

Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 5 2015

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Коцюрuba A.B., Шарінов P.P., Кон'як B.C., Сагач B.Ф.</i> Фокальна ішемія-реперфузія головного мозку викликає зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, яке запобігається дією екдистерону	3
<i>Savchuk O.I., Orlovsky M.O., Iarmoliuk Ie.S., Goncharov S.V., Dosenko V.E., Skibo G.G.</i> Proteasomal activity in brain tissue following ischemic stroke in wistar rats	11
<i>Ziablitsev D. S., Larin O. S.</i> Influence of single nucleotide polymorphisms of vitamin D receptor-gene on the level of osteoassociated hormones linkage with postmenopausal osteoporosis	21
<i>Родинський O.Г., Ткаченко С.С.</i> Біоелектрична активність інтернейронів спинного мозку самиць білих щурів за умов експериментальної менопаузи	28
<i>Лабунець I.Ф., Таланов С.О., Васильєв P.Г., Родніченко А.Є., Утко Н.О., Кузьміна І.А., Кон'як B.C., Под'яченко O.B., Сагач B.Ф., Бутенко Г.М.</i> Гормони тимуса, антиоксидантні ферменти та нейрогенез у нюховій цибулині щурів при паркінсонізмі: вплив мелатоніну	35
<i>Янко P.B.</i> Морфофункціональний стан щитоподібної залози після введення мелатоніну	46
<i>Литвиненко А.П., Вознесенська Т.Ю., Янчій P.I.</i> Вплив NO та мексидолу на скоротливість оваріального і цервікального відділів матки у мишей за умов імуноопосередкованого запального процесу	52
<i>Zherebiatiev A.S., Kamyshny A.M.</i> Expression of receptor aryl hydrocarbon and protein ATG16L1 in experimental oxazolone-induced colitis in rats	57
<i>Хаїрова B.P., Сафаров M.И.</i> Динаміка глутаминсинтетазної активності в головному мозгу крыс в моделі пренатальної гіпоксії	65
<i>Іцук Т.В., Савчук O.M., Раєцька Я.Б., Верещака B.B., Остапченко Л.І.</i> Функціонування протеїназ у слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків	71

<i>Лісуха Л.М.</i> Вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії на вегетативний гомеостаз у дітей із радіоекологічно несприятливих регіонів	78
<i>Лінник О.О., Древицька Т.І., Гончар О.О., Чорний С.А., Ковальов О.М., Маньковська І.М.</i> Механізми порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів при дії доксорубіцина	90
<i>Чернозуб А.А.</i> Особливості адаптаційних реакцій чоловіків за умов силових навантажень .	99
ОГЛЯДИ	
<i>Малєєва Г., Брежестовський П.</i> Гліциновий рецептор: молекулярна організація і патології	107

Фокальна ішемія-реперфузія головного мозку викликає зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, яке запобігається дією екдистерону

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

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: toliko49@ukr.net

*Дослідили стійкість до кислотного гемолізу еритроцитів відтікаючої від головного мозку крові в динаміці фокальної ішемії (на 15, 30, 45 і 60-й хвилині) та в ранній (5хв) і віддадений (24год) період реперфузії у дорослих щурів, які з профілактичною метою протягом 18 діб отримували per os по 1 мг/кг екдистерону у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata*. Проведений аналіз кінетичних кривих кислотного гемолізу показав значне (майже у 60 разів, від 1,45 до 85,85 % на 60-й хвилині ішемії і 5-й хвилині реперфузії відповідно) зростання частки еритроцитів з низькою стійкістю до кислотного гемолізу у контрольних щурів, які не отримували екдистерон. В еритроцитах тварин, протектованих екдистероном, таких значних змін не відбувалося, що свідчить про значне підвищення стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу за його профілактичного введення. Суттєве зниження підвищених, особливо в ранній період реперфузії, пулів дієвих кон'югатів і лейкотрієну C_4 вказує на можливий антирадикальний механізм протекторної дії екдистерону.*

Ключові слова: фокальна ішемія-реперфузія головного мозку; еритроцити венозної крові головного мозку; кислотний гемоліз; щури; екдистерон.

ВСТУП

Нещодавно [1,2] ми показали, що за цереброкордіального синдрому, викликаного експериментальною фокальною ішемією-реперфузією головного мозку, значна частина (40 %) тварин гинули внаслідок розвитку в мітохондріях серця як оксидативного, так і нітрозативного стресу. Причиною оксидативного стресу є значне підвищення генерації супероксиду, а нітрозативного – поява в клітинах надлишкового оксиду азоту (NO) внаслідок активації його індукційного синтезу або, додатково, ще й за рахунок декомпозиції нітрозотіолів. За наявності підвищених рівнів генерації супероксиду або NO утворюється токсичний пероксинітрит, потужний окисник і відкривач мітохондріальної пори (МП) пере-

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

мінної проникності, а, тим самим, і ініціатор апоптозу. В мітохондріях серця дорослих щурів показано інгібування екдистероном оксидативного [1] і нітрозативного [2] стресу за фокальної ішемії-реперфузії головного мозку і за експериментального цукрового діабету 1-го типу [3,4], а також пригнічення кальцій- і радикаліндукованого відкривання пори у мітохондріях серця старих щурів [5].

Метою цієї роботи було дослідження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії і можливу протекцію цього процесу екдистероном.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на трьох групах щурів (по 10 у кожній) лінії Вістар масою

280-320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Першу групу склали інтактні тварини, у яких визначали лише вихідні показники кислотного гемолізу (0-ва точка до початку ішемії). До другої контрольної групи входили тварини, яким моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку оклюзією середньої мозкової артерії [1]. До третьої групи входили щури, які отримували екдистерон протягом 18 діб по 1 мг/кг за добу з питною водою у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata* (препарат «Біоспон» виробництва Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України), після чого їм моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку у тварин другої і третьої груп із яремної вени в динаміці ішемії (через 15, 30, 45 і 60 хв), а також через 5 хв і 24 год реперфузії відбирали по 0,1 мл відтікаючої від головного мозку крові для визначення пулів дієнових кон'югатів (ДК) і лейкотрієну C₄ (LTC₄) [1] та проведення кислотного гемолізу [6,7]. Кислотний гемоліз еритроцитів здійснювали за методом Терскова і Гіттельзона, який нами недавно детально описаний [7]. Вміст загального білка у крові визначали за методом Лоурі [8]. Отримані результати

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати (рис.1,2) свідчать про зростання стійкості до кислотного гемолізу (зменшення проникності для протонів плазматичної мембрани еритроцитів) відтікаючої від головного мозку венозної крові в період ішемії і, навпаки, істотне її зниження (збільшення проникності для протонів) у ранній період реперфузії головного мозку. Екдистерон інгібував надмірну стійкість до кислотного гемолізу в період ішемії і, навпаки, значно збільшував її в ранній період реперфузії. Слід відмітити, що на 60-й хвилині ішемії у еритроцитів венозної крові із головного мозку контрольної групи тварин другої групи в 4,6 раза зростала тривалість кислотного гемолізу (див. рис.1,а) і на 70 % – інтегральний індекс (див. рис.1,б), який кількісно оцінює стійкість до гемолізу всієї популяції еритроцитів крові [7]. У еритроцитів тварин третьої групи, які отримували екдистерон, тривалість кислотного гемолі-

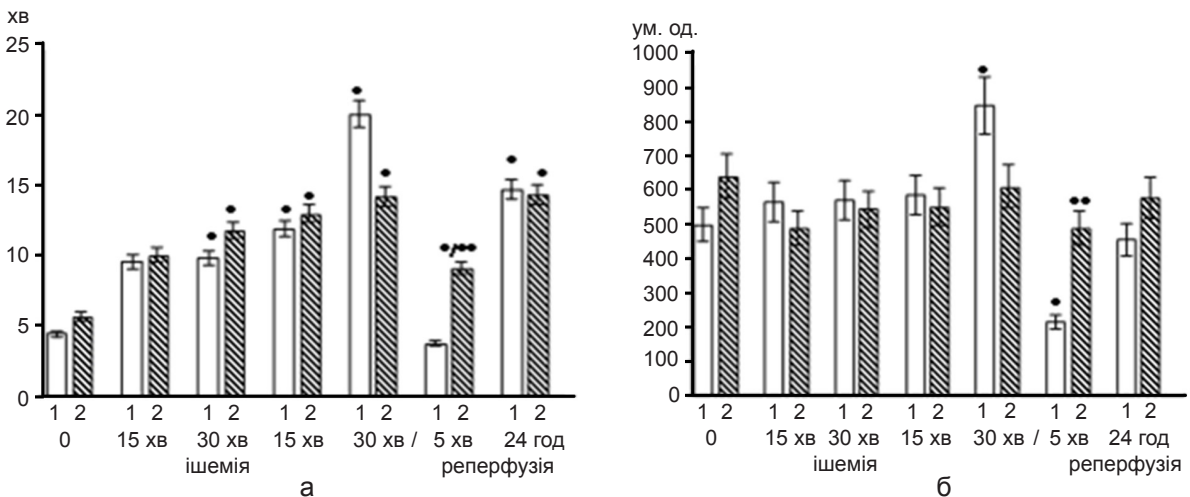


Рис.1. Зміни тривалості кислотного гемолізу (а) і інтегрального індексу стійкості еритроцитів (б) венозної крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* P<0,05 різниця вірогідна відносно значення до ішемії (0 хв); ** P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у контрольних щурих

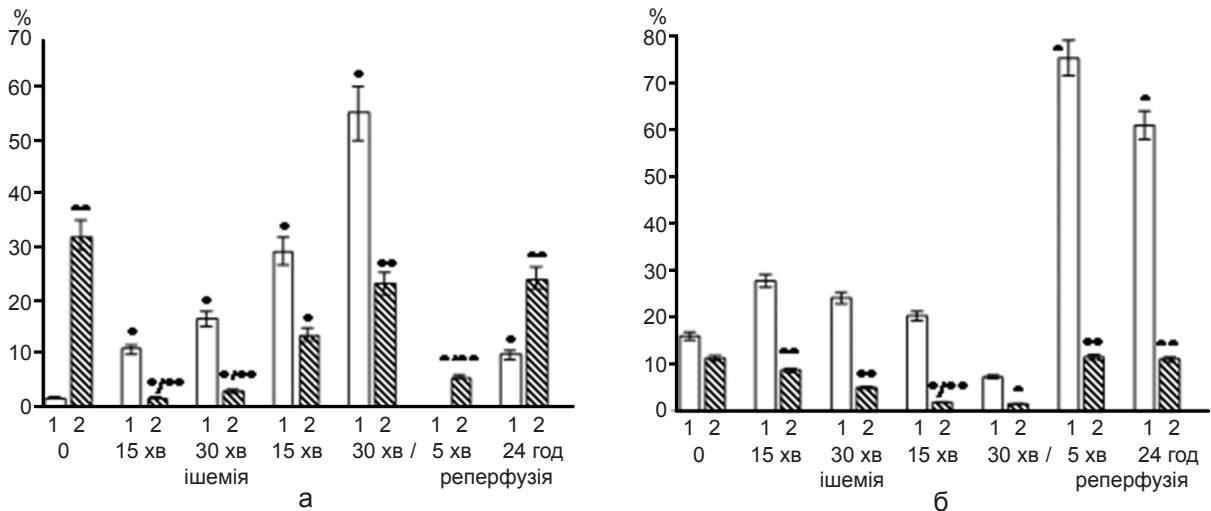


Рис. 2. Зміни частки стійких (а) і нестійких (б) до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові із головного мозку щурів за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у контрольних щурів

зу зростала лише у 2,5 раза (див. рис.1,а), а індекс стійкості в період ішемії не змінювався (див. рис.1,б). На 5-й хвилині реперфузії ці показники в контрольній групі тварин знижувались у 4-5 разів, тоді як у протектованих екдистероном вони були вірогідно вищими від контрольних значень. Уже через 24 год реперфузії тривалість кислотного гемолізу еритроцитів в обох групах тварин зрівнялася і була в декілька разів вищою від вихідних (до ішемії) значень.

На рис.2 показано зміни частки нестійких (гемолізуються менш ніж за 2,5 хв) і стійких (гемолізуються більш ніж за 7,5 хв) до кислотного гемолізу еритроцитів у загальній їх кількості в динаміці (0-60 хв) ішемії і реперфузії (5 хв і 24 год) контрольних і протектованих екдистероном щурів. У контрольних тварин відсоток нестійких до гемолізу еритроцитів венозної крові вірогідно не змінювався у ішемічний період, тоді як в період реперфузії він зростав. Особливо значним було підвищення на 5-й хвилині реперфузії (майже у 60 разів, від 1,4 % на 60-й хвилині ішемії до 85,8 %). У тварин, що отримували екдистерон, частка нестійких до гемолізу еритроцитів була нижчою від контрольних

значень на всьому дослідженому інтервалі ішемії-реперфузії і зростала на 5-й хв реперфузії лише у 8 разів (від 0,3 % на кінець ішемії до 2,3 %, див. рис. 2,б). У проміжку від 30-ї до 60-ї хвилини ішемії частка стійких до кислотного гемолізу еритроцитів зростала як у контрольних, так і у протектованих екдистероном щурів. Цей показник у протектованих тварин був нижчим контрольного рівня на всіх досліджених інтервалах ішемічного періоду. Так, на 60-й хвилині частка стійких до гемолізу еритроцитів у контрольних тварин становила 87,6 %, що у 6 разів більше від вихідного значення, тоді як у дослідних щурів, що профілактично отримували екдистерон, вона була всього 23,1 %, що майже у 4 рази менше від контрольного значення. Крім того, якщо на 5-й хвилині реперфузії у еритроцитах контрольних тварин спостерігалось значне (від 87,6 до 0 %) зниження частки стійких до кислотного гемолізу клітин, то за дії екдистерону вона знижувалась значно меншою мірою («всього» у 4 рази, від 23,1 до 5,5 %).

Таким чином, представлені на рис.1 і 2 результати показують, що за ішемії-реперфузії головного мозку у еритроцитах відтіка-

ючої від нього венозної крові відбуваються реципрокні зміни проникності плазматичної мембрани для протонів – значне прогресуюче зниження в період ішемії і, навпаки, істотне зростання в ранній період реперфузії. Фармакологічне прекодиціювання протягом 18 діб за допомогою екдистерону, що є природним аналогом кальцій- і апоптозрегулюючого гормону кальцітриолу, запобігає кислотному гемолізу еритроцитів за експериментальної фокальної ішемії-реперфузії головного мозку.

Раніше ми показали, що екдистерон, завдяки інгібуванню оксидативного і, особливо, нітрозативного стресу [1–4], як і Ca^{2+} , та радикалзалежного відкриття МП, унеможлиблював ініціювання програми некрозу кардіоміоцитів у старих щурів [5]. Стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу (однією із форм некротичної смерті цих клітин) залежить від проникності їх плазматичної мембрани для протонів, що визначається спряженим (coupling) чи неспряженим (uncoupling) станом Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани цих клітин, яка здійснює обмін одного H^+ („входить” в еритроцит) на Ca^{2+} („виходить” із еритроцита) [9–15]. Можна припустити, що в умовах зростання вмісту дезоксигемоглобіну в еритроцитах відтікаючої від головного мозку венозної крові за його ішемії посилюється реутилізаційний синтез NO відновленням нітрит-аніона [16,17], що і зумовлює підвищення їх стійкості до кислотного гемолізу внаслідок неспряження Ca^{2+} -АТФази і інгібування „входу” H^+ в еритроцити (див. рис.1).

Наразі ми показали значне зростання проникності плазматичної мембрани еритроцитів для H^+ в ранній період реперфузії головного мозку і інгібування цього процесу екдистероном (див. рис.1,2). У ранній період реперфузії, коли потужний реутилізаційний синтез NO відновленням нітрит-аніона дезоксигемоглобіном різко знижується внаслідок превалювання окси-форми гемоглобіну, Ca^{2+} -АТФаза може переходити у спряжену форму внаслідок чого зростає вхід H^+ в еритроцити

і скорочується тривалість їх кислотного гемолізу, на що вказує як зниження інтегрального індексу стійкості (див. рис.1,б) і, особливо, частки нестійких до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, які гемолізуються менше ніж за 2,5 хв (див. рис.2,б). Антигемолітична дія екдистерону в цих умовах може зумовлюватися як впливом на синтез NO в еритроцитах, на що вказують наші попередні праці [3–5], так і інших чинників, що регулюють кальцій-протонний обмін в еритроцитах. Механізмом такої регуляції може бути окисна модифікація ліпідного оточення Ca^{2+} -АТФази в плазматичній мембрані внаслідок інтенсифікації вільнорадикального процесу перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Із рис. 3 видно, що вміст ДК, які є маркером інтенсивності ПОЛ, у венозній крові зростає з різною інтенсивністю як в ішемічний, так і в реперфузійний, особливо його ранній період, і значно пригнічується дією екдистерону. Також не виключена регуляторна роль у процесі транспорту H^+ в еритроцити LTC_4 , який в них не лише інтенсивно синтезується, але і має специфічний рецептор $CysLT1$ на плазматичній мембрані [18]. Ми показали (див. рис.4) значне зростання у крові яремної вени вмісту LTC_4 як протягом усього ішемічного періоду, так і в ранній та віддалений

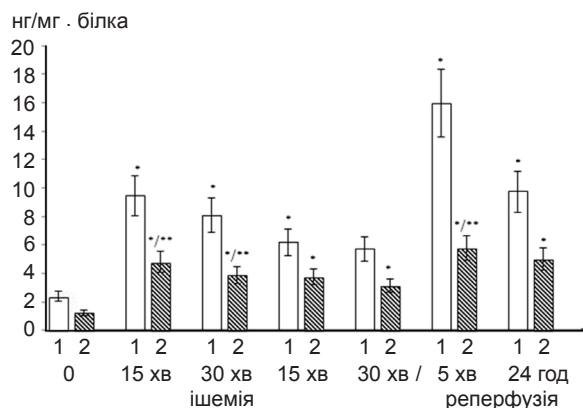


Рис.3. Зміни вмісту дієнових кон'югатів у венозній крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у контрольних щурів

реперфузійний період. Екдистерон інгібував його підвищення у венозній крові головного мозку за його ішемії-реперфузії, тим самим зберігаючи необхідний для синтезу LTC₄ глутатіон. Останній має велике значення для захисту органів від пошкодження за ішемії-реперфузії [19], в т.ч., регулюючи спряження конститутивних NO-синтаз.

Отже, проведені дослідження показали значне підвищення проникності для протонів плазматичної мембрани еритроцитів із яремної вени в ранній період (5хв) реперфузії головного мозку після 60 хв ішемії, та значне інгібування цього процесу екдистероном. Така протекторна щодо еритроцитів дія екдистерону мала за наслідок, як показано нами раніше [1,2], 100% виживання тварин після 24 год реперфузії головного мозку (в непротектованому контролі вижило лише 60% тварин), а також значні позитивні зміни відносного вмісту еритроцитів із різною стійкістю до кислотного гемолізу. Протекторна дія екдистерону може зумовлюватися інгібуванням Ca²⁺-АТФази, яка знаходиться під контролем протеїнкінази С [10]. Таким чином, активні форми кисню і азоту, котрі можуть регулювати як стан окиснення тіолових груп, так і ліпідного оточення в плазматичній мембрані Ca²⁺-АТФази та протеїнкінази С [14], повинні

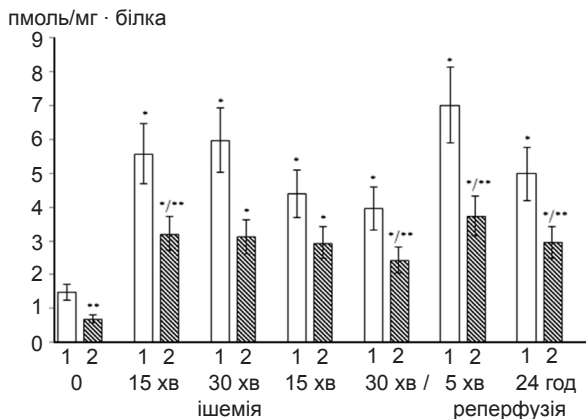


Рис. 4. Зміни вмісту пептидолейкотриєну С4 у венозній крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2). * P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у контрольних шурів

займати важливе місце в ієрархії регуляторів кислотної резистентності еритроцитів.

Загальний вміст кальцію в еритроцитах варіює між 5 і 15нмоль/мл клітин і цей низький рівень частково зумовлений відсутністю в цих клітинах Ca²⁺-вмісних органел – мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула і ядра [20]. Основна частина цитозольного Ca²⁺ знаходиться у зв'язаному стані, а низький вміст іонізованого Ca²⁺ (близько 0,2 мкмоль/л) можуть зростати у 3-7 разів за фізіологічних умов внаслідок підвищення зазвичай низької проникності плазматичної мембрани і активності Ca²⁺-помпи - (Ca²⁺, Mg²⁺)-стимульованої АТФази [20]. За патофізіологічних умов саме значне підвищення концентрації вільного іонізованого Ca²⁺ в цитозолі клітин, в т.ч. і еритроцитів, служить тригером багатьох процесів, що пошкоджують клітини і навіть можуть викликати їх загибель. Відносно еритроцитів остання буває некротичною (за допомогою різного роду гемолізів) або апоптичною (за допомогою ериптозу). У всіх клітинах, в т.ч. і в еритроцитах, і апоптична, і некротична програми загибелі ініціюється підвищеними концентраціями Ca²⁺ в цитозолі. Це підтверджує виключну роль в їх реалізації вищевказаного механізму проникнення Н⁺ в цитозоль еритроцитів через Ca²⁺- Н⁺ обмін, який здійснюється Ca²⁺-АТФазою у спряженому стані. Подібний механізм діє також в гладеньких м'язах судин [21]. Унікальність еритроцитів полягає в тому, що для них саме Ca²⁺ - Н⁺ обмін, за відсутності клітинних депо кальцію, є чи не єдиним запобіжним від апоптозу/некрозу способом. На наш погляд, за фокальної ішемії-реперфузії головного мозку спостерігається така послідовність процесів у еритроцитах його венозної крові: певне підвищення концентрації Ca²⁺ в цитозолі еритроцитів для запобігання (як адаптивний процес) її подальшого підвищення «включає» Ca²⁺- Н⁺ обмін за якого Ca²⁺ «викидається» в плазму, що підвищує в ній їх концентацію, але недостатню для

інгібування подальшого його «виходу» із еритроцитів. Внаслідок цього із плазми протони, концентрація яких, що давно відомо, за ішемії підвищується «заходять» в еритроцити. Тепер уже, щоб зменшити внутрішньоклітинну концентрацію протонів (запобігти зниженню рН в еритроцитах), активуються процеси їх «евакуації» в плазму. Існує давно відомий процес видалення H^+ через аніонний канал у вигляді іонів бікарбонату (HCO_3^-), а також, як було встановлено зовсім недавно, і іонів гідросульфиду (HS^-) [22]. Обидва аніони інтенсивно і постійно синтезуються в еритроцитах, останній ферментом 3-меркаптопіруватсульфотрансферазою (3-MPST), наявним також і в мітохондріях клітин різних органів серцево-судинної системи. Згідно з нашою гіпотезою, саме адаптивне запобігання реалізації менш шкідливої для організму апоптичної загибелі еритроцитів призводить до реалізації більш шкідливої для всіх клітин організму, але лише частково для еритроцитів, некротичної їх загибелі за гемолізу. Річ у тому, що руйнування плазматичної мембрани еритроцитів за гемолізу, в т.ч. кислотного, призводить не лише до виділення в плазму токсичних сполук (у першу чергу, вільного гемоглобіну, що є скавенджером оксиду азоту), але і до виділення аденозинтрифосфату і газових трансмітерів оксиду вуглецю (СО) [23] і сірководню [24]. Як давно відомо, СО виділяється внаслідок розщеплення гему стресовим ферментом гемоксидазою. При цьому утворюється також потужний антиоксидант білірубін, протекторна роль якого явно недооцінена [25]. Отже, помірний кислотний гемоліз еритроцитів може бути процесом, що забезпечує організм біорегуляторами.

Важливу роль визначення саме кислотного гемолізу еритроцитів набуває через можливість опосередкованої швидкої (скрінінгової) оцінки дії різних лікарських засобів, в т.ч. антигіпертензивних, на зміни цитозольного кальцію, спряжений/неспрямований стан Ca^{2+} -АТФази і активність кальцій-протонного обміну та протеїнкінази С в еритроцитах, а

відтак і в інших клітинах, позаяк еритроцити давно визнані універсальним маркером проникності плазматичних мембран для різних іонів.

ВИСНОВКИ

1. В період фокальної ішемії головного мозку стійкість до кислотного гемолізу еритроцитів його венозної крові у контрольних щурів зростає, тоді як в ранній період реперфузії (5 хв), навпаки, надмірно (майже в 60 разів) знижується порівняно з такою на 60-й хвилині ішемії.

2. У протектованих екдистероном тварин стійкість еритроцитів венозної крові із головного мозку до кислотного гемолізу на 5-й хвилині його реперфузії порівняно із рівнем на 60-й хвилині ішемії знижувалася значно меншою мірою (лише у 8 разів).

3. Протягом всього періоду ішемії-реперфузії головного мозку у його венозній крові контрольних тварин пули як дієвих кон'югатів, так і пептидолейкотрієна C_4 були значно вищими, ніж у протектованих екдистероном щурів, що передбачає можливий антирадикальний механізм захисної дії екдистерону.

А.В. Коцюрба, Р.Р. Шарипов, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач

ФОКАЛЬНАЯ ИШЕМИЯ-РЕПЕРФУЗИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЫЗЫВАЕТ СНИЖЕНИЕ СТОЙКОСТИ К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ ЭРИТРОЦИТОВ ЕГО ВЕНОЗНОЙ КРОВИ, КОТОРОЕ ПРЕДОТВРАЩАЕТСЯ ДЕЙСТВИЕМ ЭКДИСТЕРОНА

Определили стойкость к кислотному гемолизу эритроцитов венозной крови из головного мозга в динамике ишемического периода (на 15, 30, 45 и 60-й минуте), а также в ранний (5 мин) и отдаленный (24 ч) период реперфузии у взрослых крыс, которые с профилактической целью в течение 18 сут получали *per os* по 1 мг/кг экдистерона в виде стандартизированного экстракта *Serratula coronata*. Проведенный анализ кинетических кривых кислотного гемолиза показал значительное (почти в 60 раз, от 1,45 до 85,85 %, на 60-й минуте ишемии и 5-й минуте реперфузии

соответственно) увеличение доли нестойких к кислотному гемолизу эритроцитов. Прекодиционирование эрдистероном значительно увеличивало стойкость к кислотному гемолизу эритроцитов венозной крови из головного мозга В ранний период реперфузии доля лабильных клеток у этих животных возрастала лишь в 8 раз (от 0,29 до 2,29 %, на 60-й мин ишемии и 5-й минуте реперфузии соответственно). На протяжении всего периода ишемии, с максимумом на 15-й минуте, в венозной крови из головного мозга в 4 раза увеличивались пулы диеновых конъюгатов (от 2,40 до 9,48 нг/мг белка) и пептидолейкотриена C₄ (от 1,49 до 5,98 пмоль/мг белка). Ещё больше пулы диеновых конъюгатов и лейкотриена C₄ возрастали на 5-й минуте реперфузии. При этом, как в период ишемии, так и в ранний период реперфузии у протектированных эрдистероном животных таких значительных изменений не наблюдали. Последнее предполагает возможный антирадикальный механизм антигемолитического действия эрдистерона в ранний период реперфузии.

Ключевые слова: фокальная ишемия-реперфузия головного мозга; эритроциты венозной крови из головного мозга; кислотный гемолиз; крысы; эрдистерон.

A.V. Kotsuruba, RR Sharipov, B.S.Kopyak, V.F. Sagach

BRAIN FOCAL ISCHEMIA-REPERFUSION CAUSES A DECREASED RESISTANCE OF ERYTHROCYTES FROM VENOUS BLOOD TO ACID HEMOLYSIS, WHICH IS PREVENTED BY ECDYSTERONE

We investigated the resistance of erythrocytes from rat brain venous blood to acid hemolysis in the dynamics of brain ischemic period (15, 30, 45 and 60 min), as well as in the early (5 min) and distant (24h) period of brain reperfusion. Brain ischemia-reperfusion was made in rats that received ecdysterone (standartized extract of *Serratula coronata*) within 18 days (per os, 1 mg/kg). Analysis of the kinetic curves of acid hemolysis showed a pronounced (60 times, from 1.45 to 85.85 % at 60 min of brain ischemia and at 5 min of brain reperfusion, respectively) increase of unstable erythrocytes that hemolyzed easily (<2.5 min). In the preconditioned rats, this increase was only 8- fold. During the period of brain ischemia, with a maximum at 15th minute, in the venous blood from brain the diene conjugates (DK) pools increased from 2.40 to 9.48 ng/mg protein and LTC₄ pools increased from 1.49 to 5.98 pmol/mg protein. Even more pools of DC and LTC₄ were increased at 5th min of brain reperfusion. In animals received ecdysterone, during ischemia and early reperfusion period, both pools of DC and LTC₄ in venous blood were lower than that in the controls. The latter implies a possible antiradical mechanism of the protective effect of ecdysterone.

