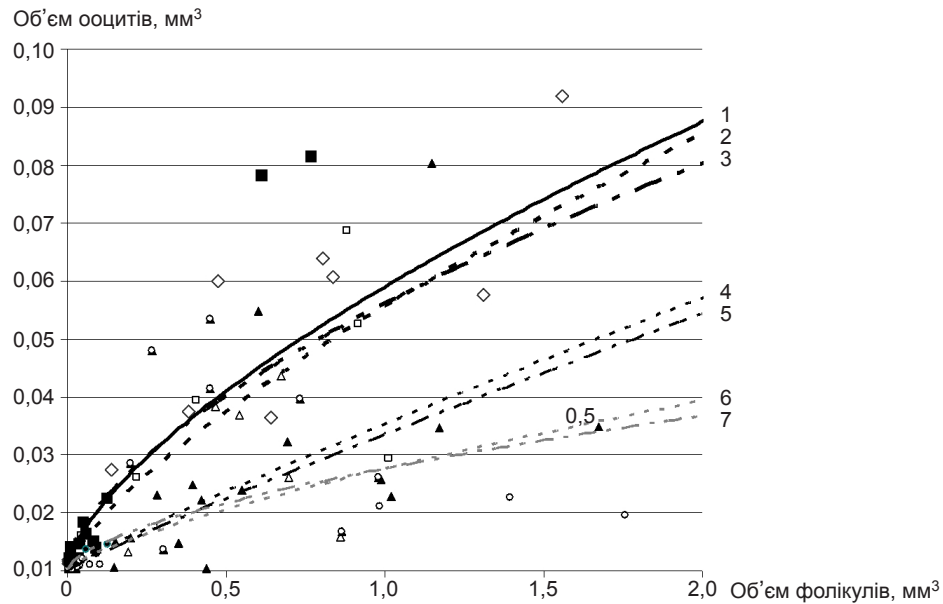


Рис. 3. Об'єм ооцитів і фолікулів у фрагментах оваріальної тканини: $\diamond$ – свіжовиділеної, $\square$ – після 2 год в розчині 1, $\blacksquare$ – після 2 год у розчині 2, $\triangle$ – після 4 год у розчині 1, $\blacktriangle$ – після 4 год у розчині 2, $\circ$ – після 6 год в розчині 1, $\bullet$ – після 6 год у розчині 2; лінійна залежність об'єму ооцитів від об'єму фолікулів у фрагментах: 1 – свіжовиділених, 2 – після 2 год у розчині 1, 3 – після 2 год у розчині 2, 4 – після 4 год у розчині 1, 5 – після 4 год у розчині 2, 6 – після 6 год у розчині 1, 7 – після 6 год у розчині 2

Трансплантація фрагментів яєчника після 4 год ішемії призводила до зниження вмісту статевих гормонів у тварин II і III груп до рівня кастрованих тварин.

Експериментальні результати, отримані в нашій роботі, однозначно вказують на те, що фолікулогенез і синтез статевих гормонів

у фрагментах оваріальної тканини в умовах гетеротопічної трансплантації є відображенням оборотності структурних трансформацій і об'ємних змін тканини яєчника, зумовлених дією ішемії. Розвиток фолікулярних структур (див. таблицю) і гормональна функція у кастрованих тварин-реципієнтів (див. рис.

Гістологічний аналіз трансплантатів оваріальної тканини на 30-ту добу

Морфометричні показники	Свіжовиділена оваріальна тканина	Фосфатно-сольовий буфер		Фосфатно-сольовий буфер, 10% ембріональної телячої сироватки	
		після 2 год ішемії	після 4 год ішемії	після 2 год ішемії	після 4 год ішемії
Кількість фолікулів на гістологічний зріз					
антральних	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2	0	2 $\pm$ 1	0
преантральних	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3	0	2 $\pm$ 1	0
Кількість жовтих тіл на гістологічний зріз	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	0	4 $\pm$ 3	0
Площа фіброзу тканини від загальної площі трансплантата, %	0	30 $\pm$ 20	100	66 $\pm$ 40	100

4) відзначені тільки після трансплантації фрагментів оваріальної тканини у разі 2-годинної ішемії на фоні збереження об'ємних характеристик і морфологічної цілісності ооцитів. Збільшення часу ішемії до 4 год викликало зменшення об'єму ооцитів на 40 % (див. рис. 3), що згодом супроводжувалося склерозуванням тканини після трансплантації і відсутністю стероїдогенної функції у тварин-реципієнтів. Отже, можна припустити, що об'ємні зміни оваріальної тканини після 4-годинної ішемії в розчинах 1 і 2 (див. рис. 3) є незворотними. Цей факт, вірогідно, пов'язаний з порушенням іонного гомеостазу клітини в умовах ішемії, яке призводить до дисбалансу осмотичного тиску та викликає зміну об'єму клітин [21–23]. Порушенням іонної проникності клітин при збереженні

цілісності плазматичної мембрани, а саме втрата клітиною іонів K^+ і Cl^- , призводить до зменшення клітинного об'єму від 30 до 70 % в ізотонічних умовах для різних типів клітин, що є основним критерієм ранньої стадії апоптозу [24–27]. Як видно з наших результатів (див. рис. 2), достовірне збереження об'єму ооцитів щодо контролю відзначено тільки у разі 2-годинної інкубації в розчині 1. Це, ймовірно, і визначило збереження стероїдогенної функції ішемізованної тканини на рівні свіжовиділеної. Очевидно, в цих експериментальних умовах адаптивні механізми регуляції об'єму залишаються ефективними і виступають як «амортизатори» при набуханні і при стисненні клітин [28].

Додавання ЕТС до середовища інкубації не призводило до якісних відмінностей у

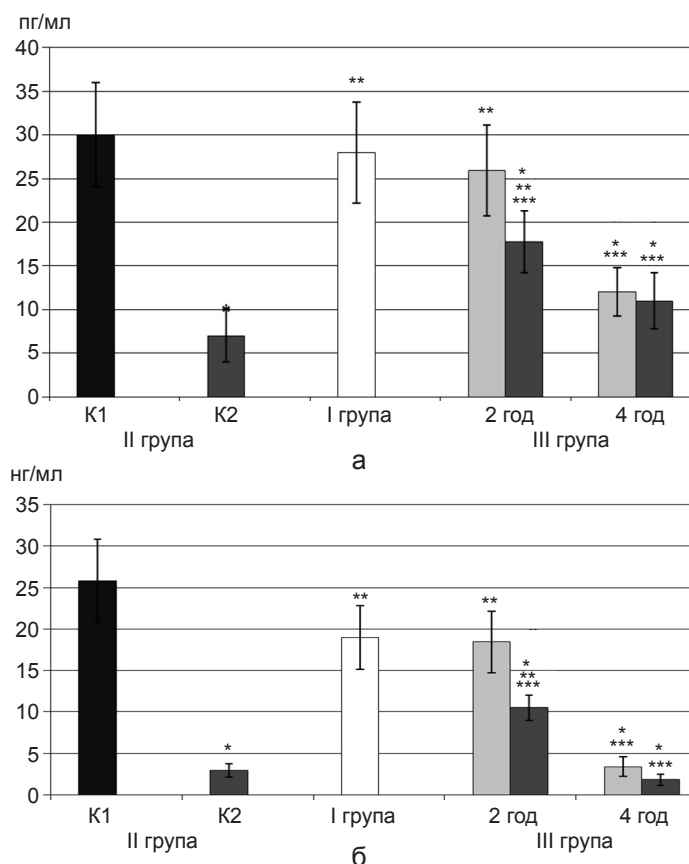


Рис. 4. Вміст естрадіолу (а) і прогестерону (б) у тварин після трансплантації оваріальної тканини: K1 – інтактні тварини, K2 – тварини після оваріоектомії. * $P < 0,05$ порівняно зі значеннями K1, ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями K2, *** $P < 0,05$ порівняно з показниками I групи

морфологічних трансформаціях оваріальної тканини (див. рис. 1, 2), тоді як об'єм ооцитів преантральних і антральних фолікулів зменшувався відносно контролю (рис. 3). Ці зміни об'єму ооцитів, ймовірно, запускають механізм апоптозу, який при відновленні кровопостачання тканини викликає зменшення пулу життєздатних фолікулів, збільшення площі фіброзу і зниження ендокринної функції трансплантата (див. таблицю, рис. 4).

Зіставляючи результати морфологічної трансформації і об'ємних змін фолікулів оваріальної тканини, а також фолікулярного профілю і гормональної функції трансплантатів можна дійти висновку, що об'ємні зміни ооцитів при збереженні їх форми, структури ядра і плазматичної мембрани в ішемізованій тканині яєчника є одним з основних факторів, яких визначатиме повноцінність її функції після відновлення кровопостачання. Згідно з сучасними уявленнями зменшення об'єму клітин в ізотонічних умовах передує морфологічним і біохімічним змінам, пов'язаним з апоптозом клітини в умовах ішемії [29, 30]. У праці Maeno і співавт. [25] припускається, що зменшення об'єму клітин, що зумовлене зниженням концентрації K^+ і Cl^- , супроводжується збільшенням щільності цитоплазми, утворенням везикул на поверхні плазматичної мембрани, а також активацією внутрішньоклітинних каспаз і ендонуклеаз.

Cidłowski і співавт. [31, 32] показали, що після гіпертонічного стиснення лімфоцитів їх об'єм не відновлюється в фізіологічних умовах, а запускається мітохондріальний механізм апоптозу через активацію внутрішньоклітинних каспаз і цитохрому С. Активні каспази викликають протеоліз ядерних і цитоплазматичних білків, а також активують ендонуклеази. В результаті це призводить до фрагментації ядра клітини і цитоплазми, утворення апоптотичних тілець. Аналогічні дані були отримані на нейронах [33], а також на кардіоміocyтах [34]. Втрата K^+ ооцитом і клітинами гранульози спричинює запуск каскаду апоптичних подій, що включають

активацію каспаз і ендонуклеаз [35, 36].

Отже, можна припустити, що зменшення об'єму ооцитів в умовах ішемії, ймовірно, також пов'язане з ініціацією механізму апоптозу, що призводить до зниження пулу життєздатних фолікулів після відновлення кровопостачання при гетеротопічній трансплантації.

Об'ємні зміни ооцитів, в свою чергу, визначаються складом середовища інкубації і тривалістю ішемічного впливу. У такій постановці експерименту максимальна оборотність ішемічного ушкодження була відзначена після 2-годинної інкубації оваріальної тканини в розчинах, що були досліджені. Причому, введення 10%-ї ЕТС викликало об'ємні зміни ооцитів зростаючих фолікулів, а також достовірне зниження стероїдогенної функції тканини після її трансплантації щодо контрольних значень.

Таким чином, можна сказати, що збереження об'ємних характеристик ооцитів в умовах ішемії відносно контролю, незважаючи на акумуляцію рідини між структурними елементами оваріальної тканини, є основним параметром, який забезпечує збереження фолікулярного пулу, динаміку фолікулогенезу та ендокринну функцію фрагментів ішемізованої тканини після відновлення кровотоку за допомогою трансплантації.

**Ю.О. Божкова, В.В. Киришча, А.А. Гавас,
В.А. Бондаренко**

ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ИШЕМИИ

Исследовали корреляционную зависимость фолликулогенеза и эндокринной функции овариальной ткани от степени ее структурных повреждений и объемных изменений ооцитов при ишемии. Показано, что морфологические трансформации структурных компонентов овариальной ткани являются обратимыми после 2-часовой ишемии при 37 °С. В этом случае при восстановлении кровотока в условиях гетеротопической трансплантации содержание эстрадиола у животных было $25,9 \pm 5,18$ пг/мл, а прогестерона – $18,48 \pm 3,69$ нг/мл, что достоверно выше значений кастрированных животных-реципиен-

тов. Введение эмбриональной телячьей сыворотки в среду инкубации вызывало уменьшение объема ооцитов растущих фолликулов на 5–7 % в условиях ишемии и снижение концентрации эстрадиола до $17,75 \pm 3,55$ пг/мл, а прогестерона – до $10,52 \pm 2,1$ нг/мл на 30-е сутки после трансплантации яичников. Увеличение времени ишемии до 4 ч приводило к необратимым морфологическим трансформациям, уменьшению объема ооцитов на 40 % и образованию склерозированной ткани после трансплантации ишемизированных фрагментов яичников.

Ключевые слова: овариальная ткань, ишемические повреждения, эндокринная функция, объем ооцитов.

Yu.O Bozhkova, V.V Kiroshka, A.A. Havas, V.A. Bondarenko

DYNAMICS OF STRUCTURAL CHANGE OF OVARIAN TISSUE UNDER ISCHEMIA

In this work it was investigated the dependence of the correlation of folliculogenesis and endocrine function of ovarian tissue on the degree of structural damage and oocyte volume changes during ischemia. It was shown that after 2 hours of ischemia at 37 °C the morphological transformation of the structural components of the ovarian tissue were reversible. In case of restoration of blood flow conditions by heterotopic transplantation estradiol level of animals was $25,9 \pm 5,18$ pg/ml, progesterone - $18,48 \pm 3,69$ ng/ml, significantly higher than the castrated animals-recipients. Supplement of the incubation medium by the fetal bovine serum lead to decreasing by 5-7 % in the volume of oocytes of growing follicles during in ischemia and reduced steroidogenic function of ovarian tissue after perfusion. Increased time of the ischemia up to 4 hours was founded in irreversible morphological transformation, reduce the volume of oocytes by 40 % and the formation of sclerosed tissue after transplantation of the ischemic fragments of ovarian tissue.

Key words: ovarian tissue, ischemic damage, endocrine function, the volume of oocyte.

Institute for Problem of Cryobiology and Criomedicine of NAS of Ukraine, Kharkiv

REFERENCES

- Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg.* 1994;81:631-41.
- Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, et al. Ischemia-Reperfusion Injury. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007;33(6):600-12.
- Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 1993;14:165-75.
- Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:644-8.
- Fu H, Xu H, Chen H, Li Y, Li W, Zhu Q, et al. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Ameliorates Liver Ischemia/Reperfusion Injury via an Energy-dependent Mitochondrial Mechanism. *J Hepatol.* 2014 May;23:358-4.
- Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Ozgen U, Duran A, Uygun I. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Pak Med Assoc.* 2014 Mar;64(3):260-5.
- Alvarez P, Tapia L, Mardones LA, Pedemonte JC, Farias JG, Castillo RL. Cellular mechanisms against ischemia reperfusion injury induced by the use of anesthetic pharmacological agents. *Chem Biol Interact.* 2014 May 13;218:89-98.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Amer J Surg.* 1991;161:488-504.
- Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive Diseases and Sciences.* 2004;49(9):1359-77.
- Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:1653-62.
- Lee EJ, Lee S-A, Kim J. The effect of human serum albumin on the extended storage of human oral keratinocyte viability under mild hypothermia. *Cryobiol.* 2005; 50:103–11.
- Puehler T, Gleich O, Schopka S, Rupprecht L, S. Hirt, Schmid C, et al. Impact of normothermic perfusion and protein supplementation on human endothelial cell function during organ preservation. *Ann Thorac Surg.* 2010;89:512-21.
- Guiberta EE, Petrenkob AY, Balabana CL, Somovb AY, Rodriguez JV, Fullerc BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38:125-42.
- Bedaiwy MA, Shahin AY, Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2031-55.
- Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol.* 1999;33(1):29-33.
- Donnez J, Jadoul P, Langendonck A, Eyck A, Dolmans M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010;24:87-100.
- Boiso I, Veiga A, Tresserra F, Grases P, Barri PN, Dexeus S. Ovarian tissue freezing, a promising method for fertility preservation. *Ref Gynecol Obstet.* 2001;8:448-52.
- Lilli R. *Patogistologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya.* M.: Mir, 1969. 645 p
- Songsasen N, Fickes A, Pukazhenth BS, Wildt DE. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reprod Domest Anim.* 2009;44(2):65-70.
- Maxwell SJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997;58:95-117.

21. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and infrastructure. *Circ Res.* 1985;56:262-78.
22. McCarthy J.V., Cotter T.G. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death and Different.* 1997;4:756-70.
23. Redondo J, Pacheco ME, Manso AM, Salas M, Marin J. Cell volume and ionic transport systems after cold preservation of coronary endothelial cells. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:1290-5.
24. Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, et al. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10: 417-28.
25. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(17):9487-92.
26. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 2001;532(1):3-16.
27. Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(17):9360-2.
28. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr.* 2007 Oct;26(5):613-623.
29. Lang F, Uhlemann AC, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Siemen D, Nilius B, et al. Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. *Herz.* 1999;24(3):232-5.
30. Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue. *Reg J Path.* 1987;153(3):313-6.
31. Bortner CD, Cidlowski JA. Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:21953-62.
32. Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:33-42.
33. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci.* 2002;22(4):1350-62.
34. Ekhterae D, Platoshyn O, Zhang S, Remillard CV, Yuan JX-J. Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K currents. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:1405-10.
35. Lionetto MG, Giordano ME, Calisi A, Caricato R, Hoffmann E, Schettino T. Role of BK channels in the apoptotic volume decrease in native eel intestinal cells. *Cell Physiol Biochem.* 2010;25(6):733-44.
36. Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM. Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. – *Biol Reprod.* 2000;63:1358-69.

Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків
E-mail: tischenko.kh@gmail.com, vvkiroshka@mail.ru

Матеріал надійшов до редакції 24.03.2014

A.M. Manko¹, K.S. Neporada¹, A.A. Sukhomlyn¹,
J. Ghasemzadeh¹, T.V. Beregova², D.S. Yankovskiy³

Experimental correction of metabolic changes in mouth at long-term hypoacidity by multiprobiotic «symbiter acidophilic»

¹Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine; ²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine; ³Scientific Production Company «O.D. Prolisok», Kyiv, Ukraine, E-mail: manko_ann@mail.ru

It is known, that long decrease in gastric secretion leads to the development of hypergastrinemia, dysbiosis and to pathological changes in digestive organs. Very important there is a search of ways to correction of these undesirable consequences. Long-term usage of omeprazole leads to metabolic disorders in periodontium tissues and salivary glands, such as development of NO-ergic system disbalance and activation of free-radical oxidation, that are positively corrected by multiprobiotic of new generation "Symbiter acidophilic".
Key words: periodontium, salivary glands, omeprazole, hypoacidity, hypergastrinemia, dysbiosis, "Symbiter acidophilic".

The leading role in development of pathological changes in the oral cavity organs at long-term administration of proton pump inhibitor (PPI), probably, belongs to hypoacidity of gastric juice which assists to the development of dysbiosis of digestive tract different parts. As all of parts of digestive organs are connected by the general plan of histological structure, ontogenetic development, and difficult neuro-humoral mechanisms of intercommunication, violation of microecology in one part certainly influences on biotops of others in particular on oral cavity [1].

With the purpose of correction of mouth dysbiosis at the long application of PPI omeprazole in complex treatment of acid-dependent diseases of digestive system organs we applied probiotic, which not only corrects violation of biocenosis of digestive organs, but also has positive influence on immune and endocrine systems of organism [2, 3].

Multiprobiotic of the last generation «Symbiter Acidophilic» shows by itself the mutualistic symbiosis of 14 cultures of probiotic bacteria

(bifidobacterium, lactobacillus, lactococcus and propionibacteria) with the high concentration of viable cells (10^{11-12} CFU/dos.), has a wide spectrum of physiological valuable properties with synergism of the most essential probiotics properties [1]. Concentrated biomass of living cells of microorganisms symbiosis, CFU/sm³, not less than: lactobacillus and lactococcus – $6,0 \times 10^{10}$, propionibacteria – $3,0 \times 10^{10}$, bifidobacteria – $1,0 \times 10^{10}$, acetoacidic bacteria – $1,0 \times 10^6$ is a content of 1 dose of «Symbiter Acidophilic» (10 ml). It does not need additional activating, but begins to show the action from the oral cavity, because it is a living biomass of cells, but not liofilisate, in which microorganisms are in anabiosis. By modern presentations, the mechanism of positive action of probiotic is based on variability properties of indigenic microflora [4, 5, 6].

The purpose of our research was to study the influence of multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» on the oral cavity organs at long-term hypoacidity of gastric juice.