Key words: erythrocytes; brain focal ischemia-reperfusion; venous blood from brain; acid hemolysis; rats; ecdysterone.

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

REFERENSES

1. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
2. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
3. Korkach JuP, Rudyk OV, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD, Sagach VF. The nitric oxide and superoxide syntesis in protective action of ecdysterone in mitochondrias of rat's hearts with streptozotocin-induced diabetes. *Fiziol Zh.* 2007; 53(5):22-8. [Ukrainian].
4. 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 I diabetes. *Fiziol Zh.* 2008; 54(5):46-54. [Ukrainian].
5. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Rudyk OV, Vavilova GL. Mitochondrial permeability transition pore opening inhibition by ecdysterone in heart mitochondria of aging rats. *Fiziol Zh.* 2008; 54(4):3-10. [Ukrainian].
6. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2):259-66. [Russian].
7. Kotsuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF, Spivak NJa. Old rats erythrocytes stability to acid hemolysis restoring by cerium oxide nanoparticles. *Physiol. Zh.* 2014; 60(6): 3-9. [Ukrainian].
8. Lowery OH, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
9. Wright LC, Chen S, Roufogalis BD. Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase by adriamycin in intact human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 321(2):459-66.
10. de Jong K, Rettig MP, Low PS, Kuypers FA. Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry.* 2002; 41(41):12562-7.
11. Milanick MA. Proton fluxes associated with the Ca pump in human red blood cells. *Am J Physiol.* 1990; 258(3 Pt 1):C552-62.
12. Gassner B, Luterbacher S, Schatzmann HJ, Wüthrich A. Dependence of the red blood cell calcium pump on the membrane potential. *Cell Calcium.* 1988; 9(2):95-103.
13. Xu W, Wilson BJ, Huang L, Parkinson EL, Hill BJ, Milanick MA. Probing the extracellular release site of the plasma membrane calcium pump. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278(5):C965-72.
14. Hebbel RP, Shalev O, Foker W, Rank BH. Inhibition of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by activated oxygen through thiol- and lipid-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 862(1):8-16.
15. Bisognano JD, Dix JA, Pratap PR, Novak TS, Freedman JC. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic

- response of human red blood cells. *J Gen Physiol.* 1993; 102(1): 99-123.
16. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. *Blood.* 2008; 112(7):2636-47.
17. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood.* 2006; 107(2):566-74.
18. Foller M, Mahmud H, Gu S, Wang K, Floride E, Kucherenko Y, Luik S, Laufer S, Lang F. Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(3):135-43.
19. van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, Schwartz BA, Moldow CF, Jacob HS. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science.* 1985; 227(4688):756-9.
20. Wiley JS, McCulloch KE. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmacol Ther.* 1982; 18(2):271-92.
21. Daugirdas JT, Arrieta J, Ye M, G Flores G, Battle DC. Intracellular acidification associated with changes in free cytosolic calcium. Evidence for Ca²⁺/H⁺ exchange via a plasma membrane Ca(2+)-ATPase in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995; 95(4):1480-9.
22. Jennings ML. Transport of H₂S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 305(9):C941-50.
23. Wu I, Wang R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57(4):585-630.
24. Leffler CW, Parfenova H, Jaggar JH, Wang R. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol.* 2006; 100(3):1065-76.
25. Sedlak W, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *PNAS.* 2009; 106(13): 5171-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 24.03.2015*

Proteasomal activity in brain tissue following ischemic stroke in Wistar rats

O.I. Savchuk¹, M.O. Orlovsky¹, Ie.S. Iarmoliuk², S.V. Goncharov¹, V.E. Dosenko¹, G.G. Skibo¹

¹O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

²O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: floweringowl@ukr.net

Functional as well as structural reorganization of brain tissues takes place in the surrounding and remote brain areas after focal ischemic lesions. In particular, reactive or regenerative processes have been described to occur in the infarction areas and the contralateral hemisphere. Experiments were performed on 63 rats, divided into 3 groups (each consisted of 21 animals): sham operated, short-term occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO) group, and long-term MCAO group. We have studied changes in proteasome proteolysis during transient occlusion of the middle cerebral artery using method of Koizumi J., duration 2 and 60 min and made the comparison between changes in different types of proteasome activity and severity of ischemic injury and showed three types of decrease in proteolytic activity (trypsin-, chymotrypsin-like, peptidylglutamyl peptide-hydrolyzing) in the brain tissues. Chymotrypsin-like activity of ischemic areas of the brain for short-term MCAO decreased 4.1 times compared with controls ($P>0.05$), for long-term MCAO decreased 5.8 times compared with controls ($P<0.05$). Trypsin-like activity of ischemic areas of brain for short-term MCAO decreased 7.1 times compared with controls ($P>0.05$), for long-term MCAO decreased 12.5 times compared with controls ($P<0.05$). PGPH activity of ischemic areas for short-term MCAO decreased 8 times compared with controls ($P>0.05$), for long-term MCAO decreased 2.8 times compared with controls ($P<0.05$). The similar dynamics was observed also in the penumbra and the core zone of the brain at 6 h of reperfusion, in the long run there is no significant difference between the core and contralateral zones. Our results suggest that proteasome activity may play also a role in contralateral cortical plasticity occurring after focal cerebral ischemia.

Key words: ischemic stroke; focal cerebral ischemia; proteasome.

INTRODUCTION

Ischemic stroke, occurring as a result of occlusion of major cerebral arteries, is a devastating disease, representing a leading cause of death and disability worldwide [1]. Brain ischemia, due to loss of cerebral blood flow, induces a complex interaction of several pathological perpetrators that eventually lead to cell death [2]. Despite recent advances, there are major gaps in our understanding of the pathogenesis of cerebral ischemic injury, and therapeutic options for stroke patients remain limited [3]. It is so necessary to study molecular mechanisms of this pathology, one of them is ubiquitin-proteasome system which represents the main

cellular pathway for protein degradation [4], contributing to important cellular processes, including transcriptional regulation, cognition, memory and other [5].

The accumulation of ubiquitin-containing protein aggregates following ischemia is a relatively unexplored research area that may provide new mechanistic insights into ischemic brain damage [6]. However, the factors leading to deposition of these aggregates and their consequences for stroke outcome are largely unknown and, as such, require additional elucidation.

Although the proteasome is responsible for the majority of intracellular protein degradation, and has been demonstrated to play a pivotal role in a diverse array of cellular activities, the role

© O.I. Savchuk, M.O. Orlovsky, Ie.S. Iarmoliuk, S.V. Goncharov, V.E. Dosenko, G.G. Skibo

of the proteasome in the central nervous system is only beginning to be elucidated [7]. The eukaryotic proteasome is a large multicatalytic, multisubunit protease complex possessing at least three distinct activities, which are associated with three different of subunits, respectively: chymotrypsin-like activity (with the B5 subunit), trypsin-like activity (with the B2 subunit), and peptidylglutamyl peptide-hydrolyzing (PGPH) activity (with the B1 subunit) [8].

Recent studies have demonstrated that proteasome inhibition occurs in numerous neurodegenerative conditions, and that proteasome inhibition is sufficient to induce neuron death, elevate intracellular levels of protein oxidation, and increase neural vulnerability to subsequent injury [9]. In other hand, proteasome inhibitors are very effective for prevention of ischemic injury [10].

The aim of this investigation is to determine three types of proteasome activities in zone brain (core, penumbra, contralateral area) under short-term and long-term carotid artery occlusion, compare infarction volume with behavioral tests in modelling of focal ischemic stroke.

METHODS

Adult male Wistar rats, weighing 280–320 g, were housed in standard cages with free access to food and water on a 12 h light/dark cycle. All procedures performed on animals were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996, USA) and were approved by the Animal Use and Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine.

Sixty three rats were randomly allocated to one of three groups: sham group, short-term (MCAO) group, and long-term MCAO group. The rats in the sham group (n=21) underwent right common carotid artery and external carotid exposure without MCAO, were anesthetized with calipsol (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). In the short-term MCAO group (n=21), un-

der the same anesthetic conditions and surgical procedures as sham group, the MCA was occluded for 2 min. In long-term MCAO group (n=21), under the same anesthetic conditions and surgical procedures as sham group and short-term MCAO group, the MCA was occluded for 60 min. In all three groups reperfusion time was 6, 24 and 72 h (n=7). Animals were tested at 6 h, 24 h and 72 h to evaluate neurologic function [11]. At 6 h, 24 h and 72 h after reperfusion, a subset of the rats was sacrificed, and the brains were quickly harvested for the measurement of infarction ratio and proteasome activity.

Rectal temperature was monitored and kept at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a heating pad, and let temporalis muscle temperature was kept at $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ with a heating lamp. Focal cerebral ischemia was induced in rats by permanent occlusion of the right middle cerebral artery, using the suture method previously described, with modifications [11]. Briefly, the right common carotid artery was exposed, and the external carotid artery was isolated and coagulated. A 4-0 silicone-coated nylon suture (Docol Co., Albuquerque, NM, USA) was inserted into the internal carotid artery through the external carotid artery stump and gently advanced to occlude the MCA. After completion of the proximal MCAO, the suture was gently withdrawn to permit reperfusion. The external carotid stump was ligated and the wound closed, and the rats were maintained under temperature control until they were returned to animal cages 1 h later.

Infarction Volume Measurements

The animals were sacrificed at 6, 24 or 72 h after MCAO, after which the brains were rapidly removed and sectioned coronal at 2-mm intervals. Sections were taken from the region beginning 1mm from the frontal pole and ending just rostral to the corticocerebellar junction and stained with 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium hydrochloride (TTC) (“Sigma”, St. Louis, MO, USA), for 15 min at 37°C . The infarcted tissue remained white, whereas normal tissue was stained red. The lesion volume (mm³) was

determined by multiplying the appropriate area by the section interval thickness. To reduce errors associated with processing of tissue for histological analysis, the ischemic volume is presented as the percentage of infarct volume of the contralateral hemisphere (indirect volume calculation). Infarct areas of all sections were added to derive the total infarct area, which was multiplied by the thickness of the brain sections to determine the infarct volume. To compensate for the effect of brain edema, the corrected percentage of infarction was calculated as follows: percentage of infarction = [measured infarct area - (ipsilateral hemisphere area - contralateral hemisphere area)] / [(ipsilateral hemisphere area + contralateral hemisphere area) - (ipsilateral hemisphere area - contralateral hemisphere area)] [12].

MCAO in rats typically causes varying degrees of both somatosensory and motor impairment. Thus, it is important that evaluation of neurological function following experimental stroke consist of a battery of tests that evaluate the degree of sensory and motor impairment in an accurate, reproducible manner. A multitude of tests have been developed to evaluate these functions. A test such as the Open field has been proposed as test of motor function, while the Adhesive Removal (sticky-tape) test is often utilized as a test of somatosensory function. These tests were performed after 6, 24, 72 h of reperfusion at modeling ischemic brain damage.

Proteasomal activity

Brain samples (10% wt/vol) were homogenized either in tris-HCl. The total brain homogenate was centrifuged at 5,000 g for five min, and the supernatants (cytosolic fractions) were used for the determination of protease alkaline and peptidase activities. The fluorogenic peptide substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amydo-4-methylcoumarin (S6510; "Sigma-Aldrich") was used to measure the chymotrypsin-like activity of the proteasome, Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amydo-4-methylcoumarin (B4636; "Sigma-Aldrich") was used for the trypsin-like activity and CBZ-

Leu-Leu-Glu-7-amydo-4-methylcoumarin (C0483; "Sigma-Aldrich") for the PGPH activity [13, 14]. After a 30-min (for trypsin-like activity) or 1h (for other activities) incubation with one of these fluorogenic peptides (at a concentration of 6 μ M), fluorescence of the reaction products was monitored at 380 nm excitation and 440 nm emission using free 7-amino-4-methylcoumarin as a standard on a Hitachi 4000 spectrofluorometer. The reactions were carried out in the absence or presence of selective proteasome inhibitors – clasto-lactacystin β -lactone (2.5 μ M) – to differentiate between nonproteasome- and proteasome-mediated peptide hydrolysis. The percentage of inhibition of respective substrate hydrolysis after treatment with a specific inhibitor was evaluated as the proteasome activity and was expressed as nanomoles per liter 7-amino-4-methylcoumarin per 10⁶ cells per 1 min.

Statistical analysis

All values are presented as an arithmetic mean \pm standard error. Data in all groups was tested for normality of distribution using the one-sample Kolmogorov-Smirnov test, and the analysis of variance was performed using one-way ANOVA. Results were considered statistically significant at the $P < 0.05$ level. The software used was MS Excel 2007 and SPSS Statistics 17.0.

RESULTS

Infarction volume was then calculated by summing the infarction areas over all sections and multiplying by the slice thickness (table). Whereas no histological damage was noted in shamoperated rats, focal ischemia led to a brain lesion affecting the temporoparietal cortex, including mainly the primary somatosensory cortex. Brain damage also affected, but to a minor extent, a small part of the S1 forelimb cortex, a lateral portion of the primary motor cortex, the secondary somatosensory cortex, the agranular insular cortex, and the ectorhinal and auditory cortex. Furthermore, in some animals,

Volume of ischemic brain areas (mm³) in rats at different periods of reperfusion after MCAO (M±m, n=14).

Volume of ischemic brain areas		Infarct volume, mm ³ (Total infarction)	Penumbra, mm ³	Core, mm ³
6 h	short- term	5.11 ± 1.25	-	-
	long-term	9.18 ± 1.43 *	7.24 ± 1.13	1.95 ± 0.31
24 h	short-term	5.52 ± 1.47	-	-
	long- term	11.47 ± 5.41 *	5.16 ± 2.43	6.32 ± 2.97
72 h	short-term	10.01 ± 2.34	-	-
	long-term	21.27 ± 2.07 *	2.77 ± 0.27	18.50 ± 1.80

* P < 0.05.

an expansion of the lesion can be observed in white matter, as well as shrinkage of a small portion of the lateral striatum. The lesion volumes were 5.11±1.25 mm³, 5.52±1.47, 10.01±2.34 in short-term MCAO group after 6, 24, 72 h respectively (histological measurements) and 9.18±1.43, 11.47±5.41, 21.27±2.07 in long-term MCAO group after 6, 24, 72 h respectively (table 1, P<0.05). According to the literature, on the 3rd day after MCAO the area of ischemic damage has clearly delineated, with perifocal edema zone is less expressed than on the 1st - 2nd day.

After the staining TTC there was revealed a significant prevalence of infarction volume areas in the long-term MCAO group with time of reperfusion 72 h - (21.27±2.07 mm³) of the corresponding values in the other group of animals at the same time of reperfusion (short-term MCAO - 10.01±2.34 mm³, P<0.05) (Fig. 1). Dimensions zone lesions in the long-term MCAO group with time of reperfusion 24 h - (11.47±5.41mm³) of the corresponding values in the other group of animals at the same time of reperfusion (short-term MCAO - 5.52±1.47 mm³, P<0.05). Dimensions zone lesions in the long-term MCAO and the short-term MCAO were also statistically significant (9.18±1.43 mm³ and 5.11±1.25, respectively, P<0.05).

We measured three types of proteolytic activity of the proteasome (trypsin-, chymotrypsin-like and peptidylglutamyl peptide-hydrolyzing-like) in the brain tissues. Various activities of the proteasome activity vary in different directions. After 6 h of reperfusion in the core zone

all kinds of proteasomal activity are activated comparable with the amplitude of short-term MCAO, in cases not only short-term MCAO but also with long-term MCAO, while in cases of large spread short-term MCAO. This activation was not statistically reliable, but for long-term MCAO - statistically significant (Fig. 2). Chymotrypsin-like activity of ischemic areas of the brain for short-term MCAO decreased 4.1 times compared with controls (P>0.05), for long-term MCAO decreased 5.8 times compared with controls (P<0.05). Trypsin-like activity of ischemic areas of brain for short-term MCAO decreased 7.1 times compared with controls (P>0.05), for long-term MCAO decreased 12.5 times compared with controls (P<0.05). PGPH activity of ischemic areas for short-term MCAO decreased 8 times compared with controls (P>0.05), for long-term MCAO decreased 2.8 times compared with controls (P<0.05). The similar dynamics was observed also in the penumbra and the core zone of the brain at 6 hour of reperfusion, in

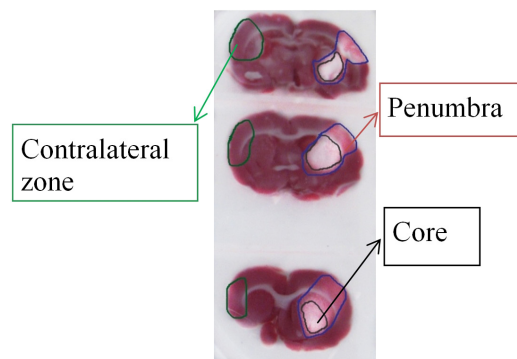


Fig. 1. Histological sections of brain after TTC staining

the long run there is no significant difference between the core and contralateral zones. These data are summarized in Fig. 3.

Chymotrypsin-like activity of penumbra for short-term MCAO decreased 4.3 times compared with controls ($P>0.05$), for long-term MCAO decreased 11 times compared with controls ($P>0.05$). This activity of contralateral zone in

relation to damage zone for short-term MCAO decreased 4.3 times, for long-term MCAO decreased 3 times compared with controls ($P<0.05$). Trypsin-like activity of penumbra decreased 4.1 times compared with controls for short-term MCAO ($P>0.05$), for long-term MCAO this type of activity decreased 25 times compared with controls ($P>0.05$) and decreased 4.1 times for contralateral zone in relation to damage zone for short-term MCAO, for long-

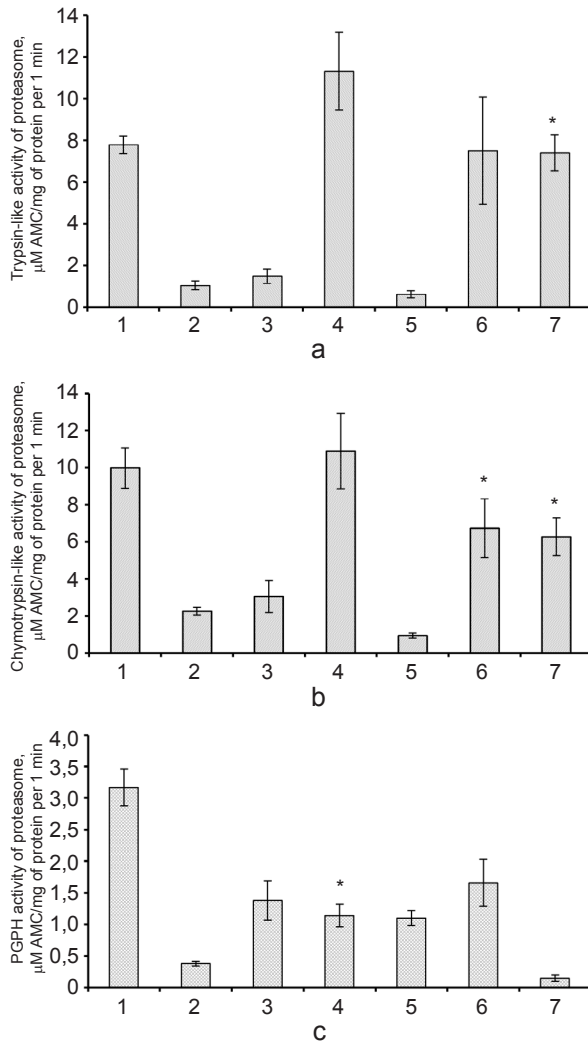


Fig. 2. Trypsin-like (a), chymotrypsin-like (b) and PGPH (c) activities of proteasome in core area of brain after MCAO. 1 – control; 2 – short-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 3 – short-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 4 – short-term MCAO group at 72 h period of reperfusion; 5 – long-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 6 – long-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 7 – long-term MCAO group at 72 h period of reperfusion. N = 7. * $P<0.05$

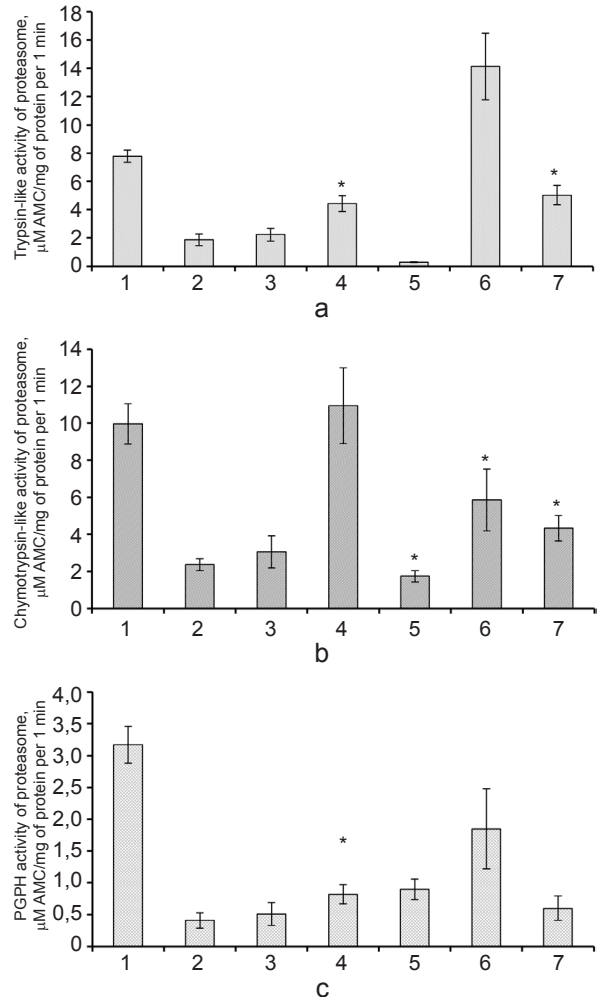


Fig. 3. Trypsin-like (a), chymotrypsin-like (b) and PGPH (c) activities of proteasome in penumbra after MCAO. 1 – control; 2 – short-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 3 – short-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 4 – short-term MCAO group at 72 h period of reperfusion; 5 – long-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 6 – long-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 7 – long-term MCAO group at 72 h period of reperfusion. N = 7. * $P<0.05$

term MCAO it decreased 9 times compared with controls ($P < 0.05$). PGPH activity of penumbra for short-term MCAO decreased 6.3 times for short-term MCAO compared with controls ($P > 0.05$), for long-term MCAO it decreased 3.7 times compared with controls ($P > 0.05$). This activity decreased 4.5 times for contralateral zone in relation to damage zone for short-term MCAO, for long-term MCAO it decreased 2.5 times compared with controls ($P < 0.05$). This suggests that the activation of the proteasome is a reactive processes rather than a mechanism of neuronal damage.

At 24 h of reperfusion there was a significant strengthening of trypsin-like both in the core zone and in the penumbra and this is observed only during long-term MCAO and at short-term MCAO such effects did not appear and also in contralateral is not observed (Fig. 2, a).

Trypsin-like activity decreased 7.1 times for core at 6 h of reperfusion for short-term MCAO compared with controls ($P > 0.05$), for long-term MCAO it decreased 12.5 times compared with controls ($P < 0.05$). This activity of penumbra for short-term MCAO decreased 4.1 times, for long-term MCAO it decreased 25 times compared with controls ($P < 0.05$). Trypsin-like activity decreased 5.5 times for core at 24 h of reperfusion for short-term MCAO compared with controls ($P > 0.05$), for long-term MCAO it decreased 1.1 time compared with controls ($P < 0.05$). This activity decreased 4 times for penumbra at 24h of reperfusion for short-term MCAO, for long-term MCAO it increased 1.8 times compared with controls ($P < 0.05$). These processes which are related to damage and confirmed: "If ischemia is longer, the activation will be stronger". There is a clear dependence of the effect on the duration of ischemia. Short-term MCAO did not induce any significant changes in trypsin-like proteasome activity neither in core, nor penumbra regions.

In short-term MCAO the peak of activity was not at 24h after reperfusion but on 72 h. At that occurred reaction as chymotrypsin- and trypsin-like activity and this reaction was observed

in the core and penumbra. Chymotrypsin-like activity decreased 4.1 times for ischemic areas for short-term MCAO at 6 h of reperfusion compared with controls ($P > 0.05$), for penumbra it decreased 4.5 times compared with controls ($P > 0.05$); at 24 h of reperfusion this activity decreased 3.8 times compared with controls for core zone ($P > 0.05$) and for penumbra it decrease 3.2 times compared with controls ($P > 0.05$); at 72 h of reperfusion this activity for core increased 1.1 times compared with controls ($P > 0.05$) and for penumbra of this period it decrease 1.2 times compared with controls ($P > 0.05$).

Trypsin-like activity decreased 7.1 times for ischemic areas of brain for short-term MCAO at 6 h of reperfusion compared with controls ($P > 0.05$) and it decreased 11 times compared with controls for penumbra at this period ($P > 0.05$); this activity decreased 5.5 times compared with controls at 24 h of reperfusion for core zone ($P > 0.05$) and for penumbra of this period it decreased 1.4 times, at 72 h of reperfusion for core zone this activity increased 1.4 times compared with controls ($P > 0.05$) and it decreased 1.5 times for penumbra.

In long-term MCAO the peak of activity was at 24 h but not at 72. In some areas there are observed reduced activity. In case of long-term activation occurs earlier, that is logically.

Chymotrypsin-like activity decreased 5.5 times compared with controls for ischemic areas of the brain for long-term MCAO at 6 h of reperfusion ($P < 0.05$), for penumbra it decreased 4.5 times compared with controls ($P > 0.05$); this activity for core zone decreased 1.7 times compared with controls at 24 h of reperfusion ($P < 0.05$) and it decreased 1.4 times compared with controls for penumbra ($P > 0.05$); at 72 h of reperfusion this activity for core zone increased 2.2 times compared with controls ($P > 0.05$) and for penumbra of this period it decrease 1.5 times compared with controls ($P > 0.05$) (Fig. 3, b).

Trypsin-like activity decreased 12.5 times compared with controls for ischemic areas of brain for long-term MCAO at 6 h of reperfusion ($P < 0.05$) and it decreased 25 times com-

pared with controls for penumbra at this period ($P < 0.05$); at 24 h of reperfusion for core zone this activity decreased 1.1 time compared with controls ($P > 0.05$) and for penumbra of this period it increased 1.8 times, at 72 h of reperfusion for core zone this activity decreased 1.1 time compared with controls ($P > 0.05$) and it decreased 1.4 times for penumbra ($P > 0.05$).

We should also note that pattern activation of PGPH in core is not strongly differ and is almost the same with all types of proteasome activity (Fig. 2, c). PGPH activity decreased 6.2 times compared with controls for core zone for short-term MCAO at 6 h of reperfusion ($P > 0.05$) and for long-term MCAO it decrease 2.7 times compared with controls ($P < 0.05$); this activity of core zone for short-term MCAO decrease 2.3 times compared with controls at 24 h of reperfusion ($P > 0.05$) and for long-term MCAO it decreased 1.9 times compared with controls ($P > 0.05$); this activity decreased 2.7 times compared with controls at 72 h of reperfusion of core zone or short-term MCAO ($P > 0.05$) and for long-term MCAO of this period it decreased 20 times compared with controls ($P > 0.05$).

Chymotrypsin and trypsin-like activities increase in contralateral area at the period of 72 h reperfusion (Fig. 4). In this case activation was not occurred in group of Long-term MCAO and Short-term MCAO and this activation was not connected with damage of neurons because this is contralateral hemisphere. Activation on this area was not occurred at 24, but at 72 in central zone. This reaction was reactive and more marked for Short-term MCAO than for long-term MCAO. And it distinguishes reaction in contralateral zone between core zones.

DISCUSSION

We have studied changes in proteasome proteolysis during transient occlusion of the middle cerebral artery using method of Koizumi J., duration 2 and 60 min and made the comparison between changes in different types of proteasome activity and severity of ischemic injury and

showed three types of decrease in proteolytic activity (trypsin-like, chymotrypsin-like, PGPH) in the brain tissues.