© A.M. Manko, K.S. Neporada, A.A. Sukhomlyn, J. Ghasemzadeh, T.V. Beregova, D.S. Yankovskiy

Materials and methods. Experiments were carried out with the observing of recommendations about carrying out of medical-biological researches according to European convention on 42 rats-males of the “Wistar” line, weight of 180-250 g. Euthanasia of animal was carried out under urethane anaesthesia by bloodletting. Omeprazole (“Sigma”, USA) was injected intraperitoneally to experimental rats in a dose of 14 mg/kg daily for 28 days separately or together with multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» (0,14 ml/kg per os once a day, “O.D. Prolisok”, Ukraine), to control rats during this time 0,2 ml of water was injected. Objects of research were soft, bone periodontium tissues and salivary glands of animals in homogenates of which were determined the activity of NO-synthase (NOS) (EC: 1.14.13.39) [8], maintenance of nitrite-anions [7], oxidative-modified proteins (OMP) [8] and middle mass molecules (MMM) [9]. In blood plasma gastrin concentration was determined by a radioimmunoassay technique, using an analytical kit of “MP Biomedicals, LLC”, USA. We determined, that gastrin concentration in a blood plasma of rats of the control group was $59,0 \pm 35,05$ pg/ml, in the experimental animals – $170,7 \pm 90,7$ pg/ml. Thus, hypergastrinemia is observed as a result of long-term hypoacidity of gastric juice [10].

During the bacterial researches were studied the features of contamination of intestine mucous shell by conditionally pathogenic and normal microflora after 28 days from the beginning of experiment. The study of intestine microbiocenosis included the analysis of specific and quantitative composition of microflora. The quantitative indexes of intestine microflora were studied by sowing of 1 ml from every breeding (1:10) on differential diagnostic environments (varieties of agar etc.). Got results were analyzed with the use of variation statistics methods.

Microecology of control rats intestine was characterized by a wide spectrum of transit microflora. The different representatives of enterobacter (esherihia, citrobacter, klebsiella, proteus, enterobacter et all.) entered in the com-

position of conditionally-pathogenic bacteria. *Staphilococcus*, enterococcus and *Candida* fungi were also selected. In 90% of intact animals pathogenic microflora from an intestine practically was not shown. The concentration of lactobacillus and bifidobacterium arrived at a high level – 10^7 - 10^9 CFU/g. Bacteriological researches of rats intestine maintenance with hypoacidity allowed to find out the negative changes of microecology, which consisted in a disbalance between the indexes of conditionally-pathogenic and normal microflora. The increase of frequency and general amount of staphilococcus and enterobacters (*Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) is registered, and also *Kandida* fungi. Found out a tendency to the decrease of quantitative indexes of inoculation of normal intestinal *E. coli* and enterococcus. The deficiency of indigenic microflora is registered in 70% of rats, its concentration made only 10^4 - 10^5 CFU/g. Application of «Symbiter Acidophilic» was accompanied by normalization of intestine contamination indexes by the representatives of normal and conditionally-pathogenic microflora: the quantitative indexes of staphilococcus goldish, enrerobacteries and *Candida* fungi sowing were decreased, population of lacto- and bifidobacteries was increased.

Consequently, multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» is able effectively stabilize the colonization resistance and normalize the balance between basic types of obligative and conditionally-pathogenic microflora at long-term hypoacidity in the intestine and in the oral cavity.

Results of research and their discussion. Nitrogen oxide is the important regulator of extra- and intercellular processes in living organisms [11, 12]. One of the mechanisms of metabolic violations development in periodontium tissues, which result to periodontitis, is disorder of local blood flow, one of which reasons is vasoconstriction. Generally known, that endotelial dysfunction plays the important role in the origin of many pathological processes, in the development of which the leading role

has a disbalance of NO-system. Metabolism of bone periodontium tissues is substantially differs from the metabolism of soft periodontium tissues, because of vascularisation features, intensivity of basic metabolism, processes of remodulation, functional loading, existence of intercommunication between bone periodontium tissues and cement of teeth roots, redistribution of the dental loading on bone tissues [13].

For the research of NO-ergic system of periodontium tissues and salivary glands of rats at long-term omeprazole-induced hypergastrinemia we determined the activity of NO-synthase and maintenance of NO_2^- , which is the final product of NO metabolism.

From the table 1 is evidently, that the long introduction of PPI to animals for 28 leads to decrease 1,2 times the activity of NO-synthase in soft periodontium tissues compared to the control. The highest activity of NO-synthase is marked for animals which obtained for 28 days «Symbiter Acidophilic» – in 5,26 times higher, than for control animals (table 1). At 28-daily introduction of «Symbiter Acidophilic» the activity of NO-synthase increases 1,23 times in bone periodontium tissues in comparing with animals

to which during this time only PPI was entered (tab. 1). In tissues of salivary glands the activity of NO-synthase at 28-daily omeprazole introduction increased 1,45 times, and at correction with the application of multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» the activity of NO-synthase on 28th day of experiment increased 1,18 times ($p < 0.05$) in comparing to rats without correction (tabl. 1).

NO_2^- is the final product of NO metabolism in organism. In the free state the period of its life is limited by 6-30 seconds, after that this gas form is oxidated to NO_2^- and other higher oxides. The increase of the NO-production systems power helps in adaptation to the factors of environment. At inflammatory processes, activation of macrophages and neutrophils, and also at development of pathogenic microflora of digestive system organs, maintenance of NO_2^- and NO_3^- ions considerably increase [12].

On 28th day of experiment the content of nitrite anion in soft periodontium tissues of rats with a correction grew 3 times accordingly in comparing with rats which at this time obtained PPI that is explained by the high activity of NOS-enzyme (tabl. 2). At 28-daily introduction of «Symbiter Acidophilic» the maintenance of

Table 1. The activity of NO-synthase in peridontium tissues and salivary glands of rats at long-term usage of PPI and correction by «Symbiter Acidophilic» ($M \pm m$)

Groups of animals	The activity of NO-synthase in soft periodontium mild tissues, nmol $[\text{NO}_2^-]/\text{g} \cdot \text{min}$	The activity of NO-synthase in bone periodontium tissues, nmol $[\text{NO}_2^-]/\text{g} \cdot \text{min}$	The activity of NO-synthase in salivary glands, nmol $[\text{NO}_2^-]/\text{g} \cdot \text{min}$
1. Control (n=12)	0,123 $\pm$ 0,020	0,154 $\pm$ 0,012	3,97 $\pm$ 0,11
2. Omeprazol 28 days (n=17)	0,103 $\pm$ 0,031	0,174 $\pm$ 0,018	5,76 $\pm$ 0,25
3. Omeprazol + Symbiter 28 days (n=8)	0,338 $\pm$ 0,079	0,181 $\pm$ 0,024	6,77 $\pm$ 0,15
4. Symbiter 28 days (n=5)	0,647 $\pm$ 0,379	0,217 $\pm$ 0,033	3,90 $\pm$ 0,08
Statistical index	$P_{1-2} > 0,05$	$P_{1-2} > 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$
	$P_{1-4} > 0,05$	$P_{1-4} > 0,05$	$P_{1-4} > 0,05$
	$P_{1-3} < 0,05$	$P_{1-3} < 0,05$	$P_{1-3} < 0,05$
	$P_{2-3} < 0,05$	$P_{2-3} < 0,05$	$P_{2-3} < 0,05$
	$P_{2-4} > 0,05$	$P_{2-4} < 0,05$	$P_{2-4} < 0,05$

Note: n – is amount of animals.

Table 2. The maintenance of NO₂⁻ in periodontium tissues and salivary glands of rats at long-term usage of PPI and correction by «Symbiter Acidophilic» (M±m)

Groups of animals	Contents of NO ₂ ⁻ in soft periodontium tissues, mmol/g	Contents of NO ₂ ⁻ in bone periodontium tissues, mmol/g	Contents of NO ₂ ⁻ in salivary glands, mmol/g
1. Control (n=12)	0,062 ± 0,012	0,058 ± 0,006	0.164 ± 0.007
2. Omeprazol 28 days (n=17)	0,066 ± 0,010	0,069 ± 0,005	0.194 ± 0.006
3. Omeprazol + Symbiter 28 days (n=8)	0,198 ± 0,023	0,144 ± 0,015	0,198 ± 0,003
4. Symbiter 28 days (n=5)	0,113 ± 0,020	0,109 ± 0,020	0,164 ± 0,004
Statistical index	P ₁₋₂ >0,05	P ₁₋₂ >0,05	P ₁₋₂ <0,05
	P ₁₋₄ <0,05	P ₁₋₄ <0,05	P ₁₋₄ >0,05
	P ₁₋₃ <0,05	P ₁₋₃ <0,05	P ₁₋₃ <0,05
	P ₂₋₃ <0,05	P ₂₋₃ <0,05	P ₂₋₃ <0,05
	P ₂₋₄ <0,05	P ₂₋₄ <0,05	P ₂₋₄ <0,05

Note: n – is amount of animals.

nitrites in bone periodontium tissues reliable grows 1,58 times compared with animals, which during this time obtained only PPI (tabl. 2). In salivary glands at omeprazole-induced hypergastrinemia the maintenance of NO₂⁻ increased 1,18 times (p<0.05), and at conditions of correction by multiprobiotic “Symbiter Acidophilic” the maintenance of nitrites had not significant changes.

Consequently, the administration to the rats multiprobiotic “Symbiter Acidophilic” at long-term omeprazole-induced hypoacidity promotes the normalization of bloodstream and local regulatory processes in periodontium tissues and salivary glands.

The universal mechanism of tissues damage under the action of different factors is activating of free-radical oxidation (FRO) [14, 15], the indicator of which is determination of OMP maintenance [16]. Activation of FRO processes results in the increase of MMM maintenance and causes endogenous intoxication. Endotoxemia of different genesis causes the increase of MMM concentration and the level of MMM correlates with a severeness of disease [17]. Among the sources of intoxication the basic attention is related to the hearths of inflammatory destruction, ischemised tissues, areas of pathogenic micro-

flora vegetation in organism [18, 19].

Analysing the maintenance of OMP in soft periodontium tissues is marked there significant decrease 2,9 times at the omeprazole administration at the same time with «Symbiter Acidophilic» on the 28th day of experiment compared with animals without correction (tabl. 3). The reliable decrease of OMP maintenance 4 times is marked in periodontium tissues of rats which obtained «Symbiter Acidophilic» for 28 days in comparing to those which obtained omeprazole for 28 days (P<0,05) (tabl. 3). From the table 3 is evidently, that maintenance of the oxidative-modified proteins in the salivary glands of rats [20] at conditions of omeprazole-induced hypergastrinemia on the 28th day of omeprazole introduction was increased 1,33 times (P<0.05) compared with control, and the usage of multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» caused the reliable decrease of OMP maintenance of OMP in salivary glands tissues compared to rats without correction.

On 28th day of experiment the maintenance of MMM is increased 1,06 times (P<0,05) in periodontium tissues of rats which obtained omeprazole for 28 days comparing to the control group, while for animals, who obtained only «Symbiter Acidophilic» during this time

Table 3. Maintenance of OMP in periodontium tissues and salivary glands of rats at long-term usage of PPI and correction by «Symbiter Acidophilic» (M±m)

Groups of animals	Contents of OMP in soft periodontium tissues, c.u.	Contents of OMP in salivary glands, c.u.
1. Control (n=12)	0,059 ± 0,008	0,363 ± 0,026
2. Omeprazol 28 days (n=17)	0,211 ± 0,007	0,484 ± 0,023
3. Omeprazol + Symbiter 28 days (n=8)	0,072 ± 0,006	0,449 ± 0,012
4. Symbiter 28 days (n=5)	0,053 ± 0,005	0,338 ± 0,017
Statistical index	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Note: n – is amount of animals.

its reliable decrease 1,14 times compared to rats without correction (tabl. 4). Contents of MMM in the salivary glands of rats at 28-daily omeprazole application increased 1,32 times ($P < 0,05$) compared with control. Analyzing the maintenance of MMM in tissues of rats salivary glands [21] at the usage of multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» is reliable decrease of its content compared to animals without correction (tabl. 4).

Thus, application of multiprobiotic «Symbiter Acidophilic» inhibits the processes of FRO and reduces the endotoxemic effect of long omeprazole administration in periodontium tissues and salivary glands.

Thus, the experimental efficiency of probio-

tics therapy at long-term hypoacidity is proved on the basis of endotelial dysfunction normalization, inhibition of free-radical oxidation processes and warning of endotoxemia development, due to decrease of MMM maintenance in periodontium tissues and salivary glands.

А.М. Манько, К.С. Непорада, А.А. Сухомлин, Дж. Гасемзаде, Т.В. Берегова, Д.С. Янковський

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА КОРЕКЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ЗМІН В РОТОВІЙ ПОРОЖНИНІ В УМОВАХ ТРИВАЛОГО ГІПОАЦИДИТЕТУ МУЛЬТИПРОБІОТИКОМ «СИМБІТЕР АЦИДОФІЛЬНИЙ»

З часом зниження шлункової секреції призводить до розвитку гіпергастринемії, дисбіозу та патологічних змін в

Table 4. The maintenance of MMM in periodontium tissues and salivary glands of rats at long-term usage of PPI and correction by «Symbiter Acidophilic» (M±m)

Groups of animals	Contents of MMM in periodontium tissues, c.u.	Contents of MMM in salivary glands, c.u.
1. Control (n=12)	0,174 ± 0,002	0,243 ± 0,016
2. Omeprazol 28 days (n=17)	0,185 ± 0,004	0,321 ± 0,024
3. Omeprazol + Symbiter 28 days (n=8)	0,175 ± 0,001	0,290 ± 0,012
4. Symbiter 28 days (n=5)	0,163 ± 0,002	0,228 ± 0,009
Statistical index	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Note: n – is amount of animals.

органах травної системи. Важливим є пошук корекції цих змін. Довготривале застосування омепразолу спричинює метаболічні порушення в тканинах пародонта та слинних залоз, а саме: розвиток дисбалансу NO-ергічної системи та активація вільно-радикальних процесів, які позитивно корегуються мультипробиотиком нового покоління «Симбітер ацидофільний».

Ключові слова: періодонт, слинні залози, омепразол, гіпоацидитет, гіпергастринемія, дисбіоз, «симбітер ацидофільний».

Манько А.Н., Непорада К.С., Сухомлин А.А., Гасемзаде Дж., Береговая Т.В., Янковский Д.С.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГИПОАЦИДИТЕТЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКОМ «СИМБИТЕР АЦИДОФИЛЬНЫЙ»

Со временем снижение желудочной секреции приводит к развитию гипергастринемии, дисбиозу и патологическим изменениям в органах пищеварительной системы. Важным есть поиск коррекции этих изменений. Длительное применение омепразола приводит к таким метаболическим нарушениям в тканях пародонта и слюнных железах, как развитие дисбаланса NO-эргической системы и активация свободно-радикальных процессов, которые позитивно коррегируются мультипробиотиком нового поколения «Симбитер ацидофильный».

Ключевые слова: пародонт, слюнные железы, омепразол, гипоацидитет, гипергастринемия, дисбиоз, «Симбитер ацидофильный».

REFERENCES

1. Yankovskiy DS. Microbial ecology of human. Modern abilities of its keeping and restoration. Kyiv: Expert LTD; 2005 [Ukrainian].
2. Berejnoj VV, Kramarev SA. Microecological violation in children and modern abilities of increase their correction effectivity. Woman Health. 2002; 4: 79-92.
3. Mercenier A. Probiotics as biotherapeutic agent: present knowledge and future prospects. Curr. Pharm. Des 2003; 9:175-91.

4. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical application. Eur. J. Pharmaceutical Sci. 2002; 1:1-9.
5. Manko AM, Sukhomlyn AA. Correction by multiprobiotic «Symbiter acidophilic» of oxidative stress in oral cavity organs during long-term application of proton pump inhibitors. Actual problems of modern medicine: Visnyk UMSA. 2011; 2 (34):59-61 [Ukrainian].
6. Yankovskiy DS, Berejnoj VV, Dymet GS. Biological peculiarities of propiono-acidic bacteria that are used in the content of multiprobiotics «Symbiter» group. Modern pediatria. 2004; 4:161-7 [Ukrainian].
7. Hevel IM. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase. J. Biol. Chem. 1991; 34: 22789-91.
8. Dubinina EE, Burmistrov SO. Oxidative modification of human blood serum proteins. The method of its determination. Questions of medical chemistry. 1995; 1: 24-6.
9. Gabrielyan NI, Lypatova VI. The experience of MMM usage in blood for diagnostics of nephrological diseases in children. Laboratory Business. 1983; 3: 131-140.
10. Thompson JC, Marx M. Gastrointestinal hormones. Curr. Probl. Surg., 1984; 6: 1-80.
11. Garthwaite J. Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Amsterdam: Excerpta medica; 1990.
12. Reutov VP, Sorokina EG, Okhotin VE, Kosycyn NS. Cyclic transformations of nitrogen oxide in the body of mammals. M.: Science; 1998 [Russian].
13. Povoroznyuk VV, Mazur IP. Bone system and periodontal diseases. Kyiv: Express; 2004 [Ukrainian].
14. Putilina PE. Free-radical oxidation. SPb; 2008.
15. Velychkovskiy BT. Free-radical oxidation as a link of urgent and long-term organism adaptation to the environmental factors. RAMS. 2001; 6: 45-52. [Ukrainian].
16. Armstrong D. Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. New Jersey: Humana Press Inc; 2002.
17. Gromashevskaya LL. «Middle molecules» as one of the metabolic intoxication index in the body. Laboratory diagnostics. 1997; 1: 11-16.
18. Tarasenko LM, Neporada KS. Biochemistry of oral cavity organs. Poltava; 2008 [Ukrainian].
19. Usenko LV, Malceva LA. Endotoxycosis: modern view of the problem. Art of treatment. 2000; 1: 13-15 [Ukrainian].
20. Tarasenko LM, Sukhanova GA, Mischenko VP, Neporada KS. Salivary glands (biochemistry, physiology, clinical aspects). Tomsk: NTL; 2002 [Ukrainian].
21. Denisov AB, Leontjev VK, Petrovich UA. Typical form of salivary glands pathology. M.: RUSSO; 1996.

Received 15/05.2014

Н.Ф. Величко

Особливості гормонально-метаболічних змін у дорослих самців щурів за умов емоційного стресу під час молочного вигодовування

ДУ «Ін-т проблем ендокрин. патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків;
E-mail: aureamediocritas@inbox.ru

Досліджено особливості протеїнового, ліпідного обміну та концентрації статевих гормонів у дорослих самців щурів внаслідок дії емоційного стресу в період молочного вигодовування. Виявлено, що стрес у цей період діє за типом імпринтингу, внаслідок чого у дослідних тварин вміст статевих гормонів і метаболічні процеси, які мають чіткі статеві особливості, стають подібними до показників інтактних самиць. У стресованих самців концентрація тестостерону ($6,78 \pm 0,44$ нмоль/л), тригліцеридів ($2,0 \pm 0,04$ ммоль/л), загального протеїну ($150,30 \pm 3,8$ мг/мл) у сироватці крові подібна до значень цих показників у інтактних самиць – $5,6 \pm 0,30$ нмоль/л; $2,1 \pm 0,1$ ммоль/л; $160,91 \pm 5,1$ мг/мл відповідно. У печінці цих тварин вміст тестостерону ($1,06 \pm 0,01$ нмоль/л), загального протеїну ($261,30 \pm 6,33$ мг/г), активність аланінамінотрансферази ($1,08 \pm 0,05$ мкмоль · год⁻¹ · мг⁻¹ протеїну) також не відрізнялися від значення цих показників у самиць – $1,09 \pm 0,05$ нмоль/л; $253,73 \pm 5,15$ мг/г; $1,05 \pm 0,03$ мкмоль · год⁻¹ · мг⁻¹ протеїну відповідно. Знайдено зміни у розподілі амінокислоти аргінін у крові та печінці і суттєве зростання вмісту оксиду азоту. Так, у інтактних самців концентрація оксиду азоту в сироватці крові становила $0,14 \pm 0,01$ мкмоль/л, у стресованих самців – $0,61 \pm 0,01$ мкмоль/л. Таким чином, у дорослих самців щурів внаслідок дії стресу в період молочного вигодовування спостерігаються істотні зміни концентрації статевих гормонів, порушення білкового та ліпідного обміну. Також відмінний від фізіологічного вміст амінокислоти аргінін, якій притаманні антиоксидантні властивості, та високий вміст оксиду азоту (вільного радикала) є ознакою розвитку хронічного оксидативного стресу – фундаменту пошкодження судинного тонуусу, а це може бути ініціюючим кроком у патогенезі чоловічого безпліддя.

Ключові слова: емоційний стрес, період молочного вигодовування, протеїновий обмін, ліпідний обмін, статеві гормони, дорослі самці щурів.

ВСТУП

Частота чоловічого безпліддя за різними даними коливається від 30 до 50 %, з яких у близько 32 % випадків констатується ідіопатична форма [1]. Етіологія погіршення сперматогенезу до кінця не відома. Однак встановлено, що майже 42–46 % патологічних станів, які формують копулятивні та репродуктивні патології чоловіків, починаються на ранніх етапах онтогенезу, коли в організмі відбуваються морфофункціональні зміни основних його систем і формування регуляторних механізмів. Різноманітні

чинники довкілля в так звані критичні періоди впродовж раннього онтогенезу, зокрема материнський стрес, здатні суттєво впливати на статевий розвиток. Так, у дорослих самців щурів, що зазнали пренатального стресу, відмічаються виражені ушкодження репродуктивної системи, порушення центральних нейромедіаторних механізмів регуляції процесів відтворення, демаскулізація і фемінізація статевої поведінки [2, 3].