We have also received data that with increasing time of ischemia, the necrosis size is increased and obtained correlation of these data with behavioral tests that confirm the response to stress or injury. It has been intensively studied because delayed neuronal death provides a window of opportunity for studying ongoing

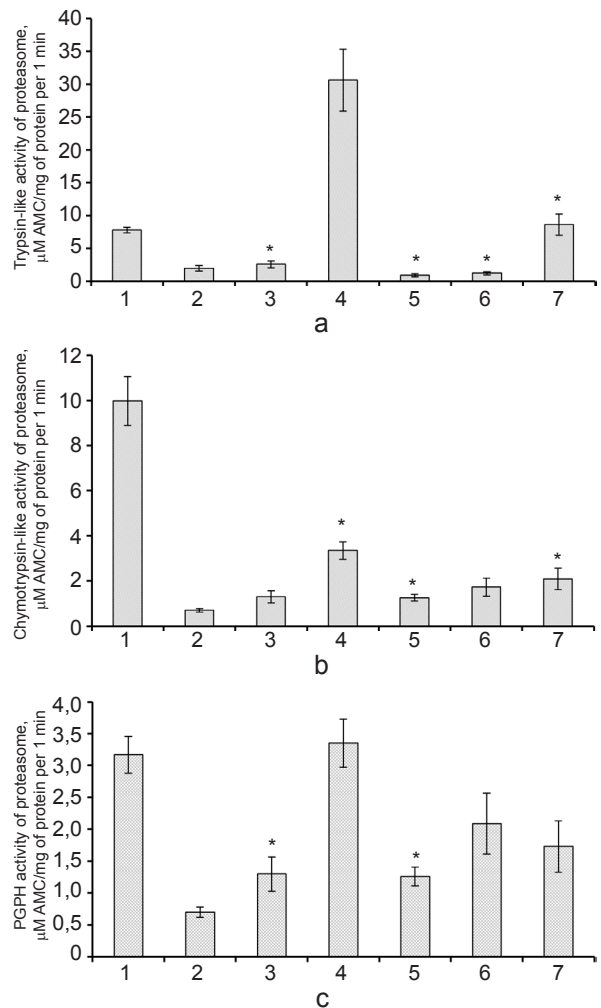


Fig. 4. Trypsin-like (a), chymotrypsin-like (b) and PGPH (c) activities of proteasome in contralateral area after MCAO. 1 – control; 2 – short-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 3 – short-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 4 – short-term MCAO group at 72 h period of reperfusion; 5 – long-term MCAO group at 6 h period of reperfusion; 6 – long-term MCAO group at 24 h period of reperfusion; 7 – long-term MCAO group at 72 h period of reperfusion. $N = 7$. * $P < 0.05$

molecular processes before neuronal death after brain ischemia [15].

Intracellular proteolysis of proteasome activity significantly decreased in brain tissues in modeling transient occlusion of the middle cerebral artery and may have pathogenetic significance. What is the nature - or actually pathological adaptation is a change of proteasome activity in brain tissues during ischemia will determine further stages of proteasome inhibitors.

The current study demonstrates that proteasome activity is decreased after IRI (ischemic reperfusion injury) and may therefore contribute to neuronal injury during IRI. For example, inhibition of the proteasome is sufficient to induce neuron death [16]. In addition to directly inducing neuron death, subtoxic levels of proteasome inhibition would be expected to increase neuronal viability. Proteasome activity is required for most forms of NF κ B activation [17], a transcription factor which has been demonstrated to have neuroprotective properties in vitro and in vivo. Because the proteasome is responsible for the removal of damaged and oxidized proteins [18], impaired proteasome activity may contribute to oxidative stress during IRI. It is interesting to speculate that the increase in proteasome activity in the contralateral hemisphere, which did not undergo significant increases in neuron damage after IRI in the current study, may represent a neuroprotective activation of proteasome activity. Alternatively, low levels of oxidative stress have been demonstrated to stimulate proteasome activity [18] and may account for increases in proteasome activity within the contralateral hemisphere.

All three types of proteasome activities were changed in the aorta, heart tissues, and blood leucocytes in modeling of cholesterol atherosclerosis [14]. The chymotrypsin-, trypsin-like, and PGPH activities of the proteasome occur at distinctive sites within the proteasome. The proteasome degrades substrates in a processive fashion that is believed to be particularly important for preventing the accumulation of partially degraded proteins and the partial degradation of a substrate, which may allow for its contin-

ued functioning. For example, by degrading a regulatory portion, but not the active enzymatic portion of a proteasome substrate, the activity of that substrate could continue to aberrantly function. Alternatively, proteasome inhibition could increase the half-life of proapoptotic proteins within neurons, increasing the toxicity of their activation. It is interesting to point out that pharmacologic inhibition of the proteasome is sufficient to induce caspase activation, which may be due in part to the decreased catabolism of activated caspases (data not shown). Adjusted changes of ubiquitin-proteasome system to sschemia in the postischemic hippocampus, conjugated ubiquitin (Ub) accumulates and free Ub is depleted. The accumulation of conjugated Ub may reflect hypofunction of downstream proteasome activity that normally degrades ubiquitinated proteins. Moreover, direct injection of a proteasome inhibitor into the lateral ventricles of the rat-induced DNA fragmentation in various CNS areas, suggesting that suppression of proteasome is able to induce neuronal apoptosis [19].

Therefore, it is reasonable to speculate that proteasome malfunction may in part underlie the molecular events of the ischemia-induced neuronal death. Decreased proteasome activity at the ischemic core and the surrounding tissues allows accumulation of oxidized proteins, resulting in formation of protein aggregates, ER stress, impairment of cell function, and eventually cell death. In an experimental ischemia of rat brains, a 60% elevation of Ub conjugate levels in the ischemic compared with the non-ischemic animals was observed within 1 hour of recovery. The conjugate immunoreactivity remained at this level for 6 h but eventually decreased to control levels by 24, h of recovery. Increased formation of poly-Ub conjugates was accompanied with a significant increase in the transcription levels of poly-Ub genes [20].

It is likely that the loss of proteasome activity occurs in other age-related neurodegenerative disorders that exhibit increased oxidative damage, including Parkinson's disease and Huntington's disease. It will be important to determine

which environmental and genetic stimuli in each of these disorders mediate decreased proteasome activity.

Numerous studies now clearly demonstrate that inhibition of the proteasome is sufficient to induce cell death in both neuronal and glial cells. These studies have demonstrated that proteasome inhibitors can induce several hallmarks of apoptosis, including caspase activation, cytochrome C release, elevated p53 expression, chromatin fragmentation, and DNA laddering [13, 18]. Recent studies have demonstrated that proteasome inhibition may occur in a wide array of neurodegenerative disorders, including ischemia-reperfusion injury [5], Alzheimer's disease [21], and Parkinson's disease [22]. In each of these conditions, the ability of proteasomes to generate neurogenic substrates from peptides specific for individual proteasome activities has been demonstrated. It is important to point out that while these peptides can be extremely useful as a determinant of proteasome activity, they may not fully account for functional impairments in proteasome activity. For example, the ability to cleave a chymotrypsin-like substrate may be only slightly inhibited in a particular tissue, even though the ability of the proteasome to degrade a specific protein may be severely inhibited [23].

The ability of proteasome inhibition to induce such a wide variety of cell death events suggests that proteasome activity plays a critical role in multiple aspects of neuronal homeostasis.

**O.I. Савчук, М.О. Орловський, Є.С. Ярмолюк,
С.В. Гончаров, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо**

АКТИВНІСТЬ ПРОТЕАСОМИ В ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку спричинює функціональні та структурні зміни його будови. Зокрема, були описані активні або регенеративні процеси, що відбувалися в зонах інфаркту та контралатеральній півкулі. Дослідження проведено на 63 щурах, розподілених на 3 експериментальні групи (по 21 тварині у кожній): група тварин з короткотривалою оклюзією середньої мозкової артерії (ОСМА), група з довготривалою ОСМА

та тварин з удаваною операцією. Визначено зміни трьох видів протеасомної активності в тканинах головного мозку при моделюванні ішемічного пошкодження за допомогою транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії за методикою Koizumi J., та співав., що тривала 2 і 60 хв та проведено порівняння між змінами різних видів протеасомної активності і ступенем ушкодження головного мозку щурів. Було виявлено зниження трьох видів (трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглутамілпептидгідролазної) протолітичної активності в тканині головного мозку. Хімотрипсиноподібна активність ішемічної ділянки мозку при короткостроковій ОСМА знизилася в 4,1 раза ($P > 0,05$), при довгостроковій в 5,8 раза порівняно з контролем ($P < 0,05$). Трипсиноподібна активність ішемічної зони мозку при короткостроковій ОСМА знизилася в 7,1 раза ($P > 0,05$), при довгостроковій в 12,5 раза порівняно з контролем ($P < 0,05$). Пептидилглутамілпептидгідролазна активність ішемічної ділянки при короткостроковій ОСМА зменшилася в 8 разів ($P > 0,05$), при довгостроковій в 2,8 раза в порівнянні з контролем ($P < 0,05$). Подібна динаміка спостерігалася також в зоні напівтіні й ішемічній ділянках мозку при 60 хв реперфузії. в довгостроковій перспективі не відмічається істотної різниці між ішемічною ділянкою та контралатеральною зоною. Отримані результати свідчать про те, що активність протеасоми може відігравати важливу роль у контралатеральній кортикальній пластичності після моделювання ОСМА.

Ключові слова: ішемічний інсульт; фокальна ішемія; протеасома.

**Е.И. Савчук, М.А. Орловский, Е.С. Ярмолюк,
С.В. Гончаров, В.Е. Досенко, Г.Г. Скибо**

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМЫ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Моделирование ишемического повреждения головного мозга вызывает функциональные и структурные изменения его строения. В частности, были описаны активные или регенеративные процессы, происходившие в зонах инфаркта и контралатеральном полушарии. Исследование проведено на 63 крысах, распределенных на 3 экспериментальные группы (по 21 животных в каждой): группа животных с кратковременной окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА), группа животных с долговременной ОСМА и животные с ложной операцией. Определены изменения трех видов протеасомной активности в тканях головного мозга при моделировании ишемического повреждения мозга путем транзиторной окклюзии средней мозговой артерии по методике Koizumi J., и соавт.), которое длилось 2 и 60 мин и проведено сравнение между изменениями различных видов протеасомной активности и степенью повреждения головного мозга крыс. Было выявлено снижение трех видов (трипсино-, химотрипсиноподобной и пеп-

тидилглутамилпептидгидролазной) протеолитической активности в тканях головного мозга. Химотрипсиноподобная активность ишемического участка мозга при краткосрочной ОСМА снизилась в 4,1 раза ($P>0,05$), при долгосрочной в 5,8 раза по сравнению с контролем ($P<0,05$). Трипсиноподобная активность ишемической зоны мозга при краткосрочной ОСМА снизилась в 7,1 раза ($P>0,05$), при долгосрочной в 12,5 раза по сравнению с контролем ($P<0,05$). Пептидглутамилпептидгидролазная активность ишемического участка при краткосрочной ОСМА уменьшилась в 8 раз ($P>0,05$), при долгосрочной в 2,8 раза по сравнению с контролем ($P<0,05$). Подобная динамика наблюдалась также в зоне полутени и ишемических участках мозга при 60 мин реперфузии. В долгосрочной перспективе не отмечается существенной разницы между ишемическим участком и контралатеральной зоной. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность протеасомы может играть важную роль в контралатеральной кортикальной пластичности после моделирования ОСМА.

Ключевые слова: ишемический инсульт; фокальная ишемия; протеасома.

REFERENCES

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125:2-220.
2. Britton P, Lu X-C, Laskosky M, Tortella FC. Dextromethorphan protects against cerebral injury following transient, but not permanent, focal ischemia in rats. *Life Sci*. 1997;60:1729-40.
3. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. 2001;276:30057-63.
4. Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1686-93.
5. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;67:181-98.
6. Ge P, Luo Y, Liu CL, Hu B. Protein aggregation and proteasome dysfunction after brain ischemia. *Stroke*. 2007;38:3230-6.
7. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004;10:10-17.
8. Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*. 2000;383:1-16.
9. Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Mol. Cell Biol*. 2005;6:891-8.
10. Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1686-93.
11. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Stroke*. 1986;8:1-8.
12. Iarmoliuk IeS. Dynamics of functional disorders in different variants of tissue transplantation to activate angiogenesis on the models of focal cerebral ischemia in rats. *Ukr NMM Zh*. 2014;82(3):123-8. [Ukrainian].
13. Dosenko VE, Zagoriĭ VIu, Moĭbenko AA. Effect of proteasomal proteolysis on NO-synthase activity in isolated platelets. *Ukr Biokhim Zh*. 2005;77:39-43.
14. Pashevin DO, Dosenko VE, Byts IuV, Moibenko OO: Proteasome activity changes in the aorta, heart tissues, and blood leucocytes in modelling of cholesterol atherosclerosis. *Fiziol Zh*. 2007;53:3-10. [Ukrainian].
15. Tsybalyuk VI, Iarmoliuk IeS. A modified model of experimental ischemic stroke in rats using silicone coating monofilaments. *Ukr Nevrolog Zh*. 2012; 4:97-105. [Ukrainian].
16. Qiu JH, Asai A, Chi S. Proteasome inhibitors induce cytochrome C-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci*. 2000;20(1):259-70.
17. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*. 1983;258: 8206-14.
18. Ding Q, Dimayuga E, Martin S. Characterisation of chronic low-level proteasome inhibition on neural homeostasis. *Neurochem*. 2003;86:489-97.
19. Tagliatalata G, Kaufmann JA, Trevino A, Perez-Polo JR. Central nervous system DNA fragmentation induced by the inhibition of nuclear factor κ B. *Neuroreport*. 1998;9:489-93.
20. Keller JN, Huang FF, Zhu H, Yu J, Ho YS, Kindy TS. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemia reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1467-73.
21. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, Markesbery WR, Butterfield DA. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem*. 1995;65:2146-56.
22. Cardozo C., Michaud C. Proteasome-mediated degradation of tau proteins occur independently of the chymotrypsin-like activity by a nonproteolytic pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2002;408(1):103-10.
23. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994;79:13-21.

Received 08.04.2015

Influence of single nucleotide polymorphisms of vitamin D receptor-gene on the level of osteoassociated hormones linkage with postmenopausal osteoporosis

D.S. Ziablitsev, O.S. Larin

Ukrainian Science-Practical Centre of Endocrine Surgery, Transplantation of Endocrine Organs and Tissues Ministry of Healthcare of Ukraine, Kyiv; e-mail: denis898@ukr.net; zsv@endosurg.com.ua

The levels of osteoassociated hormones, macroelements, interleukines, cyclic nucleotides and activity of alkaline phosphatase were being detected in the blood plasma of 74 postmenopausal women with and without osteoporosis (OP). Bone mineral density (BMD) and the metacarpal index were being assessed according to the results of densitometry. The allele polymorphisms vitamin D receptor gene (VDR) Cdx2 (rs11568820) and TaqI (rs731236) were being identified with the help of the polymerase chain reaction. The major genotype CC TaqI was found in the group without OP 3.4 times more often than with OP, while the minor genotype TT was found 3.4 times more often with the presence of OP. The presence of the genotype CC TaqI decreased the risk of OP progress by 5.5 times, and the genotype TT TaqI increased by 5.4 times. The presence of the minor allele T was associated with the higher levels of interleukin 1 β , BMD and lower testosterone blood level. The major homozygote AA Cdx2 was found in women without OP 2.9 times more often, while the minor genotype GG – 5.4 times more often with the presence of OP. The presence of the major homozygote decreased the risk of OP progress by more than 5.3 times, while the minor homozygote increased the risk by 8 times. The presence of the minor allele G in the genotype was associated with the increase of parathyroid hormone, phosphorus, magnesium, alkaline phosphatase activity in blood, BMD and with the decrease of testosterone, progesterone and calcium blood levels.

Key words: postmenopausal osteoporosis: hormones: VDR: polymorphism Cdx2 (rs11568820): polymorphism TaqI (rs731236).

INTRODUCTION

Postmenopausal osteoporosis (OP) – is a systemic disease with a multi-factor character, that appears in postmenopausal women as a result of the deficit of sex hormones and first of all the estrogen [1]. The disease is characterized by reduction in bone mass and microarchitectonic deterioration of bone tissue, which leads to the increase in the risk of bone fractures [2]. The regulation of the bone tissue's remodelling implements at the local level (cytokines and growth factors) and the system level (hormones) [3, 4]. Parathyroid hormone (PTH) and calcitonin (CT) are the main regulatory hormones of the calcium-phosphoric metabolism. The specific protein of bone matrix – osteocalcin (OC)

is the marker of the remodelling. The level of calcium (Ca) in the blood stream depends on the process of its absorption in the small intestine, which, in turn, is regulated by the metabolites of vitamin D with a hormonal activity – calcitriol, which activates nuclear receptor to vitamin D (VDR), that increases the expression of gene in more than 30 target organs [5-7]. It is the physiological transcription of VDR that realizes in full effects of vitamin's D metabolites on bone's tissue, which is characteristic for typical genetically-determined processes [6, 8]. The initiation of transcription is carried out by two codons in the DNA sequence of VDR. TaqI-polymorphism in the second gene's exon of VDR emerges as a result of the substitution of thymine for cytosine in the first of two sites.

© D.S. Ziablitsev, O.S. Larin

Consequently, protein, shorter by three amino acids, is synthesized (the transcription begins with the second site of initiation, which is localized for three codons further) [8, 9]. It leads to disturbance of Ca absorption in the small intestine and to hypocalcemia. Polymorphism in the site restriction Cdx2 of VDR gene leads to reduction of bone mass density (BMD) and increases the risk of bone fracture [10,11], also it has influence on variations of BMD [12]. The absence of Cdx2-polymorphism of VDR gene has a protective role in the progress of osteoporosis [11-13].

Therefore, the aim of these work is to define the connection between single nucleotide polymorphism of VDR gene (TaqI (T61968C; rs731236) and Cdx2 (G3731A; rs11568820) and the risk of the development of the OP, the level of osteoassociation hormones and the biologically active substances in postmenopausal women.

MATERIAL AND METHODS

74 women in postmenopause were examined. Among them 30 patients (40,5%) without OP formed the control group of genetic research (control). 44 women with the manifestation of OP (59,5%) formed the group of study (cases). Bone mineral density (BMD) and the metacarpal index (MCI) were being assessed according to the results of densitometry ("QDR-4500-Delphi-Hologic", USA). Using the biochemical analyzer "BS-200" (China) the activity of ALP, Ca, phosphorus (P) and magnesium (Mg) was examined in the blood serum ("La Chema", Czech Republic). The content of PTH, CT, OC and also estradiol (E2), progesterone (PG), testosterone (TS), cortisol (CS), insulin (IN), triiodthyronine (T3), thyroxine (T4), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), interleukin (IL) 1 β and tumor necrosis factor alpha (TNF α) (sets "VectorBest", Russia; "Amercham pharmacia biotech", Great Britain; "DRG", USA) was studied using the immunoassay method. Single nucleotide polymorphisms (SNP) were detected by the polymerase chain reaction ("OsteoGen-

M", Russia) by the standard method: the isolation of DNA, the conduction of amplification reaction with specific primers, enzymatic hydrolysis of amplification products, electrophoretic separation with a subsequent registration of the obtained DNA fragments transient UV-light. After electrophoresing of fission products their enzymatic hydrolysis was carried out. Positive control was noted when there appeared bands of proper sizes fitting the sizes of the amplicon's fragment. Statistical calculation was made with the help of the «STATISTIKA 7.0» (StatSoft, Inc.) program. The statistical significance of the distinction in frequency distribution of the genotypes occurrence between the groups was defined by F-test. Reliability in distinction of genotypes and alleles distribution between the groups, as well as compliance of the distribution according to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were estimated by analysing of linkage tables by χ^2 criterion. Distribution of the genotypes in the groups with and without OP was considered reliable providing an accordance to HWE for the groups of control and cases.

The level of genotype association with OP was determined according to the odds ratios (OR), that characterizing the relative risk (chances) for a disease development in the given case depending on the allelic polymorphism of the tested gene. The level of OR higher than 1 tells for the trustworthy increase in risk, provided that it is in the confidence interval (CI=95%). The level of OR lower than 1 tells for the trustworthy decrease in risk the credibility of the allelic genes variants influence on the clinical-laboratory rates was estimated by using ANOVA/MANOVA for the F-test. The credibility of the distinction between the averages was estimated by the Student t-test.

RESULTS AND THEIR DISCUSSION

The results of the study (Fig. 1) have indicated that frequencies of VDR genotypes TaqI distribution represented a significant difference between the groups of patients in case of the

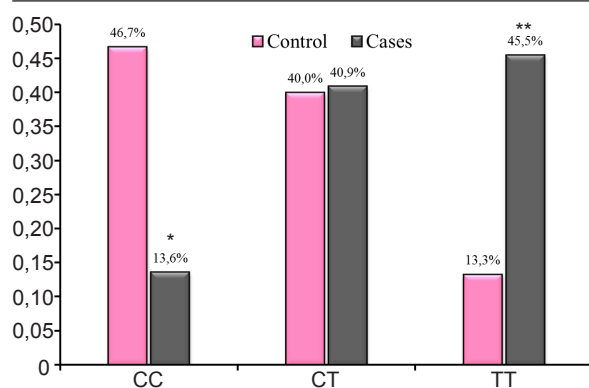


Fig.1. Frequencies (%) distribution of the genotype polymorphisms TaqI VDR gene. * the significance of the frequencies distinction between the groups based on the F-test ($p_{(F)}=0,03$); ** the significance of the frequencies distinction between the groups based on the F-test ($p_{(F)}=0,04$)

homozygous genotypes occurrence. Thus major homozygous genotype (CC) occurred in the group without OP in 46,7% cases, and with OP – in 13,6% (3.4 times more often, which was significant according to the F-test). The minor homozygous genotype, on the contrary, was found more often involving presence of OP – 45,5%, vs 13,3% in the group without OP (3.4 times more often, which was also significant according to the F-test). Frequencies distribution of the heterozygous genotypes did not differ one from another.

As it can be seen from the table 1, the dependence of the VDR genotypes distribution on the presence or absence of OP respectively

Table 1. The significance of the genotype polymorphisms TaqI VDR gene distribution between the groups of women with and without OP and odds ratio in association with their genotypes

Genotypes	Control	Cases	χ^2	p (χ^2)	OR	95 % confidence interval
CC	14	6			0,18	0,04 - 0,88
CT	12	18	6,44	0,04	1,04	0,27 - 3,96
TT	4	20			5,42	0,98 - 29,92

Table 2. The significance of the allele polymorphisms TaqI VDR gene distribution between the groups ($p(\chi^2)$) and odds ratio (OR)

Allele	Control	Cases	χ^2	p (χ^2)	OR	95 % confidence interval
C	20	15	7,59	0,006	0,26	0,10 - 0,69
T	10	29			3,87	1,45 - 10,33

was detected ($p(\chi^2)=0,04$). HWE for the group without OP and with it for polymorphic variant of VDR gene agreed, since, respectively: $\chi^2=0,15$; $p=0,97$ and $\chi^2=0,18$; $p=0,96$.

The presence of major homozygote (CC) decreased the risk of OP development by 5.6 times (OR=0,18; CI=0,04-0,88), while the homozygous state of the minor genotype (TT) increased the risk by 5.4 times (OR=5,42; CI=0,98-29,92).

Therefore, it can be affirmed that the presence of the major homozygote CC TaqI had a protective role to the OP development, whereas the presence of the minor homozygote TT, on the contrary, was conducive to the OP development. The risk of the OP development was decreased by 5.5 times in the first case, and in the second case it was increased by 5.4 times.

The obtained conclusions agreed with the data displayed in the table 1. The minor allele (T) presence in genotype increased the risk of OP development nearly by 4 times (OR=3,87; CI=1,45-10,33).

The VDR gene polymorphism TaqI reliably influenced the level of TS, IL1 β in the blood and also the BMD (table 3).

Herewith the presence of the minor genotype TT was associated with the higher levels of IL1 β and BMD. At the same time, the presence of the minor genotype TT favoured the lower TS blood level. It represented the biological role of these regulatory factors in the bone tissue mineralization process and agreed with the previously

Table 3. The influence of the genotype polymorphisms TaqI VDR gene on clinical-laboratory rates (M±m) in women with OP

Rates	Genotypes			F	P
	CC (n=20)	CT (n=30)	TT (n=24)		
PTH; pg/ml	27,67±3,56	38,89±7,48	55,40±6,27	3,23	0,06
CT; pg/ml	8,67±1,08	8,78±1,16	8,00±0,87	0,19	0,82
OC; ng/ml	13,00±1,02	15,89±3,94	17,40±0,57	2,81	0,085
E2; pmol/l	43,33±32,54	32,89±12,68	11,90±1,75	2,10	0,15
PG; nmol/l	25,67±10,35	26,56±3,96	22,20±3,63	0,36	0,70
TS; nmol/l	6,50±0,34	5,03±0,90	3,15±0,87	3,54	0,48
CS; nmol/l	453,00±52,94	533,00±82,67	495,00±21,88	0,62	0,54
IN; mcMhO/ml	12,67±1,78	11,33±0,90	12,20±1,29	0,26	0,77
T4; nmol/l	122,33±5,40	109,22±5,21	111,60±6,51	0,70	0,51
T3; nmol/l	1,67±0,11	2,01±0,16	2,17±0,13	2,27	0,13
cAMP; ng/ml	4,67±0,41	4,89±0,41	4,70±0,50	0,06	0,94
IL1β; pg/ml	10,34±2,68	11,44±1,78	15,60±1,10	3,64	0,04
TNF1α; pg/ml	54,33±3,51	57,27±0,18	54,35±1,32	2,22	0,14
ALP; U/l	139,34±15,00	146,67±6,26	123,70±9,53	0,82	0,82
Ca; mg/l	60,33±0,82	59,47±0,79	57,62±0,80	2,48	0,11
P; mg/l	382,87±9,71	406,79±9,20	419,20±8,15	2,66	0,09
Mg; mg/l	32,63±3,16	34,07±1,09	34,67±1,22	0,39	0,60
BMD; SD	1,39±0,18	1,57±0,01	2,16±0,09	7,20	0,0047
MCI; s.u.	0,41±0,02	0,41±0,01	2,16±0,09	1,00	0,38

obtained results [9, 13]. The highest value of the F-test ($F=7,2$; $p=0,0047$) was noted for BMD.

Polymorphism in the site of connection with the transcription factor Cdx2 in the promoter region of VDR gene is associated with the level of Ca absorption in an intestine and with the receptor's activation to vitamin D [11]. It is shown in our study (Fig. 2), that the major homozygote (AA) was found in women without OP in 53,3 % cases, and with OP approximately three times less (in 18,2 % cases). In other words, genotype (AA) in the group without OP symptoms was found 2,9 times more often, which is statistically significant according to F-test. The minor homozygous genotype (GG), on the contrary, was found 5.4 times more often: with OP – in 36,4 % cases vs 6,7 % in the group without OP, that is also statistically significant according to F-test. Frequencies of the distribution of heterozygous

genotypes did not differ one from another.

As in the preceding case (tabl. 1), the dependence of genotype polymorphisms Cdx2

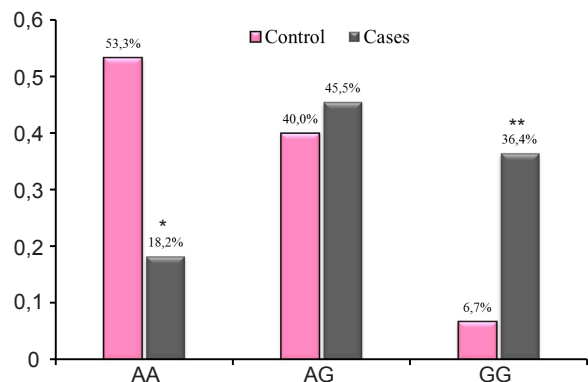


Fig. 2 Frequencies (%) of the genotype polymorphisms Cdx2 VDR gene distribution. * the statistical significance of the frequencies distinction between the groups basing on F-test ($p(F)=0,02$); ** the statistical significance of the frequencies distinction between the groups basing on F-test ($p(F)=0,04$)

VDR gene on the presence or absence of OP ($p(\chi^2)=0,04$) was revealed (table 4). HWE for the groups with and without OP for the polymorphic variant of Cdx2 polymorphism (G3731A)

Table 4. The significance of the allele polymorphisms Cdx2 VDR gene distribution between the groups ($p(\chi^2)$) and odds ratio (OR)

Genotype	Control	Cases	χ^2	$p(\chi^2)$	OR	95 % confident interval
AA	16	8			0,19	0,04 - 0,86
AG	12	20	6,49	0,04	1,25	0,33 - 4,73
GG	2	16			8,00	0,88 - 72,70

was respectively (according $\chi^2=0,01$; $p=1,04$ and $\chi^2=0,08$; $p=1,00$). The presence of the major homozygote (AA) decreased the risk of OP progress by 5.3 times (OR=0,19; CI=0,04-0,86), while the homozygosis state of the minor genotype (GG) increased the risk by more than 8 times (OR=8,00; CI=0,88-72,70).

Accordingly, the presence the major homozygote genotype of the Cdx2 VDR gene (AA) had a protective role to the OP development, whereas the presence of the minor homozygote (GG), on the contrary, was conducive to the OP development. The risk of the OP development decreased by 5.3 times in the first case, and in the second case it increased by 8.0 times. It corresponded to the obtained data on the VDR gene polymorphism (T61968C) [2].

The data, displayed in the table 5 confirmed the identified patterns. The presence of the minor allele (G) in the genotype increased the risk of OP development almost by 4 times (OR=3,97; CI=1,45-10,88).

The polymorphism Cdx2 of the VDR gene reliably influenced the levels of PTH, PG, TS, Ca, P, Mg, ALP activity in blood and BMD (table 6).

According to the data of the conducted ANOVA/MANOVA, the presence of the minor genotype GG was associated with the increase of PTH, P, Mg, ALP-activity in the blood and BMD.

Herewith the presence of genotype GG led to the decrease of PG, TS and Ca blood levels. The greatest rate for the F-test ($F=13,85$; $p=0,00014$) was noted for the ALP-activity, which also confirmed the potential impact of the minor allele (G) on the process of the OP development.