Проте для розвитку організму ссавців важливий і період молочного вигодовування,

© Н.Ф. Величко

який є надзвичайно чутливим до дії несприятливих чинників і стресу зокрема. Адже зміна гормонального статусу в цей час може призвести до порушень дозрівання систем нейрогуморальної регуляції, віддалені наслідки якої на становлення репродуктивної системи вивчені недостатньо.

Сучасні уявлення про механізми становлення статі у ссавців базуються на його первинній генетичній детермінації та подальшому формуванні специфічного статевого фенотипу під впливом гормональних факторів [4]. Однак у забезпеченні та прояві статевого диморфізму беруть участь не тільки органи розмноження та відповідний склад гормонів, а ще й інтегративні органи, до яких належить печінка [5, 6]. Встановлено чітко залежний від статі характер перебігу різноманітних реакцій у клітинах цього органа [7]. Значна частина метаболізму ліпідів відбувається саме в печінці. Також гепатоцити є головними протеїнсинтезувальними системами та продуцентами гормонів, зв'язувальних транспортних ензимів. У гепатоцитах відбувається детоксикація продуктів метаболізму протеїнів. Провідна роль у цьому процесі належить амінокислоті аргінін, з якою пов'язана складна система метаболічних шляхів. Ензиматичне розщеплення аргініну алостеричним ензимом аргіназою в печінці призводить до утворення сечовини, котра є маркером обміну протеїнів.

Відомо, що внаслідок дії стресу підвищується вміст вільних радикалів та розвивається оксидативний стрес. Вільним радикалом є оксид азоту (NO), який утворюється при окисненні L-аргініну НАДФН-залежними NO-синтазами (NOS). NO є міжклітинним посередником, фізіологічні концентрації якого задіяні у процесах запліднення. Однак його підвищення внаслідок дії стресу призводить до розвитку нітрозативного стресу.

Дані багатьох досліджень доводять тісний зв'язок між оксидативним стресом і розвитком ендотеліальної дисфункції [8], яка є ініціюючим кроком у патогенезі різноманітних захворювань. Ендотеліальна дисфункція

супроводжується пошкодженням судинного тонусу та метаболічної функції ендотелію. Це, у свою чергу, негативно позначається на функціонуванні багатьох систем організму, в тому числі й репродуктивній.

Достеменно невідомо яким чином такі патофізіологічні зміни в критичні періоди онтогенезу (період молочного вигодовування) впливають на статеву диференціацію, гормонально-метаболічні процеси та, зрештою, на стан репродуктивної системи у дорослих особин. Базуючись на медико-біологічній та соціальній значущості проблеми детермінації статі та її формування, вивчення молекулярних і фізіологічних закономірностей цих процесів у особин чоловічої статі, що є найбільш чутливими до дії зовнішніх чинників, може виявитися корисним для виявлення причин і попередження можливих статевих порушень.

Метою нашої роботи було визначення характеру імпринтингових наслідків емоційного стресу в період молочного вигодовування за гормональними показниками та станом протеїнового, ліпідного обміну в сироватці крові та гомогенаті печінки дорослих щурів-самців.

МЕТОДИКА

Експеримент проводили відповідно до національних «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах» [9]. Інтактні самиці були запліднені інтактними щурами-самцями лінії Вістар. За 2-3 доби до пологів вагітні самиці були рандомізовані на дві групи – інтактні та стресовані. Після пологів у групі стресованих самиць з 3-ї по 15-ту добу життя був відтворений емоційний стрес нащадків і матері за моделлю «clean bedding» та «maternal separation stress». Для цього щурят викладали поодиночі на чисту підстилку. Одночасно самиць поміщали у пусту клітку, де перед цим знаходилися самці (експозиція до запаху «чужого» самця) [10]. Тривалість таких маніпуляцій як для щурят, так і для матері становила 15 хв.

На 30-ту добу життя нащадки були відсаджено від матері. Нашадків-щурів було поділено на 3 групи по 12 тварин: до 1-ї ввійшли інтактні самиці інтактних матерів (контроль 1), до 2-ї – інтактні самці інтактних матерів (контроль 2), до 3-ї – стресовані нащадки-самці стресованих матерів. У віці 10 міс тварин швидко декапітували [11]. У сироватці крові щурів та 10%-му гомогенаті печінки, який готували у розчині хлориду натрію концентрацією 9 г/л, визначали біохімічні показники: загальний протеїн, сечовина, активність ензимів аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ), вільний аргінін, оксид азоту (NO), загальний холестерин (ЗХС), тригліцериди, холестерин ліпопротеїдів високої щільності (ХС ЛПВЩ), загальний тестостерон, естрадіол. Отримані результати наведено у перерахунку на 1 г сирової тканини.

Концентрацію загального протеїну визначали методом Лоурі в модифікації Міллера [12, 13], вільний аргінін – за реакцією взаємодії аргініну гідрохлориду з спиртовим розчином α -нафтолу та гіпобромним реактивом [14]; оксид азоту – за сумарним вмістом стабільних метаболітів циклу азоту (NOx) (нітрит- та нітрат-аніонів) при взаємодії NOx з реактивом Грісса [15]. Концентрацію тригліцеридів, ЗХС, ХСЛПВЩ, сечовини, активність АЛТ та АСТ визначали комерційними наборами фірми «СпайнЛаб» та ТОВ НВП «Філісіт-Діагностик» (Україна). Концентрацію загального тестостерону та естрадіолу досліджували імуноферментними тест-наборами фірми «Хема» (Росія). Для визначення вмісту гормонів у тканинах печінки робили подвійну спирт-ефірну екстракцію гомогенату та отримували сухий осад, який розчиняли в фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4).

Зважаючи на нормальний характер розподілу у вибірках, результати представлені як середнє арифметичне ($\bar{x}$) та його похибка ($\pm S \bar{x}$), оцінку достовірності відмінностей між групами проводили з використанням критерію t Стюдента. Розходження вважали статистично значущими при $P \leq 0,05$ [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашому експерименті дія емоційного стресу в період молочного вигодовування призвела до значних змін гормонально-метаболических показників у дорослих дослідних самців щурів 3-ї групи. Концентрація естрадіолу в крові тварин становила $35,72 \pm 1,90$ пмоль/л – майже в 1,5 раза вище, ніж у контрольній групі самців ($24,20 \pm 0,58$ пмоль/л), але в 1,8 раза нижче, ніж у контрольній групі самиць у стадії дієструс ($64,59 \pm 1,76$ пмоль/л; $P \leq 0,05$). Слід відмітити, що за даними попереднього дослідження у стресованих щурів віком 6 міс цей показник не відрізнявся від контролю [17]. У групі контрольних самців вміст естрадіолу був втричі меншим, ніж у контрольних самиць. У печінці концентрація естрадіолу в 3-й групі становила $0,13 \pm 0,01$ пмоль/л, що в 1,5 раза менше порівняно з контрольною групою самців, а з групою контрольних самиць – майже в 3 рази: $0,20 \pm 0,003$ та $0,36 \pm 0,011$ пмоль/л відповідно ($P \leq 0,05$).

Відомо, що естрогени здатні посилювати активність ліполізу в жировій тканині, що призводить до підвищення в крові вмісту тригліцеридів [18]. У нашому дослідженні було виявлено, що у щурів 3-ї групи цей показник став майже вдвічі вищим у порівнянні з групою контрольних самців, а з контрольними самицями різниці не виявлено (рис. 1,а). Так само вміст тригліцеридів у печінці тварин 3-ї групи перевищував на 50 % цей показник у групі контрольних самців, але був статистично достовірно меншим, ніж у групі контрольних самиць (на 26 %, див. рис. 1,б). У сироватці крові та печінці в контрольних групах щурів спостерігається чітка пряма залежність між концентрацією естрадіолу та тригліцеридів [11]. У печінці стресованих щурів ця залежність порушується, оскільки підвищення вмісту тригліцеридів відбувається на тлі низького вмісту естрадіолу, що, можливо, пов'язано з активацією синтезу тригліцеридів у печінці *de novo*.

Вміст ЗХС у сироватці крові у стресо-

ваних щурів менший на 24 % у порівнянні з групою контрольних самців ($P \leq 0,05$). Це, можливо, пояснюється посиленням процесів β -окиснення жирних кислот і підвищеною активністю ензимів глюконеогенезу під впливом глюкокортикоїдів внаслідок дії не-

онатального стресу, адже вміст холестерину в печінці, де синтезується переважна його кількість, у дослідних тварин залишився на рівні інтактних щурів-самців (див. рис. 1,б).

Також естрогени підвищують перетворення ліпопротеїдів дуже низької щільності

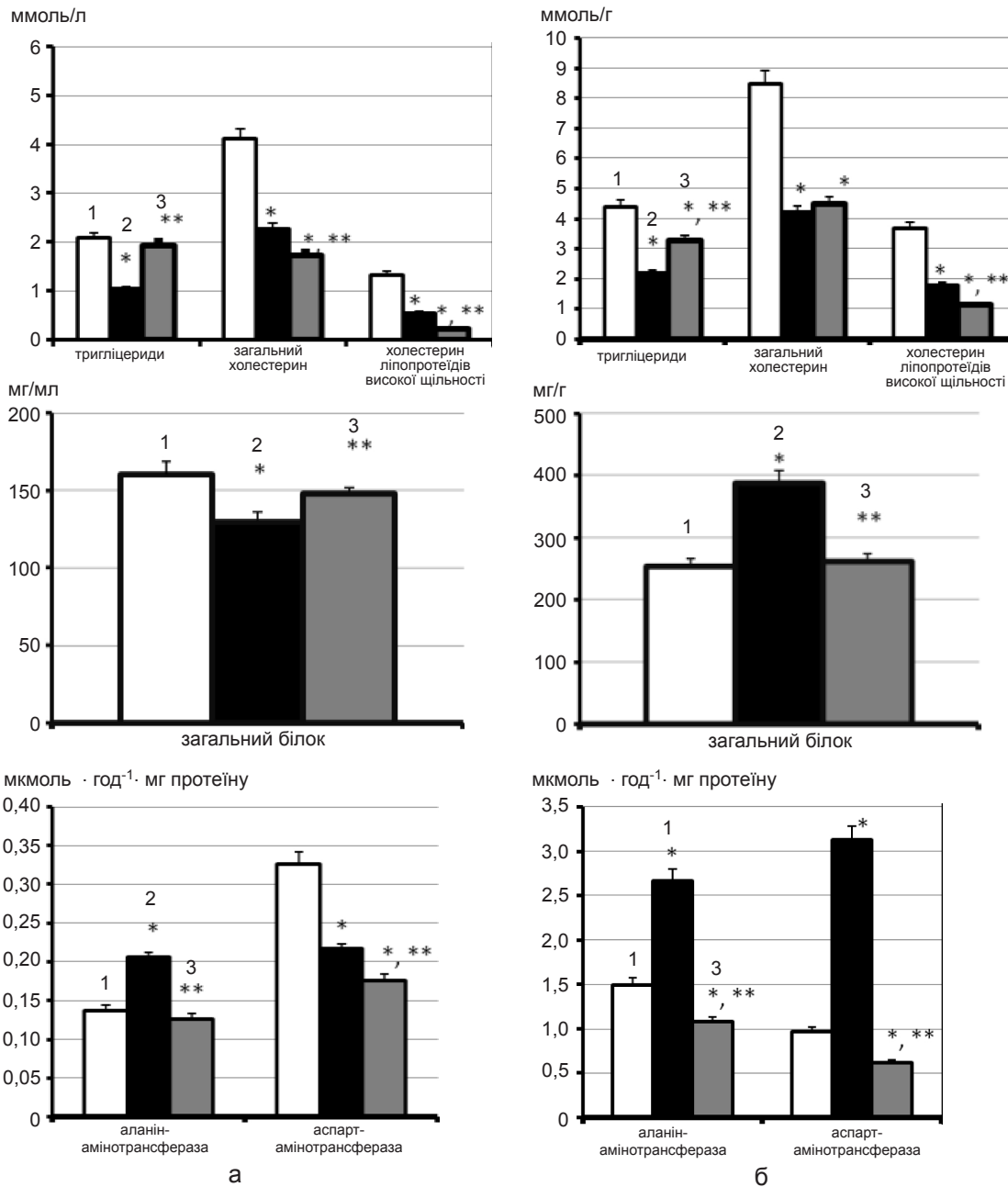


Рис. 1. Біохімічні показники ліпідного та білкового обміну крові (а) й печінки (б) контрольних і дослідних щурів: 1 – самці контрольної групи, 2 – самці контрольної групи; 3 – група стресованих самців. * статистично значущі відмінності відносно самців контрольної групи ($P \leq 0,05$); ** статистично значущі відмінності відносно самців контрольної групи ($P \leq 0,05$)

(ЛПДНЩ) у ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ), що призводить до пригнічення активності постгепаринової ліпопротеїдліпази та активації ліцетин-холестерин-ацилтрансферази і підвищення вмісту ЛПВЩ у печінці. Це пояснює те, що у групі контрольних самців вміст ХСЛПВЩ у сироватці крові та печінці у 2 рази менший, ніж у контрольних самиць. Однак у стресованих самців, які відрізняються гіперестрогенією (в крові), вміст ХСЛПВЩ у сироватці крові та печінці менший на 62 та 37% відповідно (див. рис. 1,а,б), що, можливо, пов'язано з паралельним зменшенням холестерину в сироватці крові. Адже основною позитивною функцією ЛПВЩ є забезпечення зворотного транспорту холестерину у периферичні тканини та печінку для подальшого катаболізму.

Значення показників ліпідного обміну залежить від концентрації естрадіолу та андрогенів. Відомо, що останні пригнічують синтез холестерину в печінці та змінюють швидкість його окиснення фракції мітохондрій. Ця регуляція може здійснюватись як на стадії його синтезу, так і катаболізму. Андрогени здатні блокувати активність ключового ензиму пентозного циклу – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, що призводить до зменшення утворення відновленої форми НАДФ·Н₂, яка використовується для синтезу тригліцеридів, холестерину та сечової кислоти й зменшенню їх вмісту в крові [19]. Визначення концентрації тригліцеридів, ЗХС і ХС ЛПВЩ у сироватці крові та печінці показало, що їх значення у групі контрольних самців в 2 рази менші, ніж контрольних самиць, що пояснюється відповідним складом статевих гормонів (див. рис. 1,а,б) і узгоджується з даними літератури [7, 11].

Слід відмітити, що концентрація тестостерону в сироватці крові у групі контрольних самців вище, ніж у контрольних самиць майже у 3,4 раза: $18,90 \pm 1,16$ щодо $5,6 \pm 0,30$ нмоль/л, а в печінці – вдвічі: $2,22 \pm 0,21$ щодо $1,06 \pm 0,01$ нмоль/л відповідно ($P \leq 0,05$). Стресовані тварини 3-ї групи відрізнялися зниженим вмістом тестостерону, який

становив $6,78 \pm 0,44$ нмоль/л, що було майже втричі менше у порівнянні з групою контрольних самців. Тобто самці 3-ї групи за цим показником не відрізнялися від контрольних самиць: $5,6 \pm 0,30$ щодо $6,78 \pm 0,44$ нмоль/л ($P \leq 0,05$). Такі гормональні зміни у стресованих самців скоріше за все пов'язані зі зменшенням синтезу тестостерону у сім'яниках і підвищенням активності ароматази у надниркових залозах і жировій тканині – основних постачальників естрогенів у чоловічому організмі. Адже вміст естрогенів у цих тварин у крові збільшився (див. вище). Варто також зазначити, що у молодшому віці (6 міс) у стресованих щурів гіпоандрогенія не відмічалася [17]. Це є першою ознакою зсуву метаболічних процесів стресованих самців у бік фемінізації з віком.

У печінці концентрація тестостерону у дослідних тварин 3-ї групи була в 2 рази меншою у порівнянні з контрольними самцями та стала такою, як у контрольних самиць: $1,09 \pm 0,05$; $2,22 \pm 0,21$; $1,06 \pm 0,01$ нмоль/л відповідно ($P \leq 0,05$). Оскільки гепатоцити мають на своїй поверхні рецептори до статевих гормонів, можна зробити припущення, що зменшення концентрації тестостерону та підвищення естрадіолу в дослідній групі пов'язано зі зміною кількості та активності відповідних рецепторів у цьому органі внаслідок імпринтингової дії стресу. Адже відомо, що підвищений вміст глюкокортикоїдів здатен посилювати дію естрогенів, активуючи їхні рецептори, окремі ділянки яких гомологічні за своєю будовою з кортикостероїдними рецепторами.

Біологічний ефект гормонів здійснюється через їх взаємодію із відповідними цитоплазматичними рецепторами, після чого цей комплекс надходить в ядро клітини. Активація відповідних структур хроматину посилює синтез протеїнів та змінює функціональний стан органа-мішені, що відображається на його біохімічних показниках.

Так, вміст загального протеїну у стресованих самців у крові та печінці був подібним

до значень у групі контрольних самиць і більшим, ніж у контрольних самців на 14 % у сироватці крові ($P \leq 0,05$) та меншим на 33 % у печінці ($P \leq 0,05$; див. рис. 1,а,б). Зміна концентрації загального протеїну найімовірніше пов'язана з гормональним зсувом вмісту тестостерону та естрадіолу в бік фемінізації (див. вище) та, як наслідок, дефіцитом тестостерону у дослідних самців 3-ї групи. Адже відомо, що в чоловічому організмі він має анаболічні властивості та посилює протеїновий синтез у печінці, а при його недостатності ці ефекти пригнічуються.

На порушення протеїнового синтезу вказують зміни активності таких трансфераз, як АЛТ та АСТ. Відомо, що вони беруть участь у міжмолекулярному перенесенні аміногруп (трансамінування) в печінці з утворенням відповідних α -кислот, які, у свою чергу є компонентами циклу трикарбонових кислот та беруть активну участь у біосинтезі протеїнів. У нашому дослідженні було показано, що у групі контрольних самців активність АЛТ у сироватці крові вище на 35 %, в гомогенаті печінки – на 44 %; активність АСТ у сироватці крові нижча на 33 %, а в гомогенаті печінки вища на 70 % порівняно з групою контрольних самиць (див. рис. 1,а,б). Знайдені статеві відмінності у щурів за активністю АЛТ узгоджуються з даними літератури [7], тоді як така диференціація активності АСТ – показана вперше.

Стрес у період молочного вигодовування у дорослих самців виявив імпринтинговий ефект, внаслідок чого активність АЛТ у сироватці крові була майже на 40 % меншою порівняно з групою контрольних самців та більш подібною до значень контрольних самиць (див. рис. 1,а). У печінці стресованих самців цей показник також менше майже на 60 % у порівнянні з групою контрольних самців та на 30 % - контрольними самицями (див. рис. 1,б). Активність трансферази АСТ у дослідних самців 3-ї групи у сироватці крові також зменшилася: відносно групи контрольних самців - майже на 24 % і на 46 % щодо

контрольних самиць (див. рис. 1,а). У печінці активність АСТ у стресованих самців була меншою на 80 %, ніж у групі контрольних самців і стала більш подібною до активності ензиму групи контрольних самиць, але достовірно меншою на 37 % (див. рис. 1,б).

Ще одним показником протеїнового обміну є сечовина. Виявлено, що у групі контрольних самців її вміст у сироватці крові вищий на 35 %, а в гомогенаті печінки - нижчий на 34 %, ніж у групі контрольних самиць (рис. 2,а,б). У стресованих тварин концентрація сечовини як в сироватці крові, так і в печінці залишилася на рівні значень контрольних самців (див. рис. 2,а,б). Можливо, це пов'язано з активацією компенсаторних і адаптивних механізмів оптимізації швидкості виведення азотистих продуктів розпаду протеїнів та, як наслідок, попередженням інтоксикації, оскільки вміст протеїнів у сироватці крові та печінці у стресованих самців суттєво відрізняється від значень контрольних-самців (див. рис. 1,а,б).