CONCLUSIONS

The major genotype CC TaqI of the VDR gene was found in the group without OP 3.4 times more often than with OP, while the minor genotype TT was found 3.4 times more often with the presence of OP. The presence of the genotype CC TaqI decreased the risk of OP progress by 5.5 times, and the genotype TT TaqI – increased by 5.4 times. The presence of the minor allele T was associated with the higher levels of IL1 β , BMD and lower TS blood level.

The major homozygote AA Cdx2 of the VDR gene was found in women without OP 2.9 times more often, while the minor genotype GG – 5.4 times more often with the presence of OP. The presence of the major homozygote decreased the risk of OP development by more than 5.3 times, while the minor homozygote increased the risk by 8 times. The presence of the minor allele G in the genotype was associated with the increase of PTH, P, Mg, ALP-activity in blood, BMD and with the decrease of PG, TS and Ca blood levels.

Table 5 The significance of distinction the VDR gene allele distribution between the groups and the odds ratio (OR)

Alleles	Control	Cases	χ^2	$p(\chi^2)$	OR	95 % confidence interval
A	22	18			0,25	0,09 - 0,69
G	8	26	7,55	0,006	3,97	1,45 - 10,88

Table 6. The influence of the genotype polymorphisms Cdx2 VDR gene on clinical-laboratory rates (M±m) in women with OP

Rates	Genotypes VDR (-3731A/G)			F	P
	AA (n=24)	AG (n=32)	GG (n=18)		
PTH; pg/ml	50,00±11,22	31,30±6,97	59,25±4,08	6,18	0,0095
CT; pg/ml	9,50±1,20	8,30±0,89	8,00±1,61	0,39	0,68
OC; ng/ml	14,75±1,44	15,20±1,24	18,13±0,62	2,97	0,07
E2; pmol/l	35,50±26,49	31,10±10,71	11,50±2,84	1,36	0,28
PG; nmol/l	36,75±3,42	27,10±3,38	15,00±2,31	10,99	0,0006
TS; nmol/l	6,67±0,51	4,75±0,81	2,76±0,90	5,27	0,015
CS; nmol/l	425,75±76,69	542,00±40,96	497,88±36,63	1,67	0,22
IN; mcMhO/ml	12,25±0,78	10,80±1,44	13,13±2,01	1,29	0,29
T4; nmol/l	117,00±7,45	112,30±7,08	109,38±10,62	0,27	0,77
T3; nmol/l	1,72±0,13	2,04±0,13	2,19±0,17	2,17	0,14
cAMP; ng/ml	4,00±0,47	5,00±0,44	4,88±0,62	0,98	0,39
IL1β; pg/ml	15,25±2,51	11,00±1,71	14,87±1,45	2,37	0,12
TNF1α; pg/ml	55,10±2,34	56,49±0,94	54,57±1,89	0,74	0,50
ALP; U/l	102,50±9,89	143,80±6,39	152,13±4,48	13,85	0,00014
Ca; mg/l	60,90±0,12	59,50±0,70	56,73±0,91	8,55	0,0022
P; mg/l	382,13±8,27	405,06±10,17	427,83±8,38	6,62	0,0065
Mg; mg/l	30,75±2,21	33,68±0,85	36,42±1,38	5,44	0,013
BMD; SD	1,83±0,18	1,51±0,17	2,20±0,14	6,65	0,0064
MCI; s.u.	0,39±0,01	0,41±0,01	0,39±0,02	2,51	0,107

Д. С. Зяблицев, О. С. Ларін

ВПЛИВ ОДНОНУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА VDR НА РІВЕНЬ ОСТЕОАСОЦІЙОВАНИХ ГОРМОНІВ ПРИ ПОСТМЕНОПАУЗНОМУ ОСТЕОПОРОЗІ

У плазмі крові 74 жінок у постменопаузному періоді з та без остеопорозу визначали вміст остеасоційованих гормонів, макроелементів, інтерлейкінів, циклічних нуклеотидів та активність лужної фосфатази. Мінеральну щільність кістки (МЩК) і метакарпальний індекс оцінювали згідно з результатами денситометрії. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції виявляли алельні поліморфізми гена рецептора вітаміну D (VDR) Cdx2 (rs11568820) та TaqI (rs731236). Наявність генотипу CC TaqI знижувала ризик прогресування ОП в 5,5 раз, а генотипу TT TaqI – підвищувала в 5,4 раз. Наявність мінорної алелі T було асоційовано з більш високим вмістом інтерлейкіну 1β, МЩК і нижчим – тестостерону в крові. Мажорна гомозигота AA Cdx2 була виявлена у жінок без ОП в 2,9 раз частіше, тоді як мінорний генотип GG – в 5,4 раз частіше за наявності ОП. Мажорної гомозигота знижувала ризик прогресії ОП більш ніж в 5,3 раз, тоді як мінорна підвищувала його в 8 разів. Наявність мінор-

ної алелі G в генотипі було асоційовано з підвищенням у крові вмісту паратиреоїдного гормону, фосфору, магнію, активності лужної фосфатази, МЩК та зі зниженням вмісту прогестерону, тестостерону і кальцію.

Ключові слова: постменопаузний остеопороз; гормони; VDR; поліморфізм Cdx2 (rs11568820); поліморфізм TaqI (rs731236)

Д. С. Зяблицев, А. С. Ларин

ВЛИЯНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА VDR НА УРОВЕНЬ ОСТЕОАССОЦИИРОВАННЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ПОСТМЕНОПАУЗНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

В плазме крови 74 женщин в постменопаузном периоде с и без остеопороза (ОП) определяли содержание остеасоциированных гормонов, макроэлементов, интерлейкинов, циклических нуклеотидов и активность щелочной фосфатазы. Минеральную плотность кости (МПК) и метакарпальный индекс оценивали по результатам денситометрии. С помощью полимеразной цепной реакции определяли аллельные полиморфизмы

гена рецептора витамина D (VDR) Cdx2 (rs11568820) и TaqI (rs731236). Присутствие генотипа CC TaqI снижала риск развития ОП в 5,5 раза, а генотипа TT TaqI – повышала в 5,4 раза. Присутствие минорной алели T было ассоциировано с более высокими уровнями интерлейкина 1 β , МПК и низким уровнем тестостерона в крови. Мажорная гомозигота AA Cdx2 была выявлена у женщин без ОП в 2,9 раза чаще, тогда как минорный генотип GG – в 5,4 раза чаще при наличии ОП. Мажорной гомозигота снижала риск развития ОП более чем в 5,3 раза, тогда как минорная повышала его в 8 раз. Присутствие минорной аллели G в генотипе было ассоциировано с повышением содержания паратиреоидного гормона, фосфора, магния, активности щелочной фосфатазы в крови, МПК и со снижением уровней в крови прогестерона, тестостерона и кальция.

Ключевые слова: постменопаузальный остеопороз; гормоны; VDR; полиморфизм Cdx2 (rs11568820); полиморфизм TaqI (rs731236)

REFERENCES

1. Kulakov VI, Manukhin IB, Soloveva Gynecology: National Guidness. 2011: 848. [Russian].
2. Yakushevskaya OV, Yureneva SV. Pathogenetic bases of the sharp phase development of the response to intravenous administration of nitrogen-containing bisfosfonat. *Obstetrics and Gynecol.* 2013;5: 19-23. [Russian].
3. Mishchenko EB. Importance assessment of the external and internal risk factors of osteoporosis development. *Intern Endocrinol J.* 2011. 1 (33): 15-21. [Russian].
4. Bischoff L., Derk CT. Premenopausal osteoporosis. *Minerva Medica J.* 2008: 99 (1): 55-63.
5. Povoroznyuk VV, Masik NP, Pirogova NI, 2015. Bone tissue markers and their clinical value at a chronic obstructive pulmonary disease. *Health of Kazakhstan* 202/33:50-8. [Russian].
6. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue Internat.* 2013. 92 (2): 77-98.
7. Schunack W. Vitamin D3 a prodrug of different D3-hormones. 101 Suppl 1: *Medizinische Klinik (Munich, Germani).* 2006 Jun 20-24: 20-4.
8. Li WF, Hou SX, Yu B, Li MM. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Human Genetics.* 2010. 127 (3): 249-285.
9. Casado-Diaz A, Cuenca-Acevedo R, Navarro-Valverde C. Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. *Molecul Biol.* 2012: 0960 (12): 192–6.
10. Baig L, Mansuri FA, Karim SA. Association of menopause with osteopenia and osteoporosis: results from population based study done in Karachi. *J Coll Physic and Surg Pakistan.* 2009; 19 (4): 240-4.
11. Jia F, Sun RF, Li QH, Wang DX, Zhao F, Li JM, Pu Q, Zhang ZZ, Jin Y, Liu BL, Xiong Y. Genetical Testing of Molecular Biomarkers. 2015; 30-34. PubMed doi:10.1089/gtmb.2012.0267.
12. Xu H, Li S, Qiu JQ, Gao XL, Zhang P, Yang YX. The VDR gene Fok I polymorphism and ovarian cancer risk. *Tumour Biol:* 2013 Dec; 3309-16.
13. Ziablitsev DS, Pishchulina SV, Kishenya MS, Chernobrivtsev AP. Value of vitamin D receptor gene polymorphisms in the pathogenesis of osteodeficiency of postmenopausal period women. *Morph Bull.* 2014; 2 (20): 432-5. [Russian].

Received 19.05.2015

Біоелектрична активність інтернейронів спинного мозку самиць білих щурів за умов експериментальної менопаузи

О.Г. Родинський, С.С. Ткаченко

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»; e-mail: tkachenkoss@i.ua

Аналізували особливості параметрів збудливості та амплітудно-часових характеристик компонентів потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку статевозрілих самиць білих щурів в умовах експериментальної менопаузи. Встановлено підвищення порога збудження аферентних волокон спинного мозку на 102,14% та латентного періоду на 94,12% у тварин після оваріоектомії. За умов супрамаксимальної стимуляції дорсального корінця L5 виявлено зростання амплітуди компонентів N_1 на 10,14%, N_2 на 11,82%, N_3 на 48,28%, та P -хвилі на 31,58% і збільшення тривалості N_3 -компонента на 26,54% в дослідній групі. При стимуляції парними імпульсами на часовому проміжку від 2 до 3 мс спостерігалось вірогідне ($P < 0,01$) збільшення, а з 6 по 30 мс – пригнічення N_1 -компонента другого ПДП у групі тварин з експериментальною менопаузою. Таким чином, отримані нами результати дають змогу зробити висновок про різноспрямовані зміни збудливості у нервових структурах заднього рогу спинного мозку за умов нестачі естрогенів.

Ключові слова: менопауза; потенціал дорсальної поверхні спинного мозку; інтернейрон; щури-самиці.

ВСТУП

При клімаксі або в передклімактеричний період жінки часто скаржаться на м'язові і суглобові болі, м'язове напруження, акропарестезії [1]. Такі симптоми можуть бути викликані прискореним розвитком інволютивних форм остеоартрозу і остеохондрозу в результаті дегенеративно-дистрофічних процесів у сполучнотканинних утвореннях (зв'язковий апарат, міжхребцеві диски), а також розвитком системного остеопорозу, що проходять більш прискорено на тлі дефіциту естрогенів [1,2]. Має особливе значення і модулювальний вплив жіночих статевих гормонів на центральну нервову систему, зокрема - ноцицептивну чутливість [3] через дію на глутаматіндуковані струми, інгібування рецепторів ГАМК і гліцину, або модуляції опіоїдних рецепторів у задніх рогах спинного мозку [4,5,6], що також може впливати на виникнення больових симптомів

© О.Г. Родинський, С.С. Ткаченко

у м'язах і суглобах в постменопаузі. Основна дія естрогену на нейрони здійснюється через активацію ядерних α - і β -рецепторів естрогену ($ER\alpha/\beta$), що викликає довгострокові геномні ефекти [7], а також активацію цитоплазматичних механізмів сигналізації поблизу плазматичної мембрани або на її поверхні [8] і здійснюється через мембранні класичні ERs [9] та новостворені ERs [10]. Дослідження показали, що $ER\alpha$ особливо виражені в I, II та IV пластинках сірої речовини дорсального рогу спинного мозку, і є найбільш поширеними у нижніх поперекових і крижових сегментах [11]. Відомо, що ноцицептивна передача може бути полегшена блокуванням $ER\alpha$ селективним антагоністом метил-піперидин-піразолом (МРР). Також показано, що в задніх рогах спинного мозку тварин $ER\alpha$ бере участь у модуляції больової Ад- і С-афферентної передачі [12]. Ці дані створюють основу для висунення гіпотези, що естроген, через активацію $ER\alpha$, безпосе-

редньо може регулювати передачу болю на центральному рівні [13].

Естрогеніндуковане потенціювання глутаматних струмів та інгібування ГАМК і гліцинових рецепторів може відігравати роль в активації центральних шляхів болю [14]. Однак є дослідження, згідно з якими активація ER α естрогеном може перешкоджати ноцицептивній передачі через шляхи сигналізації за участю протеїнкінази С. Таким чином, ER α -опосередковане негативне регулювання ноцицептивної передачі, можливо, якоюсь мірою урівноважене дією естрогену на інші рецептори [12]. Треба зазначити, що у наших попередніх дослідженнях було підтверджено наявність достовірних змін у периферичних структурах у щурів експериментальної групи, зокрема, у нервово-м'язовому апараті, за умов дефіциту естрогенів [15].

Метою цього дослідження було вивчити параметри збудливості інтернейронних пулів та амплітудно-часові характеристики компонентів потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку в умовах експериментальної менопаузи у самиць білих щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 30 статевозрілих щурах лінії Вістар віком 6–8 міс, масою 180–240 г, яких було розділено на 2 групи. Перша група – інтактні тварини (n=14), друга – тварини з експериментальною менопаузою (n=16). Менопаузу у самиць щурів модельювали малоінвазивною оваріогістеректомією через серединний лапаротомічний доступ [15]. У контрольній групі виконували оперативне втручання – серединну лапаротомію. Обидві групи тварин утримували в стандартних умовах віварію (22±2°C, світлий/темний цикл – 12/12 год) на стандартній дієті протягом 120 діб, після чого їх брали у гострий експеримент [16]. Під загальною анестезією тіопенталом натрію («Sigma», США, 50 мг/кг) виконували ламінектомію та розтин твердої мозкової оболонки спинного мозку. Потім

спинний мозок перетинали на рівні сегментів Th₁₂-L₁ та заливали вазеліновим маслом. Для усунення проявів спінального шоку тварину витримували 3 год за 36°–37 °С [17,18].

При аналізі параметрів ПДП спинного мозку було застосовано супрамаксимальну силу подразнення (5 П), якої достатньо для активації всіх низькопорогових аферентів [17]. Подальше збільшення інтенсивності подразнення не викликало підвищення амплітуди цього показника.

Дорсальний корінець L₅ стимулювали за допомогою біполярних електродів прямокутними поодинокими імпульсами тривалістю 0,3 мс і амплітудою від 1 до 5 П, а також парними стимулами з інтервалом нанесення від 2 до 1000 мс. ПДП відводили у фокусі максимальної активності за допомогою монополярного срібного кулькового електрода. Референтний електрод розміщували на м'язі нижньої кінцівки [17]. Для стимуляції використовували стандартну електрофізіологічну апаратуру. Реєстрували ПДП за допомогою аналого-цифрового перетворювача та персонального комп'ютера. Досліджувалися такі параметри ПДП: поріг, хронаксію, тривалість латентного періоду, загальну тривалість ПДП, тривалість та амплітуду аферентного піку, N₁, N₂, N₃-компонентів та Р-хвилі [18].

Для обробки результатів використовували: розрахунок показників наочності у відсотках, середню арифметичну та похибку середньої (M±m). Вірогідність оцінювали за допомогою методів параметричної статистики (критерій t Стьюдента). Зміни показників вважали вірогідними при P<0,05 та P<0,01. Всі експериментальні процедури були виконані відповідно до Європейської директиви Ради співтовариств від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні параметрів збудливості було встановлено, що за умов експеримен-

тальної менопаузи у самиць щурів значення порогового подразнення аферентних волокон дорсальних корінців збільшилася на $102,14 \pm 14,29\%$ ($P < 0,01$). Хронаксія ПДП при цьому зменшувалася на $7,1 \pm 4,37\%$. Проте ця зміна вірогідною не була ($P > 0,05$, рис. 1). Латентний період у тварин після оваріоектомії зростав на $94,12 \pm 6,06\%$ ($P < 0,01$, рис. 2).

При аналізі компонентів ПДП за умов супрамаксимальної стимуляції дорсального корінця спинного мозку за умов дефіциту естрогенів (рис. 3) було виявлено збільшення порівняно з інтактною групою амплітуди компонента N_1 на $10,14 \pm 2,63\%$ ($P = 0,05$), N_2 на $11,82 \pm 2,64\%$ ($P < 0,05$), N_3 на $48,28 \pm 4,65\%$ ($P < 0,01$), та Р-хвилі на $31,58 \pm 8,0\%$ ($P = 0,05$). Амплітуда аферентного піку суттєво не змінювалася. Тривалість компонентів ПДП змінювалася різноспрямовано. Так, у N_3 -компонента вона збільшилася на $26,54 \pm 5,47\%$ ($P < 0,05$); тривалість аферентного піку збільшилася на $9,38 \pm 4,29\%$, а N_1 зменшилася на $11,24 \pm 3,80\%$, проте ці зміни не були достовірними ($P > 0,05$). Тривалість компонента N_2 та Р-хвилі, як і загальна тривалість ПДП, суттєвих змін не зазнавала (див. рис. 2).

Для з'ясування змін деполяризації первинних аферентів спинного мозку внаслідок процесів пресинаптичного гальмування за умов експериментальної менопаузи було використано метод парної стимуляції [17]. При цьому на часовому проміжку від 2 до 3 мс спостерігалось вірогідне збільшення, а з 6 по 30 мс – пригнічення N_1 -компонента другого ПДП у групі тварин з менопаузою ($P < 0,01$, рис. 4).

Згідно з більш ранніми дослідженнями [18], в результаті ішемії змінювалася швидкість проведення в аферентних волокнах дорсального корінця з аналогічними змінами у пресинаптичних компонентах ПДП, що проявлялось у збільшенні латентності аферентного піку. Це може пояснювати збільшення латентного періоду та деяке подовження аферентного піку, виявлені нами в експериментальній групі (див. рис. 2).

Причиною гіпоксії нервових стовбурів може бути гіпоестрогенемія, оскільки відома наявність прямих судинних ефектів цих гормонів та їх вплив на гемодинаміку в різних судинних регіонах. Одним з ефектів є значне підвищення завдяки естрогенам утворення оксиду азоту NO через збільшення вмісту кальційзалежної синтетази оксиду азоту у клітинах ендотелію судин [2]. До того ж, маючи активні антиоксидантні властивості, естрогени пригнічують перекисне окиснення ліпопротеїдів низької щільності, окиснені форми яких інгібують NO. Також ці гормони, підвищенням транскрипції генів ферментів простагліцинісинтетази і циклооксигенази, стимулюють утворення простагліцину, який пригнічує вазоконстрикторні реакції на ендотелін-1 та зменшує пресорний ефект ангіотензину II [2]. Ішемія нервових шляхів, викликана гальмуванням чи повною відсутністю вказаних вище ефектів, розвиватиметься на фоні підвищеної чутливості нервових структур до гіпоксії, що також може бути зумовлено дефіцитом естрогенів з нейропротекторними ефектами, значущим механізмом яких є їх здатність активувати ген VEGF

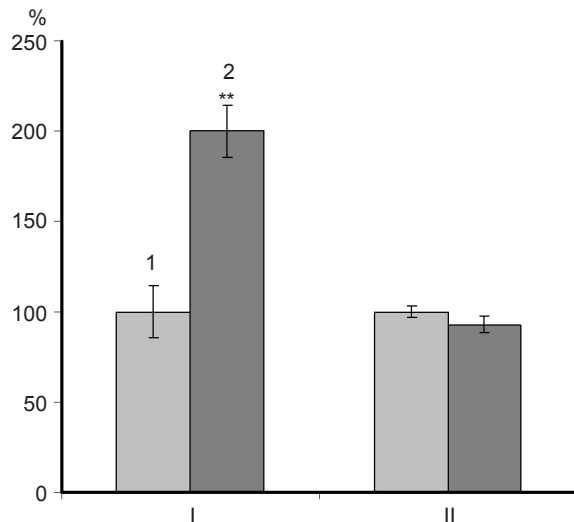


Рис 1. Характер змін основних параметрів потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку (I – порога; II – хронаксії) за умов експериментальної менопаузи: 1-інтактні тварини, 2-тварини з менопаузою. ** $P < 0,01$ – вірогідність порівняно з контролем

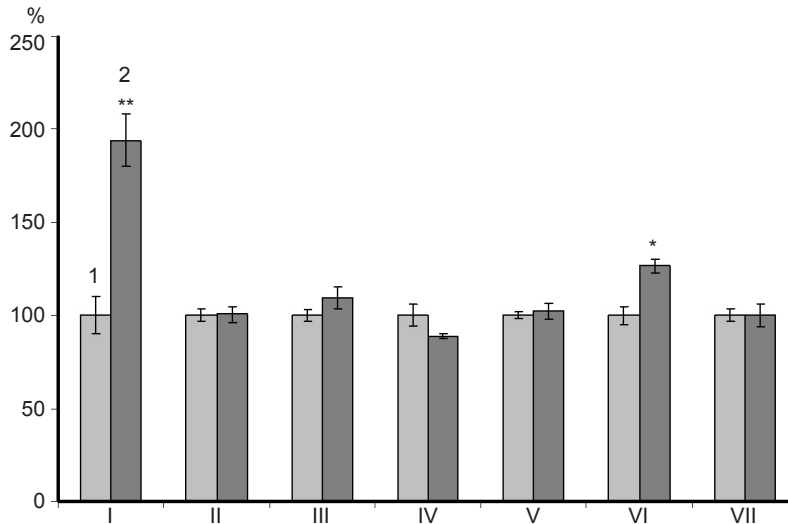


Рис. 2. Зміни часових характеристик потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку у тварин з експериментальною менопаузою (2) порівняно з інтактною групою (1): I – латентний період, II – загальна тривалість ПДП, III – тривалість аферентного піку, IV, V, VI – N_1 , N_2 , N_3 -компонентів відповідно, VII – P-хвилі ПДП. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ – вірогідність порівняно з контролем

(судинний ендотеліальний фактор росту), що значно підвищується в умовах гіпоксії [19].

Зафіксоване нами збільшення латентного періоду та порога ПДП у тварин дослідної групи також можна пояснити тим, що деструктивні зміни організації мікроструктури аксолеми внаслідок порушення організації мікротрубочок аксонів, особливо в мієлінізованих волокнах, негативно впливають на

збудливість і швидкість проведення імпульсу нервовими волокнами [16].

Відомо, що естрогени за допомогою активації ER α у дорсальному розі сірої речовини спинного мозку зменшують збудливу глутаматергічну передачу при подразненні аферентних волокон як A δ - так і C-типу [12]. Дефіцит же естрогенів може призводити до зворотного ефекту, що пояснює збіль-

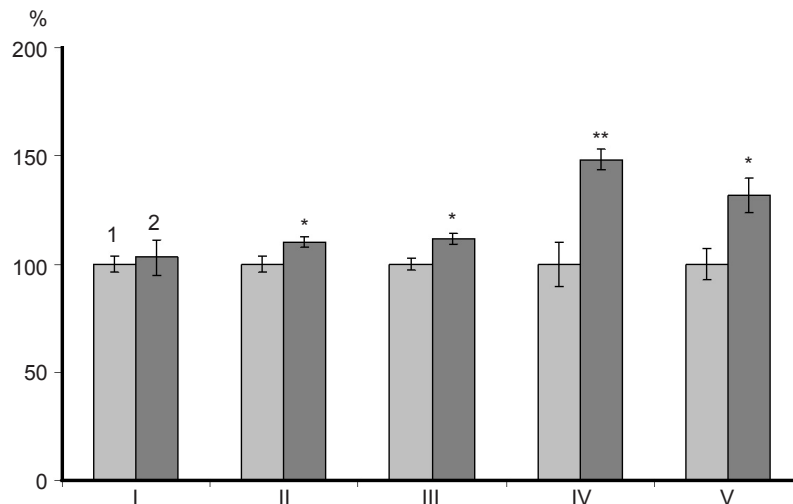


Рис. 3. Зміни амплітуди аферентного піку та постсинаптичних компонентів потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку у тварин з експериментальною менопаузою (2) порівняно з інтактною групою (1): I – аферентного піку; II, III, IV – N_1 , N_2 , N_3 -компонентів відповідно, V – P-хвилі ПДП. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ – вірогідність порівняно з контролем

шення амплітуди компонентів N_1 - N_3 ПДП спинного мозку, адже останні характеризують активність постсинаптичних структур заднього рога, зокрема, сегментарних (N_1 , N_2) та несегментарних інтернейронів (N_3) [18]. Також відомо, що застосування селективного блокатора $ER\alpha$ призводить до збільшення частоти виникнення спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів у нейронах желатинозної субстанції спинного мозку [12]. Їх часова та просторова сумація на інтернейронах дорсального рогу спинного мозку може сприяти зростанню активності вказаних нейронних груп, що відображається у зміні амплітуди відповідних N-компонентів, та збільшенню кількості сегментарних інтернейронів, які відповідають на подразнення аферентних волокон дорсального корінця, про що свідчить зростання тривалості N_3 -компонента [18].

Також зростання амплітуди N-компонентів може бути пов'язане зі зрушенням потенціалу залежності активації натрієвих каналів так, що для досягнення порога і генерації натрієвого струму нормального значення потрібні менші рівні деполяризації [20]. Спричинити це може зниження вмісту

кальцію у крові та міжклітинній рідині, зумовлене дефіцитом естрогенів [21].

Відомо, що естроген потенціює глутаматіндуковані струми через вплив на процес цАМФ-залежного фосфорилування [4], а селективний антагоніст $ER\alpha$ пресинаптично полегшує збуджувальну синаптичну передачу до нейронів желатинозної субстанції. У цих умовах посилюється пресинаптичне гальмування первинних аферентів гальмівними нейронами желатинозної субстанції [12]. Крім того, естроген може інгібувати ГАМК і гліцинові рецептори [5,6]. Тому за умов дефіциту естрогену кількість вказаних рецепторів в активному стані збільшується, що також може створювати умови для поглиблення пресинаптичного гальмування.

Перелічене вище може пояснити виражене пригнічення N_1 -компонента другого ПДП у дослідній групі при подвійному подразненні дорсального корінця з інтервалами 6 – 100 мс (див. рис. 4), що може вказувати на активування пресинаптичного гальмування інтернейронів IV пластини сірої речовини [22], у тому числі з боку желатинозної субстанції, нейрони якої здебільшого беруть участь у формуванні P-хвилі [18,23]. На користь цьо-

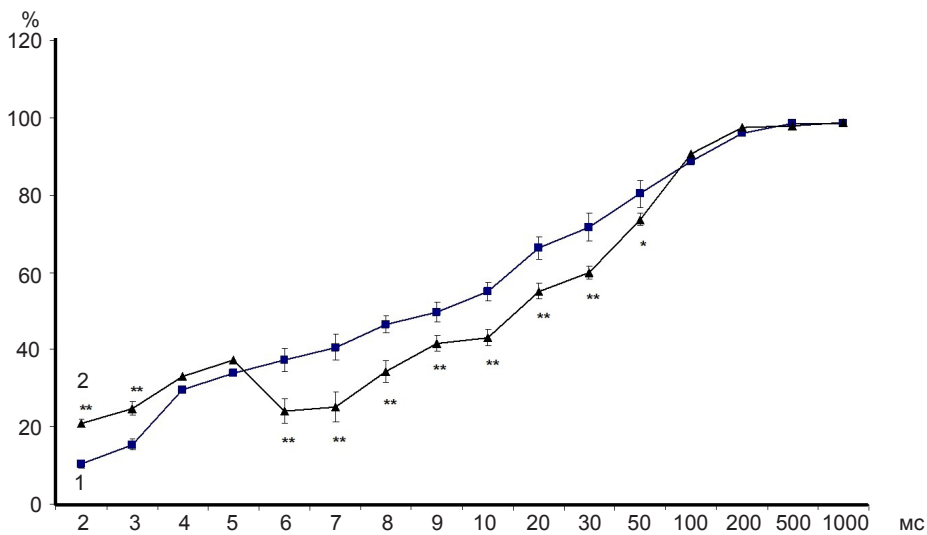


Рис. 4. Зміна амплітуди N_1 -компонента другого потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку відносно N_1 -компонента першого ПДП при подразненні дорсального корінця подвоєними імпульсами з різними інтервалами у тварин контрольної (1) та експериментальної (2) груп. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ – вірогідність порівняно з контролем.

го говорить відповідність проміжку з 6-ї по 100-ту мілісекунду тривалості позитивного компонента першого ПДП, амплітуда якого у дослідній групі вірогідно збільшена порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 3).