Попередником утворення сечовини є амінокислота аргінін, яка безпосередньо бере активну участь у протеїновому обміні. У групі контрольних самців вміст вільного аргініну в сироватці крові вищий на 14 %, а в печінці нижчий на 44 %, ніж у групі контрольних самиць, що, найбільш імовірно, пов'язано з гендерними особливостями перерозподілу цієї амінокислоти на метаболічні потреби. У стресованих тварин вміст вільного аргініну зменшився в сироватці крові на 60 %, а в печінці - майже на 44 % в порівнянні з показниками контрольних самців (див. рис. 2,а,б). Така зміна концентрації аргініну у дослідних тварин 3-ї групи може свідчити про посилення експресії відповідних генів ензимів NOS з утворенням NO, оскільки вміст сечовини як в сироватці крові, так і в печінці, залишився на рівні контролю (див. рис. 1,а,б). Це припущення підтверджується тим, що при дослідженні концентрації NO у стресованих самців було виявлено статистично достовірне його підвищення в сироватці крові в 4,4 раза, а в

печінці – в 1,5 раза в порівнянні зі значеннями контрольних самців (див. рис. 2, а,б).

Слід зазначити, що за даними літератури статеві відмінності вмісту NO у сироватці крові суперечливі. Так, Zhang, Shu [20] показали, що цей показник у осіб чоловічої статі вищий, ніж у жінок. Однак за даними

Мажитової, вміст NO у самців щурів є меншим у порівнянні з самицями [8]. У нашому дослідженні було показано, що концентрація NO в сироватці крові у групі контрольних самців в 16 разів менша, ніж у контрольних самиць, що можливо пов'язано з особливостями метаболічних процесів і відповідним

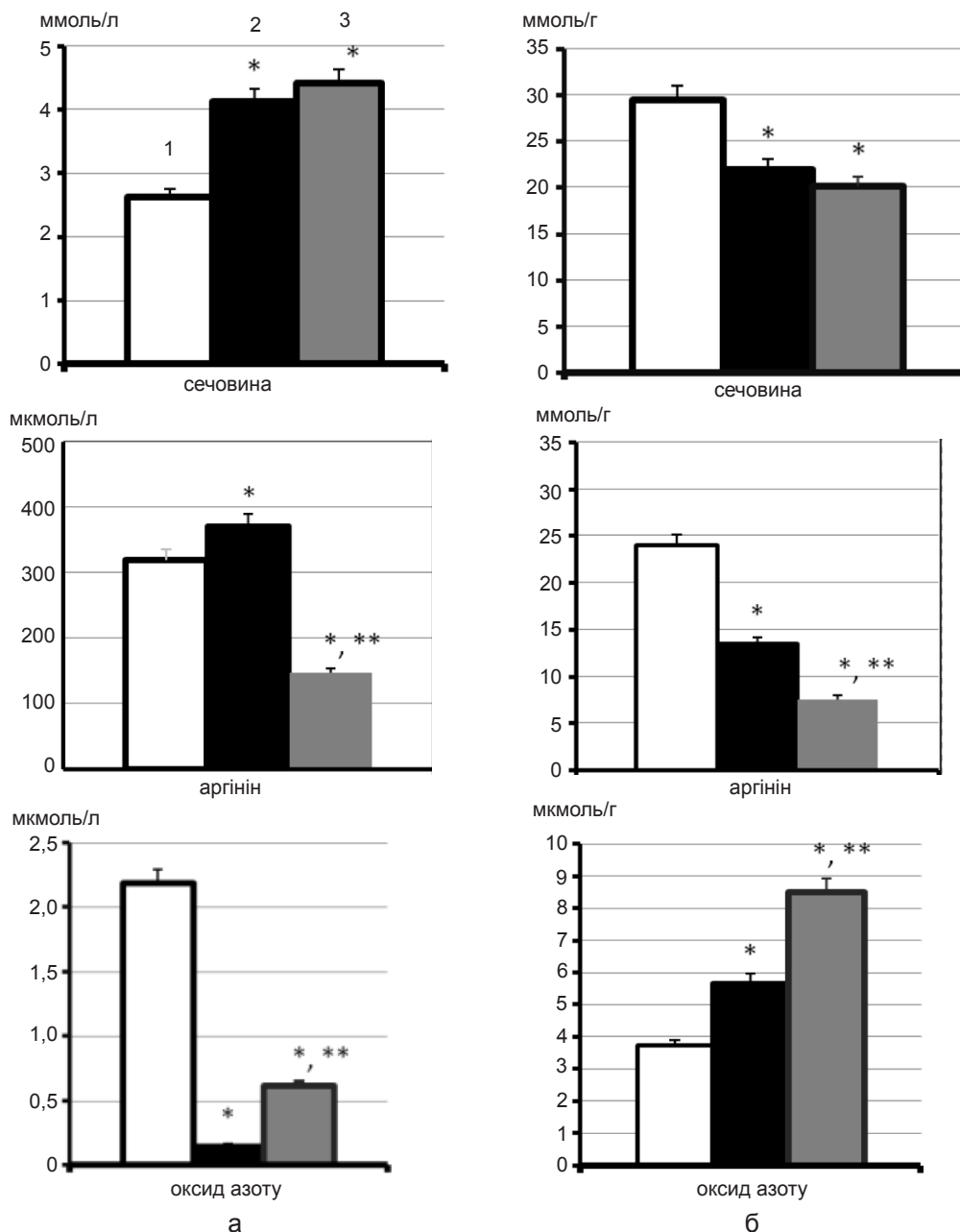


Рис. 2. Концентрація сечовини, аргініну, оксиду азоту в крові (а) та печінки (б) контрольних і дослідних щурів: 1 – самиці контрольної групи, 2 – самці контрольної групи; 3 – група стресованих самців. * статистично значущі відмінності відносно самиць контрольної групи ($P \leq 0,05$); ** статистично значущі відмінності відносно самців контрольної групи ($P \leq 0,05$)

складом гормонів (див. рис. 2,а). У печінці тварин контрольних самців концентрація NO на 35 % вища, ніж у групі контрольних самиць (див. рис. 2,б). Можливо, такий характер перерозподілу NO в печінці пов'язаний із взаємною конкуренцією ензиму аргінази й NOS за субстрат аргінін як попередника утворення оксиду азоту і сечовини та, як наслідок, меншим вмістом сечовини в цьому органі у самців (див. рис. 2,б).

Як показали наші попередні дослідження [17], у стресованих щурят на 22-гу добу життя (через 9 діб після закінчення стресування) відповіді незрілої адреналової системи на дію стресу (за вмістом кортикостерону в сироватці крові) не було, що узгоджується з даними літератури [22]. Водночас у дорослих тварин у стані спокою концентрація кортикостерону перевищувала контрольні значення ($321,8 \pm 5,2$ щодо $246,9 \pm 7,6$ нмоль/л).

Наразі відомо, що статеві диференціації охоплює не тільки органи самої статеві сфери, але й увесь організм в цілому. Це визначає нейроендокринні механізми регуляції статевих розмноження і координацію метаболічних процесів, які зберігають свою направленість впродовж тривалого часу. Однак ці процеси можуть бути порушені внаслідок дії такого розповсюдженого фактора, як стрес.

Механізми реалізації дії стресових чинників, особливо слабкої інтенсивності, на організм нащадків під час молочного вигодовування ще остаточно не вивчені. Проте відомо, що внаслідок стресування у матері відбуваються зміни на центральному та периферичному нейрогуморальних рівнях, які позначаються на відповідних складових молока і призводять до стресорної гіпогалактиї [23]. Це супроводжується підвищенням вивільненням АКТГ, кортикостерону, норадреналіну, адреналіну і зниженням вмісту тиреоїдних гормонів і пролактину [24], які, у свою чергу, можуть впливати на організм нащадків під час молочного вигодовування. Вважають, що наявність в материнському молоці таких

адаптогенів, як гормони надниркових залоз, АКТГ, β -ендорфін і пролактин носить пристосувальний характер і забезпечує виживаність її нащадків [25]. Однак сильне хронічне стресування матері викликає порушення статевої диференціації мозку нащадків, уповільнення росту [26], настання статевої зрілості, зниження фертильності [27].

Таким чином, емоційний стрес у період молочного вигодовування має імпринтингові наслідки. У стресованих дорослих самців щурів вміст статевих гормонів зсувається в бік фемінізації, що супроводжується суттєвими порушеннями білкового, ліпідного обміну та оксидативного стану. Виявлено, що у стресованих самців концентрація тригліцеридів, загального протеїну, активність ензимів АЛТ і АСТ у сироватці крові та печінці стала подібною до значень інтактних самиць. Також внаслідок дії стресу в період молочного вигодовування у дорослих самців змінився в печінці та крові вміст амінокислоти аргінін, якій притаманні антиоксидантні властивості, та суттєво підвищився вміст NO (вільного радикала), що є ознакою розвитку хронічного оксидативного стресу. Такі метаболічні зміни є фундаментом пошкодження судинного тону-су та розвитку ендотеліальної дисфункції, яка є ініціюючим кроком у патогенезі чоловічого безпліддя.

Н.Ф. Величко

ОСОБЕННОСТИ ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА В ПЕРИОД МОЛОЧНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ

Исследованы особенности протеинового, липидного обмена и концентрации половых гормонов у взрослых самцов крыс вследствие действия эмоционального стресса в период молочного вскармливания. Выведено, что стресс в этот период действует по типу импринтинга, вследствие чего у подопытных животных содержание половых гормонов и процессы метаболизма, которые имеют четкие половые особенности, становятся подобными показателям интактных самок. У стрессированных самцов концентрация тестостерона ($6,78 \pm 0,44$ нмоль/л), триглицеридов

($2,0 \pm 0,04$ ммоль/л), общего протеина ($150,30 \pm 3,8$ мг/мл) в сыворотке крови подобна таковым у интактных самок – $5,6 \pm 0,30$ ммоль/л; $2,1 \pm 0,1$ ммоль/л; $160,91 \pm 5,1$ мг/мл соответственно. В печени подопытных самцов содержание тестостерона ($1,06 \pm 0,01$ нмоль/л), общего протеина ($261,30 \pm 6,33$ мг/г), активность аланинаминотрансферазы ($1,08 \pm 0,05$ мкмоль $\cdot$ ч $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ протеина) тоже не отличались от этих показателей у самок – $1,09 \pm 0,05$ нмоль/л; $253,73 \pm 5,15$ мг/г; $1,05 \pm 0,03$ мкмоль $\cdot$ ч $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ протеина соответственно. Найдены изменения и в распределении аминокислоты аргинин в крови и печени, существенное увеличение содержания оксида азота. Так, у интактных самцов значение этого показателя в сыворотке крови составляло $0,14 \pm 0,01$ мкмоль/л, у стрессированных самцов – $0,61 \pm 0,01$ мкмоль/л. Таким образом, у взрослых самцов крыс вследствие действия стресса в период молочного вскармливания наблюдаются значительные изменения концентрации половых гормонов, нарушение белкового и липидного обмена. Также, отличное от физиологического, содержание аминокислоты аргинин (присущи антиоксидантные свойства) и высокое содержание оксида азота (свободного радикала) является признаком развития хронического оксидативного стресса. Это лежит в основе повреждения сосудистого тонуса и может быть инициирующим шагом в патогенезе мужского бесплодия.