Ще однією причиною зниження амплітуди N_1 -компонента другого ПДП є гомосинаптична депресія, пов'язана з виснаженням запасів нейромедіаторів у пресинаптичних терміналях та десенситизацією постсинаптичних мембран за умов повторного проходження збудження через ті самі нейронні ланцюги [24]. Агоністи рецепторів естрогенів потенціюють аксонний транспорт через альтернативний негеномний сигнальний шлях, який реалізується внаслідок активації ERK-залежного внутрішньоклітинного сигнального каскаду [25]. Дефіцит естрогенів може призвести до порушення аксонного транспорту, і, як наслідок, поповнення пулу медіатора у пресинаптичних закінченнях, що відобразиться на посилення гомосинаптичної депресії у тварин дослідної групи.

Таким чином, отримані нами результати дають змогу зробити висновок про різноспрямовані зміни у нервових структурах заднього рогу спинного мозку самиць шурів за умов нестачі естрогенів. Так, збудливість низькопорогових аферентних нервових волокон заднього корінця у тварин дослідної групи значно знижується. Проте активність інтернейронного пулу підвищується, насамперед внаслідок розгальмовування несементарних інтернейронів та збільшення активності нейронів желатинозної субстанції у задньому розі, при одночасному зростанні пресинаптичного гальмування первинних аферентів. Однак сумарним ефектом довгострокової естрогенної недостатності є переважання явищ збудження над гальмуванням та полегшення нервової передачі у структурах заднього рогу спинного мозку, що підтверджує дані, отримані *in vitro* при вивченні особливостей активності желатинозної субстанції за умов застосування селективного інгібітора естрогенних рецепторів (Erg).

А.Г. Родинский, С.С. Ткаченко

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНТЕРНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА САМОК БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕНОПАУЗЫ

Анализировали особенности параметров возбудимости и амплитудно-временных характеристик компонентов потенциала дорсальной поверхности (ПДП) спинного мозга половозрелых самок белых крыс в условиях экспериментальной менопаузы. Установлено повышение порога возбуждения аферентных волокон задних рогов спинного мозга на 102,14% и латентного периода на 94,12% у животных после овариоэктомии. В условиях супрамаксимальной стимуляции дорсального корешка L5 выявлен рост амплитуды N_1 -компонентов на 10,14%, N_2 на 11,82%, N_3 -компонента на 48,28%, и P-волны на 31,58% и увеличение продолжительности N_3 -компонента на 26,54% в экспериментальной группе. При стимуляции парными импульсами на временном промежутке от 2 до 3 мс наблюдалось достоверное увеличение, а с 6 по 30 мс - угнетение N_1 -компонента второго ПДП в группе животных с менопаузой. Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать вывод о разнонаправленных изменениях в возбудимости нервных структур заднего рога спинного мозга в условиях недостатка эстрогенов.

Ключевые слова: менопауза; потенциал дорсальной поверхности спинного мозга; интернейрон; крысы-самки.

A.G. Rodinsky, S.S. Tkachenko

BIOELECTRIC ACTIVITY OF INTERNEURONES OF SPINAL CORD IN THE EXPERIMENTAL MENOPAUSE IN FEMALE RATS

We analyzed the amplitude-time characteristics of the components of the potential dorsal surface of the spinal cord (PDS SC) in experimental menopause. The excitation threshold increased at 102.14% and the latent period at 94.12% in animals with experimental menopause. In the context of supramaximal stimulation of dorsal root L5 identified N_1 amplitude growth at 10.14%, N_2 at 11.82%, N_3 at 48.28%, and P-wave 31.58% and to increase component N_3 26.54% in the experimental group. At condition of paired stimulation pulses on the time interval from 2 to 3 ms there was a significant increase, and from 6 to 30 ms – a depression of N_1 -component of the second PDS SC in the group of animals with experimental menopause. Thus, our results suggest the presence of changes in nerve structures of the posterior horn of the spinal cord at conditions of estrogen deficiency.

Key words: menopause; potential of dorsal surface of spinal cord; interneuron; rat.

REFERENCES

1. Dobrokhotova YuE. Menopausal syndrome. Lechebnoe delo. 2004;(1):3-8. [Russian].
2. Malichenko SB, Volkova VA, Khalidova KK. System changes in menopause. The role of calcium deficiency and vitamin D in the formation of post-menopausal symptom. Sovpennaya revmatologiya. 2008;(1):20-31. [Russian].
3. Craft RM. Modulation of pain by estrogens. Pain 2007;132(1):3-12.
4. Gu Q, Korach KS, Moss RL. Rapid action of 17 β -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. Endocrinology. 1999;140(2):660-6.
5. Jiang P, Kong Y, Zhang XB, Wang W, Liu CF, Xu TL. Glycine receptor in rat hippocampal and spinal cord neurons as a molecular target for rapid actions of 17- β -estradiol. Mol Pain. 2009;5:2.
6. Li W, Jin X, Covey DF, Steinbach JH. Neuroactive steroids and human recombinant $\rho 1$ GABAC receptors. J Pharmacol Exp Ther. 2007;323(1):236-47.
7. Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. Annu Rev Physiol. 2004;66:291-313.
8. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. Annu Rev Physiol. 2005;6:335-76.
9. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. Steroids. 2002;67(6):471-5.
10. Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. J Neurosci 2003;23(29):9529-40.
11. Vanderhorst VG, Gustafsson JA, Ulfhake B. Estrogen receptor- α and - β immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. J Comp Neurol. 2005;488(2):152-79.
12. Zhong YQ1, Li KC, Zhang X. Potentiation of excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord by inhibition of estrogen receptor alpha. Molecular Pain. 2010;6:92.
13. Amandusson S, Blomqvist A. Estrogen receptor- α expression in nociceptive-responsive neurons in the medullary dorsal horn of the female rat. Eur J Pain 2009;14(3):245-8.
14. Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum AI. Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and $\alpha 2$ -adrenergic analgesia and analgesic sex differences. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(1):271-6.
15. Rodins'kiy OG, Tkachenko SS, Mozgunov OV. Electrophysiological analysis of neuromuscular excitability complex in experimental. Eksperyment ta klin fiziol and biohim. 2014;(3):7-13. [Ukrainian].
16. Unal D, Halici Z, Altunkaynak Z, Keles ON, Oral E, Unal B. A new hypothesis about neuronal degeneration appeared after a rat model of menopause. Neurodegener Diseases. 2012;9(1):25-30.
17. Makiy EA, Nerush PA, Rodinskiy AG. Parameters of the potential of the dorsal surface of the spinal cord of rats with experimental hyperthyroidism. Neyrofiziologiya. 2001;33(4):279-85. [Russian].
18. Florov AK. On the origin of the dorsal surface of the potential of the brain *sinnogo* [dissertation]. Dnepropetrovsk state medical academy; 1966. [Russian].
19. Ogunshola OO, Antic A, et al. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. J Biol Chem. 2002;277(13):11410-15.
20. Neumcke B, Stampfli R. Heterogeneity of external surface charges near sodium channels in the nodal membrane of frog nerve. Pflugers Arch. 1984;401:125-31.
21. Beck MM, Hansen KK. Role of estrogen in avian osteoporosis. Poult. Sci. 2004;83(2):200-6.
22. Szekely G, Kozaras B. Electron microscopic identification of postsynaptic dorsal root terminals: a possible substrate of dorsal root potentials in the frog spinal cord. Exp. Brain Res. 1977;29(3/4):531-39.
23. Shugurov OO, Shugurov OA. Investigation of occurrence of late positive wave of the PDS SC. Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu (Biologiya, Ekologiya). 2002;1(10):149-54. [Russian].
24. Capek R, Esplin B. Homosynaptic depression and transmitter turnover in spinal monosynaptic pathway. J. Physiol. 1977;40(1):95-105.
25. Islamov RR, Murashov AK, Chelyshev YuA. Protein synthesis in the axon: Overview. Morfologiya. Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii: Nauchno-teoreticheskiy meditsinskiy zhurnal. 2005;128(6):70-6. ISSN 0004-1947 [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 11.02.2015

Гормони тимуса, антиоксидантні ферменти та нейрогенез у нюховій цибулині щурів при паркінсонізмі: вплив мелатоніну

¹І.Ф. Лабунець, ²С.О.Таланов, ¹Р.Г. Васильєв, ¹А.Є. Родніченко, ¹Н.О. Утко, ¹І.А. Кузьміна, ²Б.С.Коп'як, ¹О.В. Под'яченко, ²В.Ф. Сагач, ¹Г.М. Бутенко

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ; ²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: irina_labunets@ukr.net

У щурів, які отримували лише нейротоксин 6-гідроксидофамін або у комплексі із мелатоніном, досліджували зв'язок порушень активності антиоксидантних ферментів головного мозку, ендокринної функції тимуса як можливих патогенетичних ланок паркінсонізму, зі зміною числа нейральних стовбурових клітин (НСК) у нюховій цибулині. Встановлено, що у щурів із руховою асиметрією в апоморфіновому тесті, що відповідає значним ушкодженням дофамінергічних нейронів чорної субстанції, активність супероксиддисмутази, каталази і глутатіонредуктази у стріатумі в 1,3–1,4 раза, а вмісту у крові тимуліну у 8 разів менше, ніж у псевдооперованих тварин ($P < 0,05$). Навпаки, у щурів без рухової асиметрії і, відповідно, частковим ушкодженням нейронів значення показників майже не змінювалися. Частка nestin⁺-клітин у нюховій цибулині щурів із відсутністю рухової асиметрії збільшувалась із 91,2 до 99,3 % і залишалась такою після курсового введення мелатоніну (10 мг/кг, впродовж 18 діб). Курс мелатоніну щурам із циркуляторними рухами призводить до зменшення відсотка nestin⁺-клітин, що спостерігається на тлі значного зростання зниженої активності антиоксидантних ферментів і вмісту в крові тимуліну. Обговорюється можливість посилення у таких тварин диференціювання НСК нюхової цибулини в нейрональному напрямку. Обґрунтовується перспективність використання мелатоніну як нейропротекторного засобу в терапії паркінсонізму. Ключові слова: паркінсонізм; антиоксидантні ферменти; тимулін; мелатонін; нейральні стовбурові клітини; нюхова цибулина.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – одне із найбільш розповсюджених прогресуючих нейродегенеративних захворювань, при якому масова загибель дофамінергічних нейронів компактної частини чорної субстанції середнього мозку призводить до дефіциту дофаміну в нео-стріатумі та розвитку характерних моторних порушень [1, 2].

Загально визнані механізми нейродегенерації при ХП включають розвиток оксидативного стресу, нейрозапалення з активацією мікроглії, ушкодження шляхів деградації протеїнів, глутаматергічну ексайтотоксичність, дисфункцію мітохондрій тощо, а основним

шляхом загибелі нервових клітин є апоптоз [3, 4]. Існує думка, що саме оксидативний стрес – один із ключових факторів ушкодження клітинних мембран, органел і нуклеїнових кислот дофамінергічних нейронів та їх наступної загибелі [5]. Навпаки, у головному мозку на тлі зростання вмісту вільних радикалів та активних форм кисню зменшується синтез антиоксидантних ферментів [6].

Разом з тим з'являється все більше вагомих доказів щодо змін імунних реакцій при розвитку ХП/паркінсонізму, а також значення активованих імунних клітин для ушкодження дофамінергічних нейронів після інфільтрації головного мозку [7, 8]. Так, встановлено, що

© І.Ф. Лабунець, С.О.Таланов, Р.Г. Васильєв, А.Є. Родніченко, Н.О. Утко, І.А. Кузьміна, Б.С.Коп'як, О.В. Под'яченко, В.Ф. Сагач, Г.М. Бутенко

в ньому деякі субпопуляції Т-лімфоцитів, нейтрофіли, макрофаги, разом із мікроглією, синтезують такі прозапальні цитокіни, як туморнекротичний фактор (ТНФ)- α , інтерферон (ІФН)- γ , інтерлейкін (ІЛ)- 1β , хемокіни, а також вивільняють активні форми кисню та азоту; і, навпаки, оксидативний стрес здатен змінити функціонування клітин імунної системи. Крім того, порушення імунних реакцій при нейродегенеративних захворюваннях може бути пов'язане з дисфункцією центрального органа імунної системи тимуса, що нами було виявлено раніше на експериментальній моделі ішемії головного мозку [9]. Як відомо, саме в ньому утворюються субпопуляції Т-лімфоцитів із різними функціональними властивостями. Їх диференціювання, міграція на периферію і прояв функціональної активності контролюються гормонами тимуса, зокрема високоактивного тимуліну [10,11]. Цей гормон також впливає на функціонування макрофагів і виявляє протизапальну дію при нейрозапаленні, зменшуючи концентрацію ТНФ- α , ІЛ- 1β , ІЛ-6 і підвищуючи вміст ІЛ-10 [12, 13]. Як результат впливу імунних факторів, у центральній нервовій системі (ЦНС) може змінитися нейрогенез [14, 15].

Відомо про можливість не тільки адаптивного посилення нейрогенезу, але і його пригнічення в основних нейрогенних ділянках головного мозку тварин із нейродегенеративними захворюваннями [16, 17]. При паркінсонізмі однією із таких ділянок є нюхова цибулина, в яку по ростральному шляху мігрують нейральні стовбурові клітини (НСК) та прогеніторні клітини із субвентрикулярної зони бокових шлуночків [18]. Нюхову цибулину вважають унікальним джерелом для отримання власних НСК, що можуть диференціюватись у зрілі дофамінергічні нейрони, астроцити і олігодендроцити як *in vivo*, так і *in vitro* [18, 19]. Цей орган пов'язаний з нюховою функцією, порушення якої може бути однією із ранніх преклінічних ознак розвитку паркінсонізму [1].

Слід зазначити, що ефективність репаративних процесів у головному мозку при нейродегенеративних захворюваннях значною мірою залежить від впливу факторів макрооточення, зокрема гормонів [19, 20]. Серед останніх гормон епіфіза мелатонін пригнічує розвиток ХП/паркінсонізму в експериментальних і клінічних умовах [21–23]. Він виявляє широкий спектр біологічної активності, показана його участь у антиоксидантному захисті організму [6, 24]. Так, цей гормон – один із найпотужніших прямих антиоксидантів, що поглинає ендогенні вільні радикали (гідроксильний радикал, супероксидний аніон-радикал, синглетний кисень, оксид азоту) і зберігає макромолекули клітин (білки, жири, ядерну та мітохондріальну ДНК) від окисного пошкодження. Мелатонін діє також як непрямий антиоксидант, стимулюючи активність антиоксидантних ферментів у головному мозку тварин із нейродегенеративними захворюваннями. Крім того, встановлено його позитивний вплив на порушений функціональний стан тимуса, баланс регуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів і активність макрофагів [25, 26]. Є дані щодо підсилення під впливом мелатоніну проліферативного потенціалу НСК головного мозку та їх диференціювання у напрямку нейронів [22, 27, 28].

Мета нашої роботи – оцінити можливий зв'язок змін активності антиоксидантних ферментів у головному мозку, функціонального стану органів імунної системи та вмісту НСК у нюховій цибулині щурів із експериментальним паркінсонізмом, а також за умов введення мелатоніну.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 36 щурах-самцях популяції Вістар віком від 3 до 4 міс масою 200–250 г із розплідника віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Всі тварини знаходились у стандартних умовах віварію при природному світловому

режимі. Період дослідження – жовтень – травень. Біологічний матеріал для дослідів брали у тварин у ранкові години доби під ефірним наркозом. Усі роботи виконували з дотриманням “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою”, а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки [29].

Моделювання геміпаркінсонізму. Для створення моделі геміпаркінсонізму використовували селективний нейротоксин 6-гідроксидофамін (6-ГОДА), який є важливим ендегенним патогенетичним фактором розвитку ХП, що ушкоджує дофамінергічні нейрони чорної субстанції середнього мозку та спричинює розвиток ендегенного оксидативного стресу, нейрозапалення і дисфункції мітохондрій [21, 30]. У нашому експерименті однобічне пошкодження дофамінергічних нейронів викликали стереотаксичною ін'єкцією у лівий висхідний латеральний пучок переднього мозку 8,0 мкг 6-ГОДА (“Sigma”, США), розведеного у 4,0 мкл фізіологічного розчину, з додаванням 0,1%-ї аскорбінової кислоти як стабілізатора, що гальмує окиснення 6-ГОДА. За 30 хв до мікроін'єкції нейротоксину внутрішньоочеревинно вводили 40 мг/кг паргліліну (“Sigma”, США), який пригнічує метаболічні перетворення 6-ГОДА моноамінооксидазою, і 25 мг/кг дезипраміну (“Sigma”, США), що блокує захоплення нейротоксину норадренергічними клітинами. Усі вказані маніпуляції проводили під нембуталовим наркозом (50 мг/кг, внутрішньоочеревинно, “Sigma”, США). Контрольній групі тварин (псевдооперовані щури) робили всі вищевказані маніпуляції, але стереотаксично вводили 4,0 мкл 0,1%-ї аскорбінової кислоти.

Через тиждень після стереотаксичної ін'єкції 6-ГОДА у тварин за викликану рухову активність визначали ступінь однобічної дегенерації дофамінергічних нейронів чорної субстанції [21]. Для цього щурам внутрішньоочеревинно вводили агоніст дофамінових рецепторів апоморфін (0,5 мг/кг,

“Sigma”, США) і оцінювали циркуляторні рухи (число обертів за хвилину) у бік, контра-латеральний відносно півкулі, в яку вводили нейротоксин. Інтенсивність таких рухів була індикатором ступеня однобічної дегенерації нігостріатної дофамінергічної системи. За нашими попередніми морфологічними дослідженнями, відсутність рухової асиметрії в апоморфіновому тесті (0 об/хв) відповідає ушкодженню в середньому близько 44 % дофамінергічних нейронів, а наявність інтенсивних циркуляторних рухів у цьому тесті (понад 6 об/хв) близько 97 %. [21, 31].

Введення мелатоніну. Починаючи з 5-ї доби після проведення апоморфінового тесту, відповідним групам тварин вводили внутрішньоочеревинно мелатонін (“Sigma”, США) щоденно о 18.00 упродовж 18 діб, із розрахунку 10 мг/кг, у 0,0001%-му розчині аскорбінової кислоти. Ефективність впливу такої дози мелатоніну на перебіг паркінсонізму показана нами та іншими дослідниками раніше [21, 23]. Контроль – ін'єкції розчинника мелатоніну за аналогічною схемою.

Експериментальні групи щурів. У роботі були використані такі групи тварин (у кожній по шість особин): інтактні; псевдооперовані; із введенням 6-ГОДА і розчинника мелатоніну та апоморфіновим тестом відповідно 0 та понад 6 об/хв); із введенням 6-ГОДА і мелатоніну та апоморфіновим тестом відповідно 0 та понад 6 об/хв).

Методи. Активність антиоксидантних ферментів оцінювали у супернатантах гомогенатів стріатумів лівої півкулі головного мозку експериментальних тварин (10 000 g протягом 20 хв) спектрофотометричними методами (спектрофотометр «μQuant, Bio-Tek», США) [32]. Для дослідження активності супероксиддисмутази (СОД) використовували метод, оснований на здатності ферменту пригнічувати реакцію аутоокиснення адреналіну (“Fluka”, Німеччина) в адренохром при рН 10,2. Активність СОД виражали в умовних одиницях із розрахунку на 1 мг білка за 1 хв. Активність каталази визначали з кінетики руйнування H_2O_2

(“Riedel-deHaën”, Німеччина) і виражали в мікромолях утилізованої H_2O_2 на 1 мг білка за 1 хв. Активність глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) вимірювали за зменшенням НАДФН (“Sigma”, США) у сполученій глутатіонредуктазній реакції з додаванням у реактивну суміш відповідних реагентів і виражали в наномолях окисненого НАДФН на 1 мг білка за 1 хв. Вміст білка у стріатумі вимірювали за методом Лоурі.

Вміст тимуліну у сироватці крові оцінювали за методом Bach та співавт. [33], який оснований на відновленні чутливості спонтанних розеткоутворювальних клітин селезінки мишей із вилученим тимусом до азотіоприну (“Sigma”, США). Сироватку тварин пропускали через ультрафільтр CF-25 фірми “Amicon” (США) для видалення високомолекулярного інгібітора тимуліну. Результати наводили у вигляді \log_2 титру гормону.

У щурів вимірювали масу селезінки та підраховували кількість життєздатних ядромісних клітин в органі за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього. Наявність НСК визначали в культурі нюхової цибулини за їх здатністю утворювати нейросфери та експресувати маркер nestin [20]. Для цього нюхову цибулину виділяли з головного мозку щурів під контролем стереомікроскопа. Надалі, за власним протоколом, суспензію клітин, отриману після інкубації біоптату при 37°C з ферментами (0,05%-на проназа та 0,05%-на колагеназа ІА), центрифугували у десятикратному об’ємі холодного фосфатного буфера (ФБ; “Sigma”, США) впродовж 10 хв при 800 g та +4°C. Осад ресуспендували та клітини вносили до покритих колагеном І типу чашок Петрі діаметром 35 мм у середовищі росту такого складу: базальне середовище Neuronal Base Medium, 1%-й розчин антибіотиків/антимікотиків (“РАА”, Австрія), 10%-на ембріональна теляча сироватка, L-глутаміну – 2ммоль/л, 20 нг/мл bFGF (фактор росту фібробластів) та 20 нг/мл EGF (епідермальний фактор росту) (“Sigma”, США). При досягненні субконфлуентного

стану клітини знімали трипсином-ЕДТА (“Sigma”, США) та пересівали в покритий колагеном І типу флакон Т25. Для оцінки на здатність до утворення нейросфер використовували культури першого пасажу. Для цього при 70-80% моношарі клітини знімали та вносили до чашок Петрі діаметром 35 мм для суспензійних культур у концентрації 10 000 клітин/мл у 2 мл середовища росту такого складу: базальне середовище DMEM/F12, 2 %-ї поживної добавки B27 (“Gibco”, США), 2 ммоль/л L-глутаміну, 20 нг/мл bFGF і 20 нг/мл EGF та культивували впродовж 14 діб.

Для оцінки відсотка nestin⁺-клітин у культурі нюхової цибулини їх фіксували протягом 10 хв при кімнатній температурі додаванням 100 мкл 4%-го розчину параформальдегіду на 0,1 М ФБ з рН7,4. Потім 1-2 рази відмивали ФБ та пермеабілізували протягом 15 хв додаванням 100 мкл Perm/Wash buffer з подальшим відмиванням тим самим буфером. Для визначення nestin⁺-клітин використовували мишачі анти-nestin моноклональні антитіла (МАТ), мічені фікоеритрином (“Becton Dickinson”, США) у розведенні 1:50, згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Клітини ($1,0 \cdot 10^6$) інкубували з МАТ упродовж 60 хв при кімнатній температурі. Безпосередньо перед аналізом додавали розчин FACSFlow для проточної цитометрії та аналізували на проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (“Becton Dickinson”, США).

Статистичну обробку результатів проводили за критерієм t Стьюдента [34].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активність антиоксидантних ферментів у стріатумі щурів із моделлю геміпаркінсонізму та її зміни після введення мелатоніну. В експериментальних групах тварин нами досліджена активність таких ключових ферментів антиоксидантного захисту організму, як СОД, каталаза, ГП та ГР [32]. При цьому активність антиоксидантних ферментів у групах інтактних і псевдооперованих тварин

практично не відрізнялася ($P>0,05$). Активація СОД є першою ланкою антиоксидантного захисту; цей фермент переводить супероксидний аніон-радикал в електронейтральну форму H_2O_2 , подальше перетворення якої до H_2O контролюється каталазою і ГП. Нами встановлено суттєве зменшення активності СОД і каталази у стріатумі дослідних щурів із циркуляторними рухами відносно псевдооперованих тварин (рис.1). У тварин спостерігається також значне зниження активності ГР, яка відповідає за відновлення окисненого глутатіону в реакції, що каталізує ГП. Слід зазначити, що ступінь зниження активності антиоксидантних ферментів у стріатумі щурів, яким вводили нейротоксин 6-ГОДА, збігається із вираженістю ушкодження дофамінергічних нейронів чорної субстанції.

Ін'єкції мелатоніну щурам із руховою асиметрією у апоморфіновому тесті відновлюють знижену активність більшості антиоксидантних ферментів до рівня псевдооперованих тварин (див. рис.1). Спостерігається підсилення активності саме СОД і каталази, які формують єдину координовану пару в своїй антиоксидантній діяльності [32]. Дія мелатоніну на активність цих ферментів реалізується на генетичному рівні підсиленням експресії mRNA [6]. При цьому він попереджує індукцію прооксидантного фермента мітохондріальної індукцйбельної NO-синтази у клітинах чорної субстанції і стріатума мишей із моделлю ХП [35]. Оскільки дисфункція мітохондрій – важлива патогенетична ланка ХП/паркінсонізму, треба відмітити протекторно-пригнічувальну дію мелатоні-

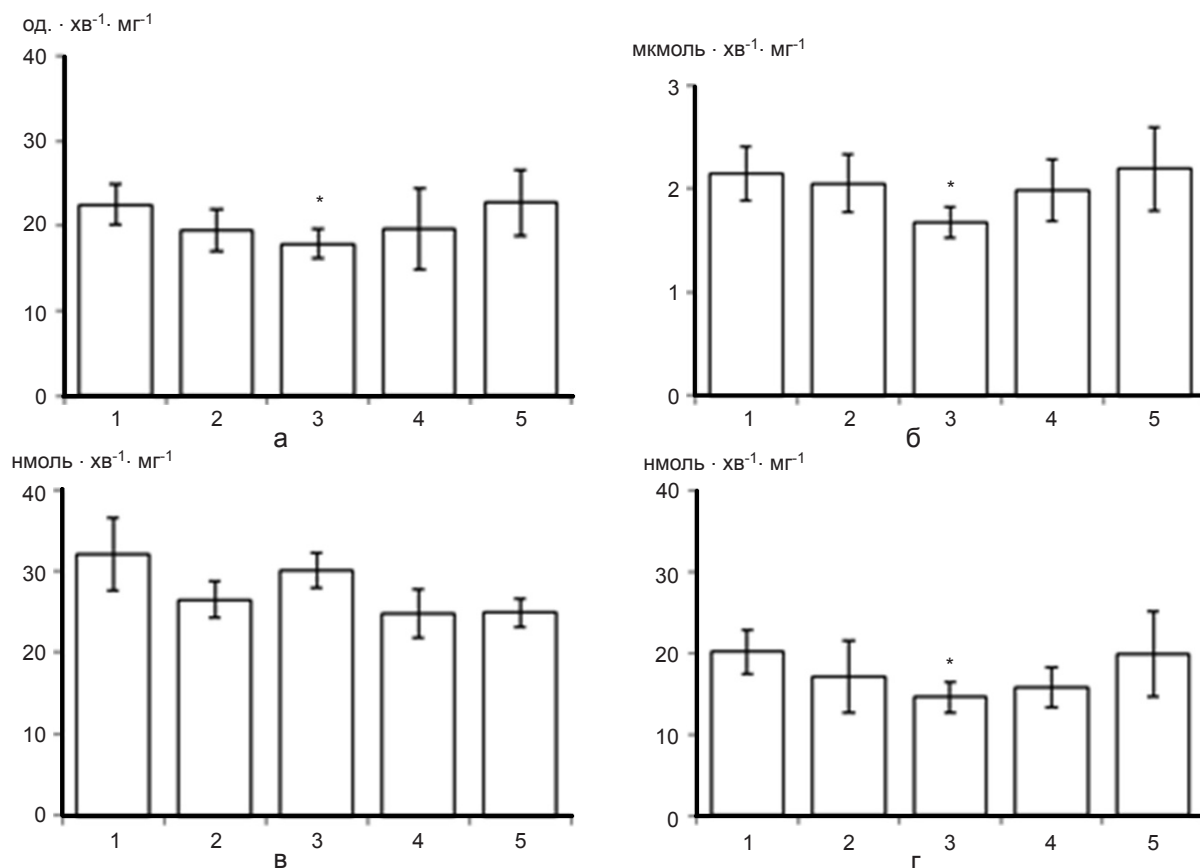


Рис.1 Активність супероксиддисмутази (а), каталази (б), глутатіонпероксидази (в), глутатіонредуктази (г) у стріатумі щурів: 1 – псевдооперовані, 2 – без рухової асиметрії в апоморфіновому тесті, 3 – із руховою асиметрією, 4 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 5 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; * $P<0,05$ порівняно із псевдооперованими тваринами

ну на пори мітохондрій [6]. Доведено, що їх відкриття за умов дії вільних радикалів супроводжується виходом у цитозоль цитохрому С, який активує цитоплазматичні каспази, що призводить до підсилення останніми протеолізу клітинних білків і сприяє розвитку апоптозу клітин нервової системи.

Отже, завдяки широкому спектру антиоксидантних властивостей, мелатонін здатний стримувати дегенерацію дофамінергічних нейронів, яка викликана у щурів переважно вільнорадикальним окисненням у результаті введення 6-ГОДА. Нами раніше виявлена подібна здатність мелатоніну при його введенні тваринам перед експериментальним моделюванням геміпаркінсонізму [21]. Позитивний вплив гормону саме за умов зміни активності антиоксидантних ферментів узгоджується з даними літератури щодо модулювальної дії на порушені функції організму [6, 25, 26].

Функціональний стан тимуса і селезінки у тварин із моделлю геміпаркінсонізму та вплив на нього мелатоніну. Встановлено, що ендокринна функція тимуса у псевдооперованих щурів пригнічується порівняно з інтактними тваринами, що можна пояснити реакцією залози на оперативне втручання (рис.2). У дослідних щурів із циркуляторними рухами вміст у крові тимуліну суттєво зменшується відносно псевдооперованих тварин. Після курсу мелатоніну вміст гормону зростає ($P < 0,05$) у щурів обох дослідних груп до значень інтактних тварин (див. рис.2). Маса селезінки у щурів інтактних, псевдооперованих та дослідних із руховою асиметрією становить $733,2 \pm 90,7$, $564,6 \pm 66,3$ і $487,1 \pm 29,9$ мг відповідно; при цьому різниця між першою і останньою групами вірогідна. Кількість ядровмісних клітин у селезінці була $(946,4 \pm 157,4) \cdot 10^6$, $(680,8 \pm 158,8) \cdot 10^6$ і $(559,9 \pm 118,8) \cdot 10^6$ відповідно. У дослідних щурів із руховою асиметрією, які отримували мелатонін, маса селезінки $637,5 \pm 71,1$ мг і число в ній ядровмісних клітин $(763,6 \pm 130,8) \cdot 10^6$ збільшувалися і наближувалися до значень у інтактних тварин. Тобто після введення мелатоніну спостерігаються

позитивні зміни функціонування тимуса, а також клітинності селезінки, яку вважають інтегральним показником, що значною мірою віддзеркалює стан таких процесів в імунній системі, як проліферація, міграція та диференціювання лімфоїдних клітин [10].

Таким чином, встановлено, що функціональний стан тимуса погіршується при 6-ГОДА-індукованому пошкодженні нігостриатної дофамінергічної системи; при цьому ступінь пригнічення ендокринної функції залози у тварин із геміпаркінсонізмом узгоджена з вираженістю дегенеративних змін дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Існування двобічного зв'язку дефіциту дофаміну головного мозку і гіпофункції тимуса доводять такі факти. Як відомо, дофамін – один із важливих нейромедіаторів ЦНС, який впливає не тільки на рухову активність, але й функціонування ендокринної та імунної систем організму [36]. Оскільки він не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, механізм порушень функцій периферичних імунних клітин при паркінсонізмі пов'язують як зі змінами кількісних відношень мозкового дофаміну з іншими нейромедіаторами із імуносупресивними властивостями (наприклад, метенкефаліном), так і його опосередкованим впливом на лімфоцити через деякі гормони гіпоталамо-гіпофізарної системи (зокрема,

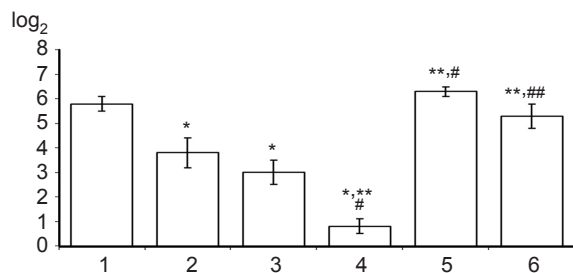


Рис. 2. Вміст тимуліну в крові щурів із моделлю геміпаркінсонізму та його зміни після введення мелатоніну: 1 – інтактні, 2 – псевдооперовані, 3 – без рухової асиметрії в апоморфіновому тесті, 4 – із руховою асиметрією, 5 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 6 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; $P < 0,05$ порівняно: * з інтактними, ** з псевдооперованими, # без рухової асиметрії у апоморфіновому тесті, ## із руховою асиметрією

адренекортитропний та соматотропний гормони тощо) [36]. При цьому ми не виключаємо можливості реалізації ефекту вказаних гормонів на лімфоцити на рівні секреторного компонента тимуса, в якому знаходяться рецептори до останніх [11, 37].

У свою чергу існує зворотна дія продуктів імунної системи на концентрацію дофаміну в ЦНС [36, 38]. Так, показано, що ІЛ-2 у фізіологічній концентрації стимулює *in vitro* дозозалежним способом вивільнення дофаміну нейронами головного мозку, а трансформуючий фактор росту α є нейротрофічним *in vitro* для дофамінергічних нейронів середнього мозку. Враховуючи біологічні властивості тимуліну, можна припустити і його участь у зворотній дії факторів імунної системи на вміст дофаміну у ЦНС. При цьому має значення безпосередній вплив гормону на синтез прозапальних цитокінів у головному мозку тварин із експериментальною моделлю нейрозапалення за допомогою NF- κ B-залежного механізму [12]. Зниження вмісту тимуліну в крові щурів із геміпаркінсонізмом – важлива патогенетична ланка формування у лімфоїдних органах дисбалансу регуляторних Т-лімфоцитів у бік накопичення Т-супресорів, які після міграції у головний мозок здатні чинити пряму цитотоксичну дію на нейрони [8, 36]. Ми вважаємо, що виявлений нами факт стійкої тенденції до зменшення маси селезінки та числа в ній ядромісних клітин частково пояснюється посиленням міграції периферичних Т-лімфоцитів у головний мозок.

Активация ендокринної функції тимуса після введення мелатоніну може забезпечуватися його безпосереднім впливом на секреторний компонент залози [26, 37]. Крім того, мелатонін підвищує число Т-хелперів у лімфоїдних органах, діючи через рецептори в цих клітинах [22]. Як результат, у щурів із геміпаркінсонізмом відновлюються внутрішньосистемні зв'язки, і, не виключено, вміст різних Т-субпопуляційний лімфоцитів у селезінці.

Число НСК у культурі нюхової цибулини тварин із моделлю геміпаркінсонізму та за

умов введення мелатоніну. Із нюхової цибулини щурів були отримані культури клітин, які спроможні до швидкої проліферації, а за спеціальних гіпоадгезивних умов культивування – до росту з формуванням нейрофер (рис.3).

Аналіз культур клітин нюхової цибулини першого пасажу методом протокової цитометрії показав суттєве зростання частки nestin⁺-клітин у дослідних щурів без рухової асиметрії порівняно з псевдооперованими тваринами, тоді як у щурів із її наявністю підвищення значень показника було неістотним (рис.4). Курс мелатоніну зберігає підвищений відсоток nestin⁺-клітин у щурів без рухової асиметрії; у щурів із циркуляторними рухами частка цих клітин практично не відрізнялася від значень у псевдооперованих тварин (див. рис.4).

Встановлене нами зростання відсотка НСК у нюховій цибулині щурів узгоджується з даними літератури [18]. Разом з тим ми спостерігали значне збільшення частки цих клітин саме у тварин без рухової асиметрії в апоморфіновому тесті. Характерно, що менш виражене підвищення відсотка НСК у нюховій цибулині дослідних щурів із циркуляторними рухами, на відміну від щурів із їх відсутністю,

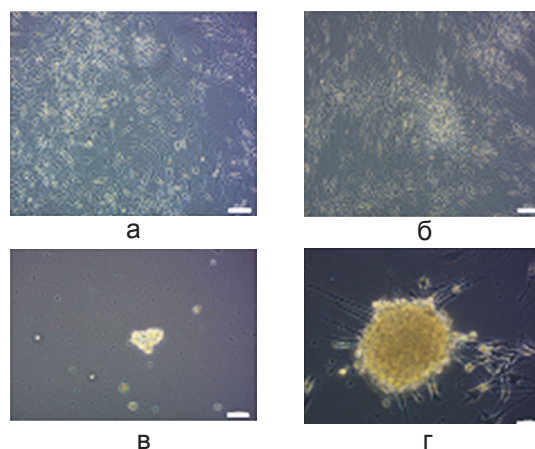


Рис 3. Біологічні властивості нейральних стовбурових клітин із культури клітин нюхової цибулини: а – первинна культура клітин; б – культура клітин першого пасажу; в і г – здатність клітин нюхової цибулини до росту у вигляді нейрофер через 72 год і 14 діб культивування відповідно. Фазово-контрастна мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм

збігалось з інтенсивним зниженням активності антиоксидантних ферментів у стріатумі, а також вмісту в крові тимуліну. Тобто при експериментальному геміпаркінсонізмі активація нейрогенезу, зокрема посилення проліферації НСК у нюховій цибулині, спостерігається на тлі відносно збереженого стану антиоксидантного захисту головного мозку та функціонування тимуса.

Ми припустили, що застосування при паркінсонізмі фармакологічних засобів, які спроможні одночасно вплинути на активність факторів імунної системи та антиоксидантного захисту, може спричинити і нейропротекторний ефект. Так, за даними літератури, позитивний вплив мелатоніну на етапи нейрогенезу у головному мозку пов'язаний не тільки з комбінацією антиоксидантного і антиапоптозного ефектів, але й посиленням проліферативного потенціалу НСК та їх диференціювання у нейрони, зміною активності та/або вмісту деяких факторів мікрооточення (зокрема, BDNF, нейротрофічний фактор головного мозку), які важливі для виживання нейральных клітин та утворення нових нейронів [22, 27]. Дійсно, нами встановлено, що курсове введення мелатоніну підтримує підвищений вміст НСК у нюховій цибулині дослідних щурів без рухової асиметрії. Дія мелатоніну на НСК цього органа може реалізуватися не тільки безпосередньо, через рецептори, але й опосередкована антизапальним ефектом тимуліну в ЦНС. При цьому показано

зменшення проліферативного потенціалу НСК у головному мозку за умов зростання концентрації таких прозапальних цитокінів, як ТНФ- α , ІЛ-1 β [14].

Разом з тим відсоток НСК у нюховій цибулині дослідних тварин із руховою асиметрією зменшувався після введення мелатоніну до значень псевдооперованих тварин. З одного боку, відомо щодо зменшення числа та/або афінності рецепторів до мелатоніну в різних тканинах організму, в тому числі у нейрогенних зонах головного мозку при прогресуванні ХП [6, 22]. З іншого боку, ми припускаємо, що подібний напрямок змін частки НСК у нюховій цибулині таких щурів після введення мелатоніну можна пояснити посиленням їх диференціювання у бік нейронів. Таке припущення базується, по-перше, на даних літератури щодо нейропротекторних властивостей мелатоніну при ХП/паркінсонізмі [21–23]. По-друге, за нашими результатами, таким змінам нейрогенезу може сприяти активація мелатоніном механізмів, які спрямовані на зменшення проявів оксидативного стресу і нейрозапалення при паркінсонізмі. Крім того, у дослідних тварин, що отримували мелатонін, абсолютний вміст nestin⁺-клітин у культурі нюхової цибулини менше, ніж у щурів, яким не вводили мелатонін, а також у псевдооперованих ($0,96 \cdot 10^6$, $1,26 \cdot 10^6$ і $1,3 \cdot 10^6$, відповідно). В подальшому нами буде досліджена здатність НСК нюхової цибулини до диференціювання у нейрональ-

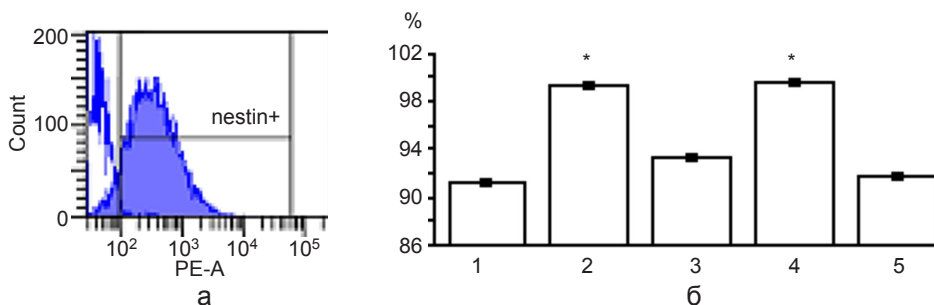


Рис. 4 Фенотипування культур нюхової цибулини першого пасажу (а) від тварин різних груп (б) на наявність nestin⁺-клітин: 1 – псевдооперовані, 2 – без рухової асиметрії в апорфіновому тесті, 3 – із руховою асиметрією, 4 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 5 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; *P<0,05 порівняно із псевдооперованими тваринами

ному напрямку з одночасною оцінкою нюхової функції та структурних змін у чорній субстанції при експериментальному паркінсонізмі, а також за умов введення мелатоніну.

Таким чином, у результаті досліджень виявлена узгодженість змін деяких етапів нейрогенезу в нюховій цибулині зі станом антиоксидантного захисту головного мозку і функціональною активністю органів імунної системи, а також показана можливість участі мелатоніну у таких взаємодіях.

Використання в експерименті щурів як із частковим, так і значним ушкодженням дофамінергічних нейронів чорної субстанції дало змогу оцінити зміни досліджених показників на етапах розвитку паркінсонізму, які значною мірою відповідають преклінічній стадії захворювання із розвитком компенсаторних процесів у головному мозку, а також його прогресії з появою моторних порушень [1]. Мелатонін виявив ефект у щурів обох дослідних груп, хоча напрямок його переважного впливу на етапи нейрогенезу може мати особливості залежно від стадії розвитку захворювання. У механізмі нейропротекторного ефекту мелатоніну при паркінсонізмі має значення його позитивний вплив на досліджені патогенетичні ланки захворювання. Отже, мелатонін можна розглядати як перспективний засіб у схемах індивідуалізованої терапії паркінсонізму з урахуванням стадії захворювання та схеми його застосування.

І.Ф. Лабунець, С.А.Таланов, Р.Г. Васильєв, А.Е. Родніченко, Н.А. Утко, І.А. Кузьміна, Б.С.Коп'як, Е.В. Под'яченко, В.Ф. Сагач, Г.М. Бутенко

ГОРМОНЫ ТИМУСА, АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЕ КРЫС ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ: ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА

У взрослых крыс, получавших нейротоксин 6-гидроксидофамин самостоятельно или в сочетании с мелатонином, исследовали связь нарушений активности антиоксидантных

ферментов головного мозга, эндокринной функции тимуса как возможных патогенетических звеньев паркинсонизма, с изменением числа нейральных стволовых клеток (НСК) в обонятельной луковице. Установлено, что у крыс с двигательной асимметрией в апоморфиновом тесте, что соответствует значительным повреждениям дофаминергических нейронов черной субстанции, активность в стриатуме супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы в 1,3-1,4 раза, а содержания в крови тимулина в 8 раз ниже, чем у ложнопериоперированных животных ($P < 0,05$). Напротив, у крыс с отсутствием двигательной асимметрии, а значит, частичным повреждением нейронов, показатели практически не изменялись. Доля nestin⁺-клеток в обонятельной луковице крыс с отсутствием двигательной асимметрии увеличивалась с 91,2 до 99,3% и оставалась такой после курсового введения мелатонина (10 мг/кг, в течение 18 сут). Курс мелатонина крысам с циркуляторными движениями приводит к уменьшению доли nestin⁺-клеток, что наблюдается на фоне значительного увеличения сниженной активности антиоксидантных ферментов и содержания в крови тимулина. Обсуждается возможность усиления у таких животных дифференцировки НСК обонятельной луковицы в нейрональном направлении. Обсуждается перспективность применения мелатонина как нейропротекторного средства в терапии паркинсонизма. Ключевые слова: паркинсонизм; антиоксидантные ферменты; тимулин; мела тонин; нейральные стволовые клетки; обонятельная луковица.

I.F.Labunets¹, S.A. Talanov², R.G. Vasilyev¹, A.E. Rodnichenko¹, N.A. Utko¹, I.A. Kyzminova¹, B.S.Kopjak², E.V. Podjachenko¹, V.F.Sagach², G.M. Butenko¹

THYMIC HORMONES, ANTIOXIDANT ENZYMES AND NEUROGENESIS OF BULBUS OLFACIORIUS IN RATS WITH PARKINSONISM: THE EFFECT OF MELATONIN

The adult rats received both neurotoxin 6-hydroxidophamine and neurotoxin and melatonin. It was investigated a link between the disturbances of the brain antioxidant enzymes activity and thymic endocrine function, as possible pathogenic factors of parkinsonism, with changes in the number of neural stem cells (NSC) in the bulbus olfactorius. Rats with motor asymmetry in the apomorphine test and significant damage of the dopaminergic neurons in the substantia nigra have decreased levels of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in striatum (1.3-1.4 times) and blood thymulin content (8 times) compared to control group. On the contrary, examined indices were not changed in rats without motor asymmetry and correspondingly partly damaged neurons. The number of nestin⁺-cells in the bulbus olfactorius of rats without motor asymmetry increased from 91.2% to 99.3% and remained unchanged after melatonin administration course (10 mg/kg during 18 days). Melatonin

administration resulted in the decrease in the number of nestin⁺-cells along with significant elevation of the decreased antioxidant enzymes activity and blood thymulin content in rats with circulatory movements. Possibilities of the enhancement of NSC differentiation in bulbus olfactorius into neuronal direction in such animals has been discussed. The conclusion about the potential use of melatonin as a neuroprotector in parkinsonism therapy has been made.

Key words: parkinsonism; antioxidant enzymes; thymulin; melatonin; neural stem cells; bulbus olfactorius

¹*Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine;*

²*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

- Ugrumov MV. Neurodegenerative diseases: fundamental and applied aspect. Nauka: Moscow; 2010. [Russian].
- Karaban IN, Karaban NV, Karasevich NV. Means of neuroprotection in Parkinson's disease. *Int J Neurol.* 2011;44(6):25-35 [Russian].
- Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012;211: 55-76.
- Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2013;62(5):803-19.
- Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013;22(1):11-7.
- Reiter RJ, Manchestr LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):194-210.
- Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant.* 2008;17(4):363-72.
- Abdurasulova IN, Klimenko VM. The role of immune and glial cells in neurodegenerative process. *Med Acad J.* 2011;11(1):12-29. [Russian].
- Labunets IF, Tsupikov OM, Kyryk VM, Kuchuk OV, Pivneva TA, Skibo GG, Butenko GM. The influence of neurotransplantation on functional activity of pineal gland and thymus in brain ischemic injury. In: *Genetic and Regenerative Medicine: Problems and Perspectives, Proceedings of the International Conference, Kiev, Ukraine, October 14-15, 2010; J. AMS Ukr., 2010, 16, suppl., 100-1.* [Ukrainian].
- Yarilin AA, Pinchuk VG, Grinevich YuA. Structure of Thymus and Differentiation of T Lymphocytes. *Naukova Dumka: Kiev; 1991.* [Ukrainian].
- Lunin SM, Novoselova EG. Thymus hormones as a prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(8):775-86.
- Haddad JJ, Hanbali LH. The anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF- κ B dependent and involves the downregulation of I κ B- α . *Am J Med Biol Res.* 2013;1(2):41-9.
- Pardo J., Schwerdt JI, Reggiani PC, Zappa MF, Pereyra AS, Brown OA, Goya RG. Physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Physiol. Mini Reviews.* 2012;6(1):2-12.
- Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron.* 2009;64(1):79-92.
- Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair. *Nat Neurosci.* 2012;15(8):1078-87.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders – time for clinical translation? *JCI.* 2010;120(1):29-40.
- Rybachuk O, Pivneva T. Contribution of neural stem cells to regeneration of the central nervous system. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2014;5(1):83-96.
- Hermann A, Storch A. Endogenous regeneration in Parkinson's disease: Do we need orthopic dopaminergic neurogenesis? *Stem Cells.* 2008;26:2749-52.
- Zozulya YuA, Lisyany NI. Neurogenic differentiation of stem cells. Kyiv: OOO UIPK "EksOb"; 2005. [Ukrainian].
- Labunets IF, Talanov SA, Rodnichenko AE, Vasilyev RG, Utko NA, Kyzminova IA, Rymar SE, Sagach VF, Butenko GM. The study in experiment of cytokine and hormone influence on neurodegenerative diseases pathogenesis stages as possible way to increase cell therapy efficacy. In: *Transplantation: Present, Past and Future, Proceedings of the International Conference, Kyiv, 2014;p.28.* [Ukrainian].
- Talanov SA, Sagach VF. Antioxidants prevent experimental hemiparkinsonism in rats. *Fiziol Zh.* 2008;54(4):23-9. [Ukrainian].
- Srinivasan V. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011;4(5):297-317.
- Gutierrer-Valdez AL, Anaya-Martinez V, Ordonez-Librado JL, Garcia-Ruiz R, Torres-Esquivel C, Moreno-Rivera M, Sanchez-Betancourt J, Montiel-Flores E, Avila-Costa MR. Effect of chronic L-Dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. *ISRN Neurology.* 2012;article ID 360379,16p.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanisms to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005;39(2):99-104.
- Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4-6):272-8.
- Labunets I. Pineal gland and rhythms of immune system in aging. Experimental study. LAP LAMBERT Academic Publishing: Saarbrücken; 2012.
- Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res.* 2007;42(4):411-8.
- Sothibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P.

- Melatonin increase proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res.* 2010; 49(3):291-300.
29. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986; 53.
 30. Blandini F, Armentero M. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279(7):1156-66.
 31. Talanov SA, Oleshko NN, Tkachenko MN, Sagach V.F. Pharmacoprotective influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons. *Neurophysiology.* 2006;38(2):150-6. [Ukrainian].
 32. Muradian KK, Utko NA, Mozhukhina TG, Pishel IN, Litoshenko AY, Bezrukov VV, Fraifeld VE. Correlative links between superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of mice. *Ukr Biochem J.* 2003;75(1):33-7. [Ukrainian].
 33. Bach JF, Dardenne M, Bach MA. Demonstration of a circulation thymic hormone in mouse and man. *Transplant Proc.* 1973;1(1):99-101.
 34. Lakin GF. *Biometrics.* Vysshaya Shkola: Moscow; 1990 [Russian].
 35. Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):228-42.
 36. Hritcu L. Neurotransmitters and immunity: 1. Dopamine. In: *Analele stiintifice ale Universitatii "Alexandree Ioan Cuza".* 2007; VIII:107-13.
 37. Reggiani P, Morel G, Console G, Barbeito CG, Rodriguez SS, Brown OA, Bellini MJ, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. The thymus–neuroendocrine axis. Physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153(1):98-106.
 38. Alonso R, Chaudieu I, Diorio J, Krishnamurthy A, Boksa P. Interleukin2 Modulates Evoked Release of [3H] Dopamine in Rat Cultured Mesencephalic Cells. *J Neurochem.* 1993;61(4):1284-90.

*Матеріал надійшов
до редакції 27.05.2015*

Морфофункціональний стан щитоподібної залози після введення мелатоніну

Р.В. Янко

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

Досліджували морфофункціональний стан щитоподібної залози (ЩЗ) молодих щурів лінії Вістар після введення екзогенного мелатоніну у весняний і осінній періоди. Мелатонін тварини отримували щодня протягом 28 діб у дозі 5 мг/кг. У дослідних груп виявлено збільшення середньої площі поперечного перерізу фолікулів на 31 % і колоїду на 30 % (навесні), внутрішнього діаметра фолікулів, зниження площі та висоти фолікулярного епітелію на 12 % (восени). Також у тварин відмічена незначна наявність у колоїді резорбційних вакуолей, зниження фолікулярно-колоїдного індексу і зростання індексу накопичення колоїду, зменшення кількості інтерфолікулярних острівців. Введення мелатоніну у весняний період знизило кількість елементів сполучної тканини, тоді як при осінньому впливі, навпаки – істотно збільшилася ширина міжчасткової (на 12 %), міжчасточкової (на 17 %) і міжфолікулярної (на 31 %) сполучної тканини в ЩЗ. Мелатонін у весняний період призвів до більш істотних змін в структурі залози порівняно з осіннім періодом. За більшістю досліджуваних показників як у весняний, так і в осінній періоди він знижує функціональну активність і фізіологічну регенерацію ЩЗ.

Ключові слова: мелатонін; щитоподібна залоза.

ВСТУП

В останні роки взаємозв'язку епіфіза та щитоподібної залози (ЩЗ) приділяють велику увагу, проте багато питань відносно цієї проблеми залишаються до кінця не вирішеними [1, 2]. Літературні дані, присвячені впливу мелатоніну на стан ЩЗ, досить неоднозначні і часто суперечливі. У більшості праць показано, що підшкірне, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне і навіть внутрішньошлуночкове його введення пригнічує функціональну активність залози, знижує концентрацію тиреоїдних гормонів у сироватці крові [3–5]. Інші автори надають мелатоніну роль стимулювального фактора на ЩЗ [6]. Так, Геворкян з співавт. [7] виявив, що ін'єкції мелатоніну (протягом 10 діб) в дозі 0,05 та 0,5 мг/кг підвищують секрецію тиреоїдних гормонів у старих щурів. При цьому збільшується відносна кількість тироцитів з диплоїдними ядрами, що можна

розцінювати як «омолодження» ЩЗ. Інша група вчених спостерігала гіпофункцію ЩЗ після перебування кролів в умовах цілодобового освітлення, яке пригнічує синтез мелатоніну. А після введення екзогенного мелатоніну чи поміщення тварин на фізіологічний світловий цикл, функція залози повертається до норми [8]. Dzerzhynsky та співавт. [9] дослідили, що мелатонін покращує синтетичну активність ЩЗ, опосередковуючи свій вплив через імунну систему. А група вчених на чолі з Siegrist [10] не виявила змін у концентрації тироксину в крові після 6-місячного його введення. Така неоднозначність може бути пов'язана з використанням в експериментах тварин різного виду та віку [11]. Велике значення має доза та тривалість введення мелатоніну [5, 9]. Цей гормон має добові та сезонні коливання ритмів секреції [12, 13]. Тому проведення досліджень у різну пору року та час доби також може призводити до отримання протилежних результатів.

© Р.В. Янко

Мета нашої роботи – дослідити та порівняти зміни морфофункціональних показників активності ЩЗ молодих щурів після введення мелатоніну в весняний та осінній періоди.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс у весняний (квітень) та осінній (листопад) періоди. Тваринам дослідних груп щодня перорально вводили екзогенний мелатонін о 10.00 “Unipharm Inc., США” в дозі 5 мг/кг. Щури всіх груп перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природним циклом світло/темрява. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щури були розділені на чотири групи: I і III групи – інтактні тварини у весняний та осінній періоди відповідно, II – щури, які отримували екзогенний мелатонін у весняний період та IV – тварини, які зазнавали введення мелатоніну в осінній період. Роботу із щурами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Функціональну активність, фізіологічну регенерацію та стан сполучної тканини (СТ) у паренхімі ЩЗ оцінювали за допомогою гістологічних, морфометричних і морфологічних методів дослідження. Із ЩЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70 до 96°) та діоксані. Отримані зразки заливали в парафін. Парафінові зрізи, завтовшки 5 – 6 мкм, виготовляли на санному мікромомі, фарбували гематоксиліном Бемера та еозином. Для візуалізації елементів СТ застосовували методи дво- та триколіорового забарвлення за Ван-Гізеном та Массоном [14]. З використанням цифрової камери мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nicon» (Японія). Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Image J».

На гістологічних зрізах ЩЗ вимірювали:

площу поперечного перерізу фолікула, колоїду та фолікулярного епітелію, зовнішній та внутрішній діаметр фолікулів, висоту фолікулярного епітелію, ширину міжчасткової, міжчасточкової та міжфолікулярної сполучної тканини. Підраховували кількість тироцитів у фолікулі, визначали фолікулярно-колоїдний індекс та індекс накопичення колоїду [15, 16].

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 5.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виявлено, що щури після введення мелатоніну мають не змінену структуру ЩЗ зі збереженням її основних структурних елементів. Паренхіма залози розділяється на центральну і периферичну зони. ЩЗ інтактних тварин містить фолікули овальної та видовженої форми різного розміру (рис. 1). Показано, що розмір фолікулів дещо залежить від пори року. Так, якщо фолікули весною в середньому мають площу 2466 мкм², то восени вона становить 2899 мкм² (таблиця).

Виявлено розбіжності в отриманих морфометричних показниках стану ЩЗ у дослідних групах щурів. Так, у тварин, після дії мелатоніну у весняний період, спостерігали вірогідне зростання площі поперечного перерізу фолікула та його колоїду на 31 і 30 % відповідно порівняно з контролем. У щурів, яким вводили мелатонін в осінній період, площа фолікулів та колоїду залишалася на рівні контрольних значень (таблиця). Зростання розмірів фолікулів може вказувати на зниження активності ЩЗ. У малоактивному стані до її складу входять фолікули переважно великого розміру внаслідок депонування гормонів у середині фолікула, збільшення об'єму колоїду [15].