Ключевые слова: эмоциональный стресс, период молочного вскармливания, протеиновый обмен, липидный обмен, половые гормоны, взрослые самцы крыс.

N.F. Velichko

PECULIARITIES HORMONAL METABOLIC CHANGES IN ADULT MALE RATS UNDER EFFECT OF EMOTIONAL STRESS DURING DAIRY FEEDING

The peculiarities of protein, lipid metabolism and sexual hormones concentration in adult male rats due to the impact of emotional stress in period of milk feeding have been studied. It has been revealed that stress in this period functions according to imprinting type that result in feminization of the parameters of sexual hormones contents and metabolic processes, which shows gender features in normal animals and their parameters similar to intact females. The concentrations of testosterone ($6,78 \pm 0,44$ nmol/L), triglycerides ($2,0 \pm 0,04$ mmol/L), total protein ($150,30 \pm 3,8$ mg/mL) in serum of stressed males were similar to intact females – $5,6 \pm 0,30$ nmol/L; $2,1 \pm 0,1$ mmol/L; $160,91 \pm 5,1$ mg/mL respectively. The liver concentration of testosterone ($1,06 \pm 0,01$ nmol/L), total protein ($261,30 \pm 6,33$ mg/mL), activity of alanineaminotransferase ($1,08 \pm 0,05$ μ mol/hour per mg protein) of stressed male also did not differ from those of females indicators – $1,09 \pm 0,05$ nmol/L; $253,73 \pm 5,15$ mg/mL; $1,05 \pm 0,03$ μ mol/hour per mg protein, respectively. The changes of arginine amino acid distribution in blood and liver as well as significant increase of nitric oxide level. Thus, in intact males concentration of nitric

oxide in the serum was $0,14 \pm 0,01$ μ mol/L, in stressed males – $0,61 \pm 0,01$ μ mol/L. Thus, in adult male rats, due to the action of stress in the during dairy feeding, shifting the content of the sex hormones, substantial violation of protein and lipid metabolism. Also different from physiological content of arginine amino acid, which are antyoxidation, and increase in the concentration of nitric oxide (free radical), which in turn is a sign of chronic oxidative stress and damage to the foundation of vascular tone, which may be the initiating step in the pathogenesis of male infertility.

Key words: emotional stress, period of dairy feeding, protein metabolism, lipid metabolism, sex hormones, adult males, rats.

SI “V.Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine”, Kharkiv

REFERENCES

1. Chernykh V B Kurile L F, V. Polyakov A Y-chromosome, AZF-microdeletions and idiopathic male infertility. Reproduct. problems. 2001; 5: 35 – 48.
2. Reznikov A G, Pishak S, Nosenko N D, Tkachuk C C Myslytsky V F Prenatal stress and neuroendocrine pathology. Chernovtsy: Medical Academy; 2004.
3. Tkachuk S S, Pishak V P, Myslytskyy V F Prenatal stress syndrome: manifestations and mechanisms of development. Bukovina. Med Gazette. 1999; 3 (2): 12 – 24.
4. Stanley E L, Johnston D S, Fan J, Papadopoulos V, Chen H, Ge R. S, et al. Stem Leydig cell differentiation: gene expression during development of the adult rat population of Leydig cells. Biol Reprod. 2011 Dec; 85 (6): 1161-6. PubMed PMID: 21832170.
5. Rosen V B, Mataradze G D, Smirnova O V, Smirnov A N Sexual differentsirovka of liver function. Moscow: Medicine; 1991.
6. Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Aug; 289 (2):C372-8. PubMed PMID: 15800054.
7. Zachow R, Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. J Endocrinol. 2007 Dec; 195(3):359-71. PubMed PMID: 18000299.
8. Haistad D D Oxidative stress and vascular disease : 2005 Duff Lecture. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006; Apr; 26 (4): 689-95. PubMed PMID: 16410455.
9. General ethical principles of animal experimentation. Endokrynology. 2003, 8 (1): 142–5.
10. Moles A, Rizzi R, D'Amato F R. Postnatal stress in mice: does “stressing” the mother have the same effect as “stressing” the pups? Dev Psychobiol. 2004 May; 44 (4): 230-7. PubMed PMID: 15103733.
11. Stefanov O V Preclinical studies of drugs. Kyiv: Avicenna; 2001.
12. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R J Protein in

- measurement with a folinphenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193 (1): 265-75. PubMed PMID: 14907713.
13. Miller G. L. Protein determination for large numbers of samples. Anal Chem. 1959; 31: 964-6.
14. Aleinikova T L, Rubtsova G V, Pavlova N A Guide to practical lessons Moscow: Medicine; 2000.
15. Kotsyuruba A V Semykopna T V Victorov O P Method of quantitative determination nitrit anion in biological fluids. Pat. 31600 Ukraine, MPK A6G01N33/52. Bull. № 7, 2000 December 15.
16. Atramentova L O, Utevska O M Statistical methods in biology: a schoolbook. Kharkov: Kharkov National University. V N Karazina; 2007.
17. Karpenko N O, Somova O V, Koreneva Ye M, Chistyakova E Ye, Velichko N F and others. Hormonal changes in adult rats were stressed and / or phytoestrogenized during milk feeding. Endocrinology. 2011 ; 16 (1): 76-82.
18. Cronenberg M, Melmed Sh, Polonsky K S, Larsen P R Endocrinology by Williams. Reproduction endocrinology. Moscow: Reed Elsyver; 2011.
19. Dedov I I, Melnichenko G A, Fadeev V V. Endocrinology. Moscow: Medicine; 2000.
20. Zhang H, Shu L, Cai X, Wang Z, Jiao X, Liu F, et al. Gender and age affect the levels of exhaled nitric oxide in healthy children. Exp Ther Med. 2013 Apr; 5 (4): 1174-8. PubMed PMID: 23596487; PubMed Central PMCID: PMC3628114.
21. Mazhitova M.V., Teply D.D. Change antioxidant status and free radical processes in the blood of white rats after chronic exposure hydrogen sulfide gas. Math. Samara scientific. Ros. center. Acad. Sciences. 2010; 30: 1766–8.
22. Neumann I D, Toschi N, Ohl F, Torner L, Krömer S A Maternal defense as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioral parameters and involvement of brain oxytocin. Eur J Neurosci. 2001 Mar; 13 (5): 1016-24. PubMed PMID: 11264675.
23. Neumann I. D., Torner L., Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. Neuroscience. 2000; 95(2): 567-75. PubMed PMID: 10658637
24. Magdub A. H., Yohnson D., Belyea R. Z Effect of environmental heat and dietary fiber on thyroid physiology of lactating cows. J. Dairy Sci. 1982; Dec; 65(12): 2323-31. PubMed PMID: 6298292.
25. Walker C.D., Deschamps S., Proulx K., Tu M., Salzman C., Woodside B. et al. Mother to infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and implications for humans J. Psychiatry. Neurosci. 2004 Sep; 29(5): 364-82. PubMed Central PMCID: PMC518866.
26. Rzaeva, L V, Ismailov Y B. Education level of growth hormone and prolactin in the pituitary gland and the secretion of milk by the action of neuroleptics. XIII Congress of the Sun Physiol. society of. Pavlova Alma Atayu. Abstracts of papers at symposia, 1979. Alma Atayu. 2010; 1: 384.
27. Aliyev M G, Ragimova Sh. A, Guseykova L M Effect of prolactin deficiency in the milk of lactating rats on the formation of the Reproductive System. IV Sun conf. "The endocrine system of the body and environmental hazards", Sept. 15-19. 1991 Leningrad. 1991; 8.

ДУ «Ін-т проблем ендокрин. патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків
E-mail: aureamediocritas@inbox.ru

Матеріал надійшов
до редакції 02.08.2013

CONTENTS

R.R. Sharipov, A.V. Kotsuruba , B.S. Kopyak, V.F. Sagach. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia–reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone	3
H.S. Maslak, O.V. Kostyuk, D.O. Minchenko, O.Z. Brazaluk, A.I. Shevtsova, O.H. Minchenko. Glicoprotein sialylation and NEU1 and ST6GAL1 expressions in erythremia disease	14
V.I. Portnichenko, V.I. Nosar, O.A. Gonchar, G.V. Apanasenko, I.G. Glazyrin, I.N. Mankovskaya. Phase changes of energy metabolism during adaptation to immobilization stress	23
O.V. Kolomiets, Yu.V. Danylovych, G.V. Danylovych. H^+ – Ca^{2+} -exchanger in the myometrium mitochondria: modulation of exogenous and endogenous compounds	33
K.V. Rozova, N.G. Sydoryak. Mechanisms of changes of microcirculation in rats under acute methemoglobinemia	43
O.V. Bondarenko, N.M. Hula, M.Yu. Makarchuk, T.M. Horid'ko, O.A. Kovalenko. Effects of N-stearoylethanolamine on the emotionality and learning ability of rats	52
L.S. Nasibyan, I.B. Philyppov. Modulation of rat myometrium contractile activity by peptidocyan of Staphylococcus aureus cell wall	62
A.B.Kotliarova, V.M. Merlavs'ky, O.M. Dorosh, V.V. Manko. The role of calcium uniporter in calcium-homeostasis of the exorbital lacrimal gland secretory cells	73
N.M. Shpakova, E.E. Nipot, I.O. Ishchenko, S.V. Prylutska, K.I. Bogutska, V.V. Cherepanov, B.P. Sandomirskiy, Yu.I. Prylutskiy. Effect of C_{60} fullerene on viscoelastic properties of human erythrocytes membrane	82
Yu.O Bozhkova , V.V Kiroshka , A.A. Havas , V.A. Bondarenko. Dynamics of structural change of ovarian tissue under ischemia	89
A.M. Manko, K.S. Neporada, A.A. Sukhomlyn, J. Ghasemzadeh, T.V. Beregova, D.S. Yankovskiy. Experimental correction of metabolic changes in mouth at long-term hypoacidity by multiprobiotic «symbiter acidophilic»	99
N.F. Velichko. Peculiarities hormonal metabolic changes in adult male rats under effect of emotional stress during dairy feeding	105