Фолікулярний епітелій утворений тироцитами, які складають основну масу паренхіми ЩЗ. Форма тироцитів залежить від функціонального стану залози. При нор-

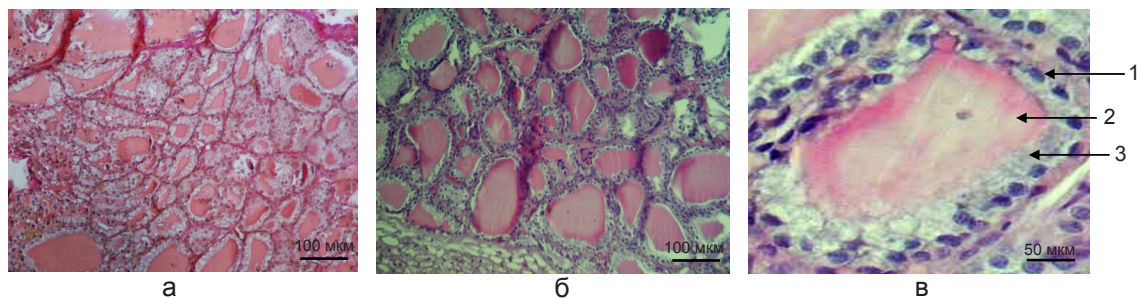


Рис. 1. Зріз лівої частки щитоподібної залози інтактної тварини (а) та щура, який зазнавав введення мелатоніну у весняний період (б). Забарвлення за методом Ван-Гізона. Збільшення у 200 разів; в – мікрофотографія фолікула: 1 – тироцит; 2 – колоїд; 3 – резорбційні вакуолі. Забарвлення за методом Ван-Гізона. Збільшення у 400 разів

мофункції вони мають кубічну форму, при гіпофункції стають пласкими, а при гіперфункції – набувають призматичної форми [16]. Показано, що тироцити контрольних груп переважно кубічної, рідше пласкої (у великих фолікулах через розтягнення стінки) чи призматичної форми (переважно у дрібних фолікулах). Висота тироцитів у тварин інтактної групи весною і восени в середньому становить 9,8 і 9 мкм відповідно.

У щурів, після введення мелатоніну, тироцити мали кубічну, рідше пласку форму з середньою висотою 10,5 мкм (весною) та 8 мкм (восени). Площа фолікулярного епітелію у тварин дослідної групи весною зросла на 32 % порівняно з контролем (пов'язано з пропорційним збільшенням площі самих фолікулів). Щури, які отримували мелатонін в осінній період, мали вірогідне зниження площі фолікулярного епітелію на 12 % порівняно з контролем. В ЩЗ тварин дослідних груп

відмічено зростання внутрішнього діаметра фолікулів на 24 % ($P < 0,05$) – після введення мелатоніну у весняний період та на 3 % – після осіннього експерименту (таблиця). Збільшення внутрішнього діаметра фолікулів, зниження висоти тироцитів і площі фолікулярного епітелію вказує на пригнічення активності залози.

У просвіті фолікулів накопичується колоїд, що являє собою гомогенну в'язку рідину, яка містить переважно тиреоглобулін. Залежно від активності ЩЗ, колоїд буває щільним, помірно щільним чи пінистим. Так, при нормофункції колоїд помірно консистентний, в ньому візуалізуються ділянки резорбції, що свідчить про секрецію гормонів. При гіпофункції він стає щільним, без явно виражених резорбційних зон, що говорить про депонування великої кількості гормонів. При гіперфункції його кількість різко зменшується, нерідко він стає пінистим, з'являється багато резорбційних вакуолей

Морфометричні показники щитоподібної залози після введення екзогенного мелатоніну (M±m, n=12)

Показники	Весна		Осінь	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Площа, мкм ²				
фолікула	2466±189	3236±143*	2899±224	2778±207
колоїду	1122±135	1462±87*	1424±195	1485±126
фолікулярного епітелію	1344±93	1774±107*	1475±37	1293±36*
Діаметр фолікула, мкм				
зовнішній	57,4±2,56	68,1±2,62*	57±2,27	56±2,35
внутрішній	37,9±2,54	47,1±2,51*	39±2,32	40,1±2,41
Висота тироцитів, мкм	9,8±0,28	10,5±0,67	9±0,16	8±0,14*

* $P < 0,05$ порівняно з контролем.

[15]. Показано, що в інтактних тварин колоїд у фолікулах має рівномірне рожеве забарвлення, помірної консистенції з резорбційними вакуолями. Колоїд фолікулів дослідних груп тварин помірної щільності, іноді щільний з поодинокими резорбційними вакуолями. Відмічено збільшення його площі на 30 % ($P < 0,05$) – після введення мелатоніну у весняний період та на 4 % – при осінньому експерименті порівняно з контролем. Це вказує на депонування гормонів у середині фолікула, а не вивільнення їх у кровоносне русло. В середньому один фолікул інтактних тварин має 20 тироцитів. Після введення мелатоніну у весняний період спостерігали їх зростання на 13 %.

Фолікулярно-колоїдний індекс (ФКІ) чи індекс активності ЩЗ – відношення площі фолікулярного епітелію до площі колоїду. ФКІ у інтактних тварин становив 1,2 весною та 1,4 восени. У щурів, яких піддавали впливу мелатоніну у весняний період, він залишався на рівні контролю, а в осінній період – вірогідно зменшився на 16 % (рис. 2). Як правило, функціональна активність ЩЗ прямо пропорційна відносній площі фолікулярного епітелію. ФКІ зменшується при зниженні активності ЩЗ та посилюється при активації органа.

Індекс накопичення колоїду (ІНК) – відношення середнього внутрішнього діаметра фолікула до подвійної висоти тиреоїдного

епітелію. ІНК у інтактних груп тварин у весняний та осінній періоди становив 1,93 і 2,24 відповідно. Після впливу мелатоніну він зріс на 16 % ($P < 0,05$) весною і 12 % восени порівняно з контролем (рис. 2), що свідчить про зниження синтетичної активності ЩЗ.

Тироцити вистилають не тільки стінку фолікула, але і можуть розмішуватися в його середині (інтрафолікулярний епітелій) чи локалізуватися за межами фолікулів (інтерфолікулярний епітелій чи інтерфолікулярні острівці). Вважають, що інтерфолікулярний епітелій містить малодиференційовані (камбіальні) клітини і є джерелом формування нових фолікулів (фолікулогенез) [16]. У щурів після введення мелатоніну як у весняний, так і в осінній періоди кількість інтерфолікулярних острівців у полі зору мікроскопа знижується, що є ознакою пригнічення регенерації ЩЗ.

Виявлено певні відмінності в кількості елементів СТ у різну пору року. Так, у щурів, які отримували препарат у весняний період, спостерігали зменшення кількості елементів СТ у залозі. Однак, якщо ширина міжчасткової СТ у дослідних тварин вірогідно знизилась на 35 %, то ширина міжчасточкової та міжфолікулярної – мала лише тенденцію до зменшення порівняно з контролем. В осінній період, навпаки, – у тварин вірогідно збільшувалася ширина міжчасткової, міжчасточ-

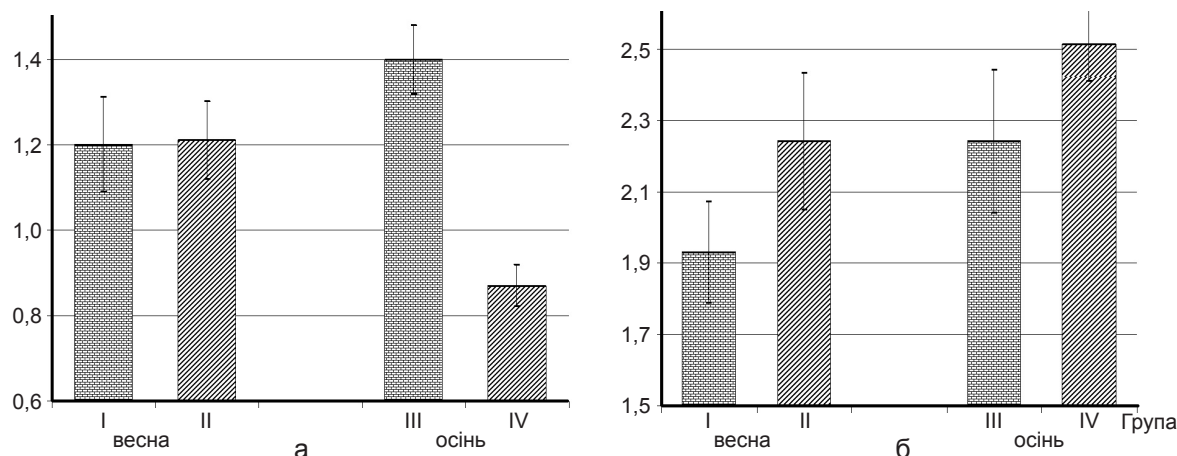


Рис. 2. Фолікулярно-колоїдний індекс (а) та індекс накопичення колоїду (б) в щитоподібній залозі після введення мелатоніну щурам у весняний та осінній періоди. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

кової, міжфолікулярної СТ в ЩЗ на 12, 17 і 31 % відповідно порівняно з контролем (рис. 3). Тобто отримані результати можуть свідчи-

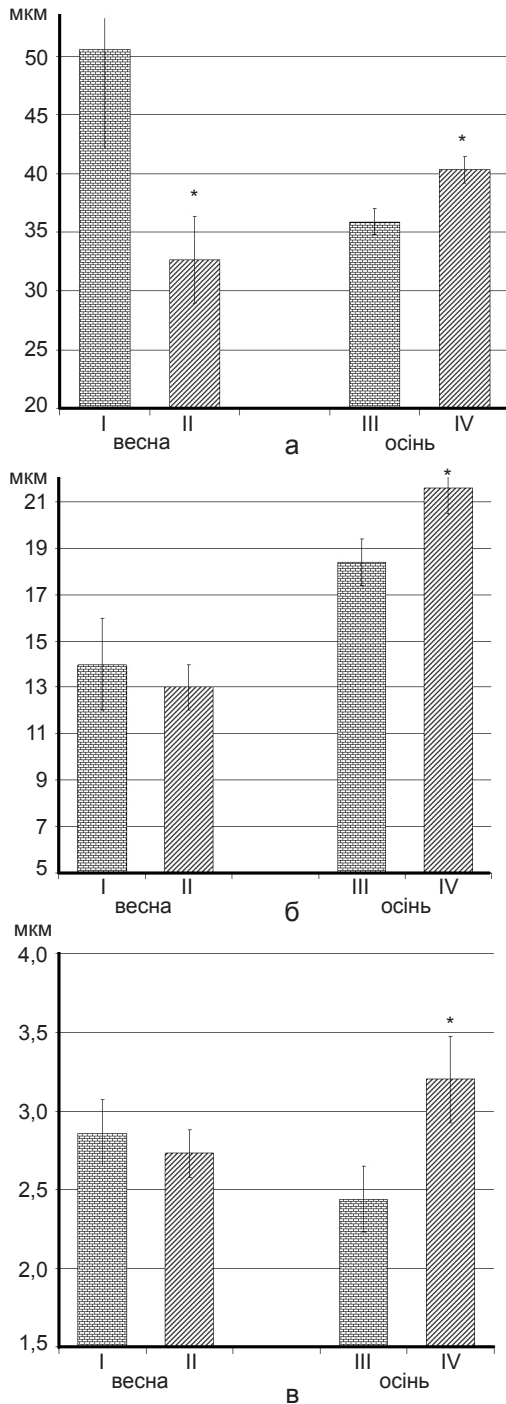


Рис. 3. Ширина міжчасткової (а), міжчасточкової (б) та міжфолікулярної (в) сполучної тканини в щитоподібній залозі щурів після впливу мелатоніну у весняний та осінній періоди. *P<0,05 порівняно з контролем

ти, що мелатонін у весняний період знижує кількість елементів СТ, тоді як восени, навпаки, – призводить до розростання СТ у ЩЗ.

Таким чином, ЩЗ інтактних щурів лінії Вістар у весняний період має більш активний функціональний стан, ніж восени. У тварин, які зазнавали курсового введення мелатоніну у весняний та осінній періоди, виявлено збільшення середньої площі поперечного перерізу фолікулів і площі колоїду (весною), зменшення площі фолікулярного епітелію (восени), зростання внутрішнього діаметра фолікулів і зниження висоти тиреоїдного епітелію (восени). Також у щурів дослідних груп відмічена незначна наявність у колоїді резорбційних вакуолей, зниження ФКІ і підвищення ІНК, зменшення кількості інтерфолікулярних острівців, елементів СТ у весняний період і зростання їх числа восени. Мелатонін у весняний період призводить до більш істотних змін у структурі ЩЗ, ніж восени. Отже, тривале введення екзогенного мелатоніну як у весняний, так і в осінній періоди знижує функціональну активність і фізіологічну регенерацію ЩЗ, але різною мірою.

Р.В. Янко

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА

Исследовали морфофункциональные показатели состояния щитовидной железы (ЩЖ) молодых крыс линии Вистар после введения экзогенного мелатонина в весенний и осенний периоды. Мелатонин животные получали ежедневно на протяжении 28 сут в дозе 5 мг/кг. У крыс опытных групп выявлено увеличение средней площади поперечного сечения фолликулов на 31 % и коллоида на 30 % (весной), внутреннего диаметра фолликулов, снижение площади и высоты фолликулярного эпителия на 12 % (осенью). Также отмечено незначительное наличие в коллоиде резорбционных вакуолей, снижение фолликулярно-коллоидного индекса и возрастание индекса накопления коллоида, уменьшение числа интерфолликулярных островков. Введение мелатонина в весенний период снизило количество элементов соединительной ткани, тогда как при осеннем влиянии, наоборот – существенно увеличилась ширина междольевой (на 12 %), междольковой (на 17 %)

и межфолликулярной (на 31 %) соединительной ткани в ЩЖ. Введение мелатонина в весенний период привело к более существенным изменениям в структуре железы, по сравнению с осенним экспериментом. Таким образом, за большинством исследуемых показателей как в весенний, так и в осенний периоды он снижает функциональную активность и физиологическую регенерацию ЩЖ.

Ключевые слова: мелатонин; щитовидная железа.

R.V. Yanko

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE THYROID GLAND AFTER EXPOSURE TO MELATONIN

Morphofunctional state of the thyroid gland (TG) of young rats after exposure of exogenous melatonin in the spring and autumn periods was investigated. Exogenous melatonin (Unipharm Inc., USA) was administered to experimental group of animals daily at a dose 5 mg/kg. The duration of the experiment was 28 days. It was shown an increase of the cross-section area of follicles by 31 % and colloid by 30 % (in spring), reduction of the area of follicle epithelium by 12 % (in autumn), an increase in the follicle internal diameter and a decline in the thyroid epithelium height by 12 % (in autumn) in TG of experimental groups rats. Also it was shown a decline of follicle-colloid index and growth of colloid accumulation index, reduction amount of interfollicular islets. The introduction of melatonin in the spring period brought down the amount of connecting tissue elements. Melatonin introduction in the autumn period reduced the thickness of connective tissue trabecules in TG. The introduction of melatonin in the spring period resulted in more substantial changes in the structure of TG, as compared to an autumn experiment. Thus, melatonin administered both in the spring and in the autumn periods reduces the functional activity and physiological regeneration of TG.

Key words: melatonin; thyroid gland.

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

REFERENCES

1. Rom-Bugoslavskaya E, Scherbakova V, Bondarenko L. Direct and reverse bonds in the system epiphysis-hyroid gland. Melatonin: General biological and oncoradiological aspects: Proceedings of International Symposium. Obninsk. 1994; 42–3.
2. Lewinski A, Karbownik M. REVIEW. Melatonin and the

- thyroid gland. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 23 (1): 73–8.
3. Champney T. Reductions in hamster serum thyroxine levels by melatonin are not altered by changes in serum testosterone. *Gen Comp Endocrinol.* 2001; 123 (2): 121–26.
4. John T, Viswanatham M, George J. Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose and free fatty acids in the pigeon. *Gen Comp Endocrinol.* 1990; 79 (2): 226 – 232.
5. Baltaci A, Mogulkoc R, Kul A, Bediz C, Ugur A. Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology.* 2004; 195 (1): 69–75.
6. Sakamoto S, Nakamura K, Inoue K, Sakai T. Melatonin stimulates thyroid-stimulating hormone accumulation in the thyrotropes of the rat pars tuberalis. *Histochem Cell Biol.* 2000; 114 (3): 213–18.
7. Gevorkyan A, Gubina-Vakulik G, Bondarenko L. The morphofunctional changes in the thyroid of old rats after a course of melatonin application with 24-hourly dependence. *Probl Endocr Pathol.* 2009; 4: 103–11.
8. Bondarenko L, Sotnik N, Chagovets E, Sergienko L, Cherevko A. Intensity of in vitro incorporation of 3H-melatonin in the thyroid gland of rabbits with pineal gland hypofunction. *Bull Exp Biol Med.* 2011; 150 (6): 753–55.
9. Dzerzhynsky M, Gorelikova O, Pustovalov A. The interaction of the thyroid gland, pineal gland and immune system in chicken. *Reprod Biol.* 2006; 6 (2): 79–85.
10. Siegrist C, Benedetti C. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J Pineal Res.* 2001; 1: 34–42.
11. Varenjuk I, Nuzhuna N, Yanko R, Dzerzhynsky M. Morphological characteristics of the hypothalamic-thyroid system of birds after a single dose of melatonin at different times of day when blocked dopamine D2 receptors. *Visnuk KNU name of Taras Shevchenko.* 2012; 61: 4–6.
12. Arendt J. Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms. *J Neuroendocrin.* 2003; 15 (4): 427–31.
13. Pevet P. Melatonin and biological rhythms. *Therapie.* 1998; 30 (1): 109–124.
14. Volkova O, Eleskiy U. Bases of histology with a histological technique. Moscow: Medicine. 1982: 304 p.
15. Zabrodin V. Morphology of thyroid and methods of her study: methodical recommendations. Smolensk: SGMA. 2005: 37 p.
16. Nikishin D. Morphology and methods of thyroid research: methodical recommendations. Penza: Inf Publ Center PGU. 2008: 64 p.

Матеріал надійшов до редакції 03.11.2014

Вплив NO та мексидолу на скоротливість оваріального і цервікального відділів матки мишей за умов імуноопосередкованого запального процесу

А.П. Литвиненко, Т.Ю. Вознесенська, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: alinaluk17@mail.ru

Досліджували скоротливість оваріального (ОВ) і цервікального (ЦВ) відділів матки у мишей за умов імуноопосередкованого запального процесу, викликаного імунізацією бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Встановлено, що у разі активації енергосинтезувальних функцій мітохондрій за допомогою мексидолу зменшується частота скорочень, зростають амплітуда та індекс скоротливості в ОВ та ЦВ міометрія, а також тривалість активного стану в останньому. Дія мексидолу на тлі імунізації БСА спричинює у ОВ зменшення амплітуди в 2,6 раза, індексу скоротливості у 2,2 раза, а у ЦВ – викликає їх зростання. Показано, що особливості скоротливості ОВ і ЦВ матки зумовлені змінами функціонального стану мітохондрій, а також пов'язані із залученням оксиду азоту, пул якого може бути різний у досліджуваних відділах матки.

Ключові слова: скоротливість; оваріальний і цервікальний відділи матки; імунізація бичачим сироватковим альбуміном; оксид азоту.

ВСТУП

Нині активно вивчають функціональну диференціацію різних відділів матки у ссавців. Відмічено фізіологічні відмінності між верхнім і нижнім сегментами матки [1 – 3]. Доведено, що у шурів окремі пейсмекерні клітини знаходяться у верхньому, оваріальному (ОВ) – розташованому ближче до яєчника, та нижньому, цервікальному (ЦВ) – ближче до шийки матки відділах [2]. Особливості скоротливості верхнього і нижнього сегментів матки недостатньо досліджені. Згідно з сучасними літературними даними, імуноопосередковані запальні процеси впливають на функціонування яєчників, змінюють скоротливість міометрія [4], призводять до порушення імплантації та передчасних пологів [5], зумовлюють безпліддя й нерезультативні спроби при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій. Системні васкуліти, які належать до групи імунокомплексних хвороб, можуть бути причиною передчасних

пологів (40 %) і навіть викликають загибель матері і плоду (5–10 % випадків) [6].

Вважається, що оксид азоту (NO) регулює скоротливу активність міометрія через вплив на кальційтранспортувальні системи плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулума і мітохондрій. Він спричиняє зростання проникності сарколеми для Ca^{2+} , стимулює пасивний транспорт катіона у міоцити крізь дигідропіридинчутливі канали, посилює транспорт протонів із міоцитів та стимулює Na^+ , K^+ -АТФазу [7], змінює функціонування мітохондріальних переносників [8]. Фармацевтичний препарат мексидол, діюча речовина якого етилметилгідроксипіридин сукцинат (ГС), активує енергосинтезувальні функції мітохондрій та в досліджах *in vitro* знижує активність індукбельної NO-синтази [9]. Крім того, мексидол сприяє поліпшенню ендотеліальної функції, стабілізації біологічних мембран, підвищує активність антиоксидантних ферментів [10]. Хоча цей препарат має широке застосуван-

ня в медицині, проте не встановлено його вплив на скоротливість міометрія. Відомо, що аргіназа через гальмування утворення NO може впливати на кровообіг [11]. Контракційна активність міометрія залежить від його кровопостачання. Тому актуальними є дослідження скоротливості різних відділів міометрія за умов імунокомплексних реакцій, зміни функціонального стану мітохондрій та вивчення участі NO за таких експериментальних умов.

Мета нашої роботи – з'ясувати участь NO та мітохондрій в скоротливості ОВ і ЦВ міометрія за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА).

МЕТОДИКА

Досліди проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV. Тварин було поділено на 6 груп. До I групи ввійшли тварини, яким вводили фізіологічний розчин, $n=8$; до II – тварини, яких імунізували БСА («Sigma», США) (вводили зростаючі дози антигена раз на тиждень внутрішньовенно протягом 6 тиж за такою схемою: 150 – 300 мг БСА/кг маси миші, $n=8$); до III – миші, які отримували внутрішньоочеревинну ін'єкцію препарату мексидол (100 мг/кг, згідно із схемою імунізації, $n=8$); IV – блокатор аргінази II L-норвалін (внутрішньоочеревинно, 50 мг/кг, $n=4$); V – мексидол за умов імунізації БСА (внутрішньоочеревинно, 100 мг/кг, $n=8$); VI – L-норвалін за умов дії мексидолу при імунізації БСА (внутрішньоочеревинно, в день після введення БСА і ГС, $n=8$).

Методом фазно-графічного аналізу визначали скоротливість ОВ і ЦВ матки. У декапі-

тованих під наркозом тварин відпрепарувували ОВ і ЦВ міометрія і поміщали в холодний розчин Кребса (4°C, pH 7,29) такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5,9, NaHCO₃ – 15,5, NaH₂PO₄ – 1,2, MgCl₂ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, глюкози – 11,5 («Sigma», США). Смужки міометрія переносили до експериментальної камери. Рівномірну перфузію розчину здійснювали перистальтичним насосом НП-1М. Ізометричну силу скорочень вимірювали механо-електричним перетворювачем (FT 106). Візуальний контроль досліджуваних показників проводили за допомогою осцилографа С1-83. Водночас отримували комп'ютерний запис в програмі IRIS Waveware версії 2.6.1. Базову активність реєстрували протягом 20–30 хв. Для кількісної характеристики фазних скорочень ОВ і ЦВ матки досліджували такі показники: амплітуду скорочень (F_{\max} , мН), частоту скорочень (ЧС, с⁻¹), тривалість активного стану – час між максимальною активацією (CV_{\max}) і дезактивацією (RV_{\max}) скорочення (Т, с), швидкість скорочення і розслаблення (CV_{\max} , RV_{\max} , мН/с), індекс скоротливості (ІС, як добуток F_{\max} на CV_{\max}/RV_{\max} , мН) [12].

Для статистичного аналізу результатів використовували програму GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Результати перевіряли на нормальність розподілу за тестом Колмогорова–Смирнова. Далі використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмена–Кейлса (Newman–Keuls post hoc test). Результати виражали як $M \pm SD$ (середнє \pm стандартне відхилення). $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ОВ матки за умов дії ГС амплітуда зросла в 1,85 раза ($P < 0,05$) та ІС в 2,17 раза ($P < 0,01$), а у ЦВ – в 1,84 та 1,72 раза відповідно ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Введення ГС в ОВ викликало зменшення ЧС в 1,86 раза ($P < 0,001$)

і статистично не впливало на тривалість активного стану. У ЦВ тривалість активного стану зросла в 1,41 раза ($P < 0,05$), а ЧС зменшилась в 1,31 раза порівняно з контрольними значеннями ($P < 0,01$) (рисунок).

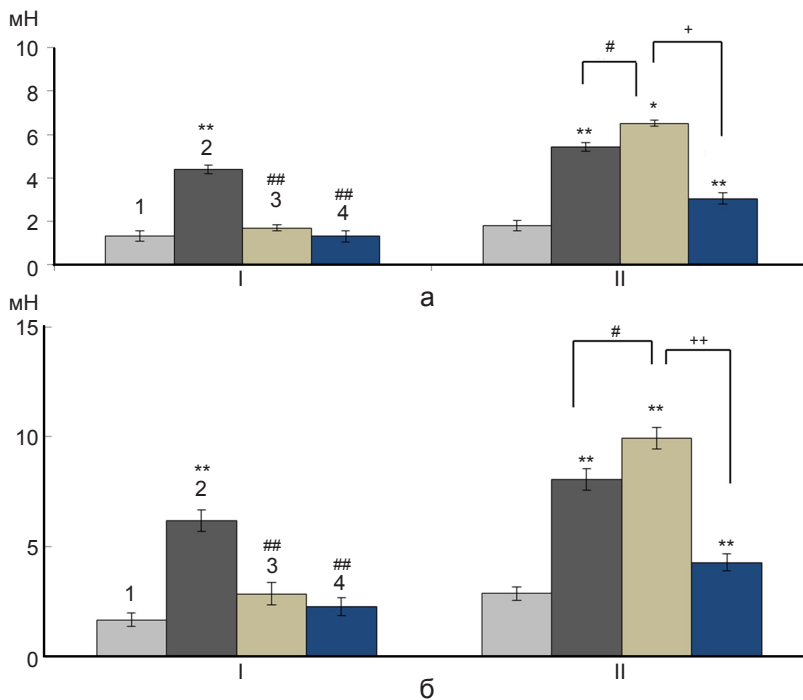
Згідно з даними літератури, введення ГС збільшує середню площу мітохондрій кардіоціотів та середню довжину саркомера [13]. Ми припускаємо, що через активацію енергосинтезувальної функції мітохондрій ГС чинить вплив на скоротливість міометрія мишей.

Показано, що введення L-норваліну зменшувало амплітуду у ОВ в 1,78 раза ($P < 0,05$), тоді як ІС статистично не змінився. У ЦВ амплітуда скорочень зменшилась в 2,41 раза ($P < 0,01$), ІС в 2,50 раза ($P < 0,01$) порівняно зі значеннями у контролі. Введення L-норваліну вірогідно не змінювало ЧС та Т як у ОВ, так і в ЦВ матки. Таким чином, L-норвалін зменшував скоротливість обох відділів, проте зміна ІС була різною, що може свідчити про

різний пул NO в ОВ і ЦВ міометрія. Зміни амплітуди та ІС ОВ і ЦВ за умов імунізації мишей БСА і введення мексидолу та L-норваліну представлені на рисунку.

Встановлено, що за умов імунізації БСА після введення мексидолу у ОВ амплітуда зменшилась в 2,6 раза, ІС в 2,2 раза ($P < 0,01$), у ЦВ матки амплітуда зросла в 1,2 раза та ІС в 1,3 раза ($P < 0,05$) порівняно з відповідними значеннями у імунізованих тварин. У ОВ відбувалося зменшення ЧС в 2,6 раза ($P < 0,01$), значення Т статистично не змінилось. У ЦВ встановлено зростання Т в 2,2 раза ($P < 0,001$) та зменшення ЧС в 2,0 раза порівняно з такими у імунізованих БСА тварин ($P < 0,05$). Застосування ГС сприяло нормалізації ЧС.

Введення блокатора аргінази II за умов дії ГС на тлі імунізації мишей БСА зумовлювало зниження амплітуди та ІС в обох відділах міометрія. Проте ці значення в ОВ наближались до контрольних, а у ЦВ були вищими і прирівнювалися до значень, які спостеріга-



Зміни амплітуди (а) та індексу скоротливості (б) оваріального (I) і цервікального (II) відділів матки за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном і введення мексидолу та L-норваліну: 1 – контроль; 2 – імунізація; 3 – мексидол за умов імунізації; 4 – мексидол і L-норвалін за умов імунізації; * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ відносно контролю, # $P < 0,01$; ## $P < 0,001$ відносно імунізованих тварин; + $P < 0,01$, ++ $P < 0,001$ відносно тварин, яким вводили мексидол при імунізації

ються при дії ГС у інтактних тварин. Отримані результати можуть свідчити про те, що аргіназа II за умов імунізації БСА та активації енергосинтезувальних функцій мітохондрій задіяна в змінах скоротливості ЦВ міометрія. Водночас скоротлива активність ОВ менше залежить від NO, продукованого за аргіназним шляхом.

ВИСНОВКИ

1. При імунізації БСА зміна функціонального стану мітохондрій за допомогою мексидолу призводить до зміни параметрів скоротливості матки: в ОВ – зменшує амплітуду та ІС, а у ЦВ – викликає їх зростання.

2. Блокатор аргінази II L-норвалін зменшує параметри скоротливості в обох відділах міометрія, проте не впливає на ІС у ОВ, що може свідчити про різний пул NO в ОВ і ЦВ матки.

3. За умов імунізації БСА, яка призводить до імуноопосередкованого запального процесу, особливості скоротливості ОВ і ЦВ матки зумовлені змінами функціонального стану мітохондрій, а також пов'язані з залученням NO.

A.P. Lytvynenko, T. Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy

THE ROLE OF NO AND MEXIDOL IN CONTRACTILITY OF OVARIAN AND CERVICAL PARTS OF UTERUS UNDER THE CONDITION OF IMMUNE-MEDIATED INJURY IN MICE

Contractility of ovarian (OP) and cervical parts (CP) of uterus under the condition of immune-mediated injury which was induced by immunization with bovine serum albumin (BSA) was investigated. It was shown that under the activation of energy-synthesizing function of mitochondria with Mexidol the frequency of reductions in both uterine parts decreased, the amplitude and contractility index in the OP and CP as well as the duration of the active state in CP increased. Mexidol under the condition of immunization with BSA leads to the decrease in amplitude in 2,6 time and contractility index in 2,2 time in OP and to the increase of them in CP.

It was shown that contractility features of ovarian and cervical parts of uterine under the condition of BSA- induced immunization were caused by changes of mitochondria

functional state and were associated with nitric oxide.

Key words: contractility, ovarian and cervical uterine parts, BSA-immunization, nitric oxide.

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

A.П. Литвиненко, Т.Ю. Вознесенская, Р.И. Янчий

ВЛИЯНИЕ NO И МЕКСИДОЛА НА СОКРАТИМОСТЬ ОВАРИАЛЬНОГО И ЦЕРВИКАЛЬНОГО ОТДЕЛОВ МАТКИ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ИММУНООПОСРЕДОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Исследовали сократимость овариального (ОО) и цервикального (ЦО) отделов матки у мышей в условиях иммуноопосредованного воспалительного процесса, вызванного иммунизацией бычьим сывороточным альбумином (БСА). Установлено, что в условиях активации энергосинтезирующих функций митохондрий с помощью мексидола уменьшается частота сокращений в обоих отделах миометрия, возрастают амплитуда и индекс сократительности, а также продолжительность активного состояния в ЦО. Мексидол в условиях иммунизации БСА приводит в ОО к уменьшению амплитуды в 2,6 и индекса сократимости в 2,2 раза, а в ЦО – вызывает их повышение. Показано, что особенности сократительности ОО и ЦО матки обусловлены изменениями функционального состояния митохондрий, а также связаны с оксидом азота, пул которого может быть различен в исследуемых отделах матки.

Ключевые слова: сократительность; овариальный и цервикальный отделы матки; иммунизация бычьим сывороточным альбумином; оксид азота.

REFERENCES

1. Mosher AA, Rainey KJ, Bolstad SS. Development and validation of primary human myometrial cell culture models to study pregnancy and labour. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2013; 13 Suppl 1:S7.
2. Kazaryan KV, Hunanyan NG, Melkonyan NN. Effect of Blood Supply on Parameters of Pacemaker Activity of Rat Uterus. *J of Evolutionary Biochem. and Physiol*. 2013; 49 (1): 60–6.
3. McCloskey C, Rada C, Bailey E. The inwardly rectifying K⁺ channel KIR7.1 controls uterine excitability throughout pregnancy. *EMBO Mol Med*. 2014; (6): 1161–74.
4. Volkova NO, Yuhta MS, Yurchuk TO, Stepanuk LV, Ivanova OD. Modeling of chronic ovary inflammation. *Pathologia*. 2014; 1 (30): 100–4. [Ukrainian].
5. Prins JR, Kieffer TE, Scherjon SA. Immunomodulators to treat recurrent miscarriage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; 181:334-7.
6. Gatto M, Iaccarino L, Canova M, Zen M, Nalotto L,

- Ramonda R. et al. Pregnancy and vasculitis: a systematic review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2012; 11 (6-7): 447–59.
7. Danylovykh YuV. Nitric oxide as the regulator of intracellular homeostasis in the uterus myocytes. *Ukr Biokhim Zh.* 2012; 84 (3): 5-25. [Ukrainian].
8. Kalejnikova ON, Blashkiv TV, Yanchiy IR, Voznesenskaya TYu. Miometrium contraction activity in conditions of mitochondrion functional changes at mice. *Ukr Med Almanac.* 2013; 16 (1): 186-8.
9. Shchulkin AV. Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the neuronal excitotoxicity in vitro. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova.* 2012;112 (2): 35-9.
10. Yevsegneyeva IV, Dolgushina AI. Administration of Mexidol in treatment of elderly and senile patients with chronic gastrointestinal diseases combined with atherosclerosis in abdominal aorta and age-related macular degeneration. *Effective pharmacotherapy.* 2014, 30 (1): 18-22. [Russian].
11. Lucas R, Fulton D, Caldwell RW, Romero MJ. Arginase in the vascular endothelium: friend or foe? *Front Immunol.* 2014, Nov 17;5:589.
12. Gullam J, Blanks A, Thornton S, Shmygol A. Phase-plot analysis of the oxytocin effect on human myometrial contractility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144 (Suppl. 1): 20-4.
13. Bugrova ML, Kharkovskaya EE, Yakovleva EI. The effect of mexidol on atrial natriuretic peptide in langendorf rat heart preparation. *Modern Technologies in Medicine.* 2014, 6 (2): 25-31.[Russian].

Матеріал надійшов до редакції 11. 05. 2015 р.

Expression of aryl hydrocarbon receptor and ATG16L1 protein in experimental oxazolone-induced colitis in rats

Zaporozhye State Medical University; e-mail: gerya2009@yandex.ru

We studied the expression of AhR and ATG16L1 protein in experimental oxazolone-induced colitis in rats and anti-inflammatory action of recombinant antagonist of IL-1 receptors (ARIL-1) and simvastatin. The immunopositive cells were determined using an indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal rat antibody. It has been established that development of colitis was accompanied by an increase of total number of ATG16L1⁺-lymphocytes (by 30%, $P < 0.05$) in lymphoid structures of the colon. However, the amount of AhR⁺-lymphocytes has not changed. At the same time has increased the concentration of ATG16L1 protein (by 4-11%, $P < 0.05$) in immunopositive cells. Administration of simvastatin and ARIL-1 during the development of experimental pathology was accompanied by decrease of total number of AhR⁺ (by 24-38%, $P < 0.05$) and ATG16L1⁺-lymphocytes (by 43% - 2 fold, $P < 0.05$) in the colon.

Key words: colitis; recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 (ARIL-1); simvastatin; aryl hydrocarbon receptor; autophagy related 16-like 1 protein.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are the main clinical phenotypes of inflammatory bowel disease (IBD). Both forms of IBD can increase the incidence of gastrointestinal and colon cancers, and both ones affect individuals throughout life. Although the etiology and pathogenesis of UC and CD has not been fully revealed yet, it is widely accepted that both are complex and multifactorial [1]. The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcription factor activated by a large number of environmental agents, modulates the activity of immune and nonimmune cells in the gut, and may represent an important link between the environment and the immune perturbations which underlie the pathogenesis of IBD. Recent findings in diverse murine models of colitis have helped to reveal the importance of AhR dysfunction mechanisms in IBD pathogenesis [2]. Although AhR seems to be a crucial cofactor in regulation of both homeostasis and inflammation, its role in the gut autoimmune pathology is poorly described. Conclusion

© A.S. Zhrebiatiev, A.M. Kamyshny

from the data obtained from either the ligand-activated AhR cell lineages or AhR null mice clearly states the physiological importance of this receptor in cell growth [3], cell apoptosis [4], and endoplasmic reticulum stress (ER) response [5]. Apoptosis and autophagy are two evolutionarily conserved processes that maintain homeostasis during stress. Although the two pathways utilize fundamentally distinct machinery, apoptosis and autophagy are highly interconnected and share many key regulators. The crosstalk between apoptosis and autophagy is complex, as autophagy can function to promote cell survival or cell death under various cellular conditions. Autophagy is also important to engulf damaged ER in the unfolded protein response [6]. The *ATG16L1* gene is coding the protein called autophagy related 16-like 1. This protein is part of a larger family of proteins that are required for a process called autophagy. Autophagy is involved in the body's inflammatory response and helps the immune system to destroy some types of harmful bacteria and viruses. The effects of variations in the *ATG16L1* gene in Crohn's

disease pathogenesis are unclear. Changes in this gene may affect the autophagy process, allowing worn-out cell parts and harmful bacteria to persist when they would otherwise be destroyed. These cell components and bacteria may trigger an inappropriate immune system response, leading to chronic intestinal inflammation and the digestive problems which are hallmark of CD pathogenesis. Thus, there is a relationship between AhR, apoptosis, response to endoplasmic reticulum stress, autophagy and ATG16L1 [7, 8].

Therefore the aim of this study was to investigate the expression of AhR and ATG16L1 protein in experimental oxazolone-induced colitis in rats and anti-inflammatory action of recombinant antagonist of IL-1 receptors (ARIL-1) and simvastatin.

METHODS

Animals and Tissue isolation

Eight-month-old male Wistar rats were purchased from Institute of Molecular Biology and Genetics (National Academy of Science of Ukraine, Kyiv) and kept in a 12-h light/dark cycle with controlled humidity (60–80%) and temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Food and water were freely available. All animal experiments were performed according to international principles “of the European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 18.03.1986) and “General ethical principles of animal research” (Ukraine, 2001). Single animals were fasted overnight and sacrificed by cervical dislocation after receiving an overdose of ether for the isolation of gut tissue. Rats were euthanized 6 days after induction of colitis. For macroscopic observation, the colon was dissected from rats. The distal colon was removed, opened longitudinally and the mucosal damage was scored on a 0-10 scale according to the criteria of Bobin-Dubigeon et al. [9]. After removal of the colon, the tissue was flushed with cold phosphate buffered saline. The colon tissue

samples were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin for histological analysis. Tissues were scored semi-quantitatively from 0 to 5 (0, no changes to 5, marked transmural inflammation with severe ulceration and loss of intestinal glands) in a blinded fashion according to previously described criteria [10]. For histochemical studies, colon tissue samples were fixed in formalin, and after paraffin embedding 5 μm sections were cut and stained with a monoclonal antibody.

Drugs

Simvastatin was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and prepared as a 4 mg/ml stock. Briefly, 4 mg was dissolved in 100 μl of ethanol and 150 μl of 0.1 N NaOH, incubated at 50°C for 2 h, and then pH adjusted to 7 and volume corrected to 1 ml. It was chemically activated by alkaline hydrolysis before subcutaneous injection. ARIL-1 was kindly provided by Resbio LLC (St. Petersburg, Russia). Substance ARIL-1 consists of 153 amino acids obtained by genetic engineering technology. The substance is lyophilized protein IL-1ra, which produced by a recombinant strain *E. coli* BL21.

Oxazolone -induced colitis

Oxazolone (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazoline-5-one) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). In order to presensitize rats, a 2×2 cm field of the abdominal skin was shaved, and 200 μl of a 3% (w/v) solution of oxazolone in 100% ethanol was applied. 7 days after presensitization intrarectal injection was performed 0.1% oxazolone in 50% ethanol (1.5 mg/kg of body weight) under general anesthesia with ketamine, 4~8 cm proximal to the anal verge of rats using a catheter (1 mm diameter) (Sherwood, St. Louis, MO) [9]. Rats were kept in a head-down position for 30 s and then returned to their cages. Ethanol (40%) is used to help haptens go through the intestinal epithelial barrier.

Animal groups

Rats were divided into four experimental groups: group 1 — control (rectal challenge with 50% ethanol only); group 2 — rats with

oxazolone-induced colitis; group 3 — rats given simvastatin (20 mg/kg, 2 ml/kg in the mixture of ethanol, H₂O, NaOH and HCl for 5 days, intraperitoneally); group 4 — rats given ARIL-1 (3 mg/kg, 2 ml/kg in the phosphate buffer solution (PBS) for 5 days, subcutaneously).

Immunohistochemical staining

Formalin-fixed, paraffin embedded colon sections (5–7 µm) placed on coated slides were sequentially deparaffinized and rehydrated using xylene and ethanol, washed in PBS (twice, 5 min each). After rinsing in 0.1 M PBS, the sections were incubated overnight at 4°C with the respective primary antibody (dilution 1:50): Aryl hydrocarbon Receptor (H-211: sc-5579) — a rabbit anti-mouse polyclonal antibody or Atg16 Antibody (C-20: sc-70133) — a goat polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotechnology, INC, CA). On the second day, after washing, sections were incubated for 1 h with a mixture of FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG or rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, INC, CA, catalog numbers sc-2012, sc-2777). While protected from direct light exposure, samples were washed three times in PBS and mounted. Fluorescent images were obtained with a fluorescence microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) with a computer-assisted video system AxioCam 5c (ZEISS, Germany). Fluorescent signal intensity was quantified using ImageJ software (NIH Image version 1.46). The lamina propria of mucous layer (LAM PR) and tela submucosa (TELA SUBM) colon were studied.

Statistical analysis

Results were statistically treated with Student's t-test using STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc. 2001,

USA) and presented as mean±SEM. Statistical differences were considered significant if the P value was <0.05.

RESULTS

Animals treated with oxazolone rapidly developed colitis marked by weight loss and diarrhea peaking by day 2 after oxazolone administration and leading to death of 40% of the rats by day 4. Thereafter, surviving animals at days 4–7 after oxazolone administration slowly increased their weight and by days 10–12 the majorities of the rats were free of diarrhea and appeared healthy. In accordance with these observations, histologic examination revealed loss of normal architecture, a mixed cell inflammatory infiltrate, and areas of epithelial erosion. Control rats treated with 50% ethanol alone did not develop wasting disease and exhibited a healthy appearance. Administrations of simvastatin and ARIL-1 resulted in a significant reduction in clinical, macroscopic and microscopic parameters of colitis compared with the vehicle-treated group (Table 1).

The study of serial sections of colon showed that the development of colitis is not accompanied by changes of total number of AhR immunopositive lymphocytes (AhR⁺) in lymphoid structures of colon (Fig. 1A, D).

But, the administrations of simvastatin in experimental animals during the development of experimental pathology was accompanied by decrease of AhR⁺-cells by 38% (in LAM PR, P <0.05) in proximal colon (Fig. 1B); by 24% (in TELA SUBM, P <0.05) in distal colon in comparison with vehicle-treated group (Fig.

Table 1. Effect of simvastatin or ARIL-1 on clinical parameters of oxazolone-induced colitis in rats (mean ± SD).

Group	n	Body weight (g)	Macroscopy score	Histology score
Control	10	130.3 ± 14.2	1.00±0.71	1.00±0.71
Oxazolone-induced colitis	15	105.0 ± 10.9*	6.60±0.55*	14.00±1.22*
Colitis + simvastatin	15	115.2 ± 11.5*	3.20±0.43*	5.00±1.13*
Colitis + ARIL-1	15	117.1 ± 11.3*	3.00±0.25*	3.00±0.42*

* P <0.05, vs. control group.

1E). The measuring of fluorescence intensity of AhR⁺-lymphocytes expressing the AhR showed reliable decrease of this parameter in AhR⁺-small lymphocytes by 10% (in TELA SUBM, P <0.05), but the increase in ATG16L1⁺-lymphoblasts by 24% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon.

The administrations of ARIL-1 to experimental animals during the development of experimental pathology was accompanied by the decrease of AhR⁺-cells by 34% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon (Fig. 1C); by twice (in TELA SUBM, P <0.05) in distal colon in comparison with vehicle-treated group (Fig. 1F).

The study of serial sections of colon showed that the development of colitis is accompanied by changes of total number of ATG16L1 immunopositive lymphocytes (ATG16L1⁺) in lymphoid structures of colon — increase of ATG16L1⁺-cells by 30% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon (Fig. 2A). The measuring of fluorescence intensity of ATG16L1⁺-lymphocytes expressing the concentration of ATG16L1 protein in immunopositive cells showed reliable increase of this parameter in

ATG16L1⁺-small lymphocytes by 8% (in TELA SUBM, P <0.05), in ATG16L1⁺-medium lymphocytes by 4% (in TELA SUBM, P <0.05), but the decrease in ATG16L1⁺-lymphoblasts by 9% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon. In distal colon we have found increase of this parameter in ATG16L1⁺-lymphoblasts by 11% (in LAM PR, P <0.05) in comparison with control.

The administrations of simvastatin in experimental animals during the development of experimental pathology was accompanied by decrease of ATG16L1⁺-cells by twice (in LAM PR, P <0.05) and by 44% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon in comparison with vehicle-treated group (Fig. 2B). The measuring of fluorescence intensity of ATG16L1⁺-lymphocytes showed decrease of this parameter in ATG16L1⁺-small lymphocytes by 16% (in TELA SUBM, P <0.05) in proximal colon; decrease in ATG16L1⁺-small lymphocytes by 11% (in LAM PR, P <0.05) in distal colon.

The administrations of ARIL-1 to experimental animals during the development of experimental pathology was accompanied by the decrease of ATG16L1⁺-cells by 43% (in LAM

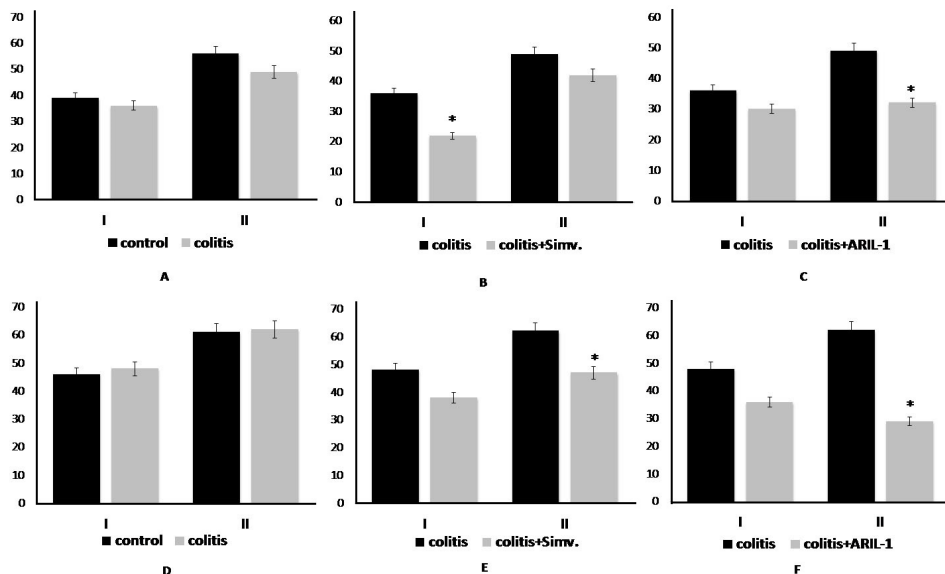


Fig. 1. The number (on 1 mm²) of AhR⁺-cells in proximal colon during the development of colitis (A) and after administration of simvastatin (B) or ARIL-1 (C) to experimental animals during the development of colitis; distal colon during the development of colitis (D) and after administration of simvastatin (E) or ARIL-1 (F) to experimental animals during the development of colitis: I – lamina propria of mucous layer; II – tela submucosa. *P < 0.05 (paired two-group t-test, compared with control or colitis)

PR, $P < 0.05$) and by 44% (in TELA SUBM, $P < 0.05$) in proximal colon (Fig. 2C); by 39% (in TELA SUBM, $P < 0.05$) in distal colon in comparison with vehicle-treated group (Fig. 2F). The measuring of fluorescence intensity of ATG16L1⁺-lymphocytes showed decrease of this parameter in ATG16L1⁺-small lymphocytes by 13% (in TELA SUBM, $P < 0.05$) in proximal colon; decrease in ATG16L1⁺-lymphoblasts by 12% (in LAM PR, $P < 0.05$) in distal colon.

DISCUSSION

We found that the development of colitis is not accompanied by changes of total number of AhR⁺ in lymphoid structures of colon, but these results do not corroborate recent studies Furumatsu et al. [11], because they have described the development of colitis during DSS administration is associated with increased the expression levels of AhR and CYP1A1 mRNA in the colon epithelium. In addition, oral administration of β -naphthoflavone (β NF), a non-toxic agonist of AhR, suppressed the pathogenesis of DSS-induced colitis. β NF also attenuated

DSS-induced colitis. In cell culture experiments, downregulation of AhR in human colon carcinoma SW480 cells enhanced the inflammatory responses evoked by lipopolysaccharide (LPS), and furthermore, AhR activation attenuated LPS-induced inflammatory responses, suggesting that AhR expressing intestinal epithelial cells are involved in the prevention of colitis. Analysis of AhR in the human gut reveals that intestinal T cells and natural killer cells isolated from Crohn's disease patients express low levels of AhR and respond to AhR ligands by downregulating inflammatory cytokines and upregulating IL-22 [2].

Functional ATG16L1 is crucial for the induction of autophagy. Atg5-Atg12 protein conjugates interact with Atg16L1 to form a high molecular weight protein complex essential for the elongation of the autophagosomal membrane. Caspase 3 activation in the presence of a common risk allele leads to accelerated degradation of ATG16L1, placing cellular stress, apoptotic stimuli and impaired autophagy in a unified pathway that predisposes to Crohn's disease [12].

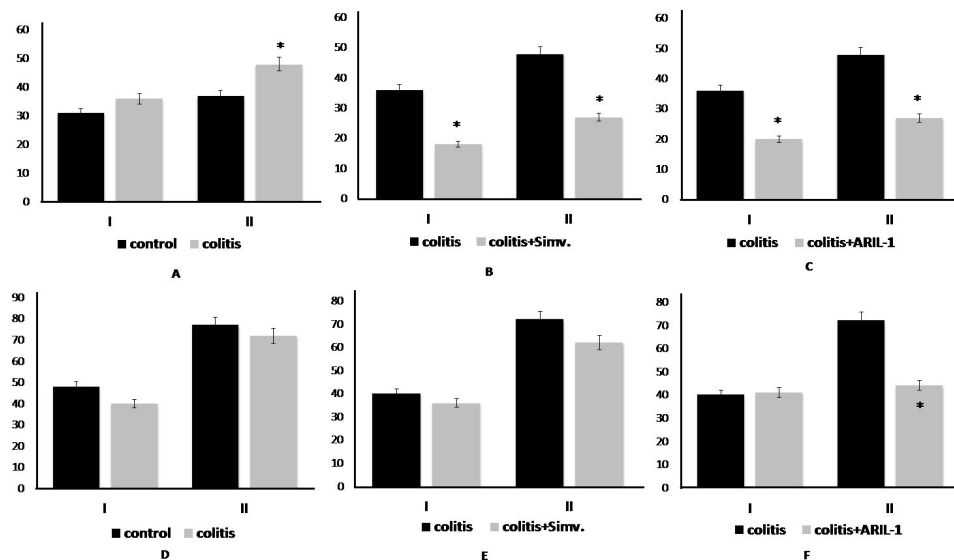


Fig. 2. The number (on 1 mm²) of ATG16L1⁺-cells in proximal colon during the development of colitis (A) and after administration of simvastatin (B) or ARIL-1 (C) to experimental animals during the development of colitis; in distal colon during the development of colitis (D) and after administration of simvastatin (E) or ARIL-1 (F) to experimental animals during the development of colitis: I – lamina propria of mucous layer; II – tela submucosa. * $P < 0.05$ (paired two-group t-test, compared with control or colitis)

Saitoh et al. [13] demonstrated that Atg16L1-deficient chimeric mice administered 5% DSS for 7 days exhibited a marked exacerbation of colitis with reduced survival. Mice lacking Atg16L1 in haematopoietic cells are highly susceptible to dextran sulphate sodium-induced acute colitis, which is alleviated by injection of anti-IL-1 β and IL-18 antibodies, indicating the importance of Atg16L1 in the suppression of intestinal inflammation. Atg16L1^{HM} mice exhibited increased susceptibility to DSS colitis, which could be abrogated by antibiotic treatment, or administration of anti-TNF or anti-IFN γ antibodies [14].

Our results about the ability of simvastatin to affect proinflammatory signaling in the gut are indirectly confirmed by other authors. Simvastatin has been shown to inhibit acute as well as chronic inflammatory responses in a cholesterol-independent manner by interfering with endothelial adhesion and leukocyte migration to sites of inflammation [15]. In rats with normal blood cholesterol levels, simvastatin was found to ameliorate immunopathology in an acute TNBS colitis model by blocking neutrophil accumulation in the small intestine and lowering serum TNF- α level [16]. Administration of simvastatin significantly reduced the severity of DSS-induced murine colitis as assessed by body weight, colon length and histology in a dose-dependent manner [17].

Administration of recombinant IL-1Ra prevents mucosal inflammation and necrosis in a rabbit model of dextran-induced colitis [18]. Conversely, neutralization of endogenous IL-1Ra increases the severity of intestinal inflammation, indicating that endogenous IL-1Ra plays an anti-inflammatory role. The importance of IL-1 and IL-1Ra in the pathogenesis of IBD has been corroborated by the association between carriage of IL-1RN allele 2, low production of IL-1Ra and severity of disease in UC patients [19]. Our data demonstrate ability of ARIL-1 to influence the level of expression of pattern recognition receptors and show therefore potential in the correction of immune disorders in

IBD. Characteristically, ARIL-1 operates as pure antagonist by blocking communication between the molecules of IL-1 (IL-1- α , IL-1- β) and IL-1 receptor that allows providing effective control for the whole IL-1 system in the body.

CONCLUSION

Development of colitis was accompanied by changes of total number of ATG16L1⁺-lymphocytes in proximal part of the colon, but not accompanied with the change of amount of AhR⁺-lymphocytes, and change the density of AhR and ATG16L1 in immunopositive cells.

Administration of anti-inflammatory compounds simvastatin and antagonist of IL-1 receptors during the development of experimental colitis results in the decrease of total number of AhR⁺ and ATG16L1⁺-lymphocytes in the colon and was accompanied by changes in their density on lymphocytes.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Inna Topol and Anna Degen for excellent technical assistance.

А.С. Жеребятъев, А.М. Камышный

ЭКСПРЕССИЯ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И БЕЛКА ATG16L1 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ КОЛИТЕ У КРЫС

Исследована экспрессия арил-гидрокарбонных рецепторов (AhR) и белка ATG16L1 лимфоцитами толстого кишечника при экспериментальном колите у крыс и противовоспалительный эффект рекомбинантного антагониста рецепторов IL-1 (АРИЛ-1) и симвастина. Иммунопозитивные лимфоциты были определены методом непрямо́й иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител крысы. Установлено, что развитие

колита супроводжалося збільшенням загального кількості ATG16L1⁺-лімфоцитів (на 30%, $P < 0,05$) в лімфоїдних структурах товстої кишки. Однак кількість AhR⁺-лімфоцитів не змінювалося. В той же час збільшилася концентрація білка ATG16L1 (на 4-11%, $P < 0,05$) в імунопозитивних клітинах. Ведення симвастатину і АРІЛ-1 в час розвитку експериментальної патології супроводжується зниженням кількості AhR⁺ (на 24-38%, $P < 0,05$) і ATG16L1⁺-лімфоцитів (на 43% - в 2 рази, $P < 0,05$) в товстій кишці.

Ключові слова: коліт; рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1); симвастатин; арил-гідрокарбонний рецептор; білок, зв'язаний з аутофагією 16L1.

Запорізький державний медичний університет

О.С. Жеребятьєв, О.М. Камишний

ЕКСПРЕСІЯ АРИЛ-ГІДРОКАРБОНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ І БІЛКА ATG16L1 ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ОКСАЗОЛОН-ІНДУКОВАНОМУ КОЛІТІ У ЩУРІВ

Досліджена експресія арил-гідрокарбонних рецепторів (AhR) і білка ATG16L1 лімфоцитами товстої кишки при експериментальному коліті у щурів і протизапальний ефект рекомбінантного антагоніста рецепторів ІЛ-1 (АРІЛ-1) і симвастатину. Імунопозитивні лімфоцити були визначені методом непрямой імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл щура. Встановлено, що розвиток коліту супроводжувався збільшенням загальної кількості ATG16L1⁺-лімфоцитів (на 30%, $P < 0,05$) у лімфоїдних структурах товстої кишки. Однак кількість AhR⁺-лімфоцитів не змінилась. Водночас збільшилась концентрація білка ATG16L1 (на 4-11%, $P < 0,05$) в імунопозитивних клітинах. Введення симвастатину й АРІЛ-1 під час розвитку експериментальної патології супроводжувалося зменшенням кількості AhR⁺ (на 24-38%, $P < 0,05$) і ATG16L1⁺-лімфоцитів (на 43% - в 2 рази, $P < 0,05$) в товстій кишці.

Ключові слова: коліт; рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1); симвастатин; арил-гідрокарбонний рецептор; білок, пов'язаний з аутофагією 16L1.

Запорізький державний медичний університет

REFERENCES

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573-621.
2. Monteleone I, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012 Jul;28(4):310-3.
3. Ray SS, Swanson HI. Dioxin-induced immortalization of

- normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16INK4a. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27187-93.
4. Marlowe JL, Fan Y, Chang X, Peng L, Knudsen ES, Xia Y, et al. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2008 Aug;19(8):3263-71.
5. Shimada T, Hiramatsu N, Hayakawa K, Takahashi S, Kasai A, Tagawa Y, et al. Dual suppression of adipogenesis by cigarette smoke through activation of the aryl hydrocarbon receptor and induction of endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr;296(4):E721-30.
6. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007 Sep;14(9):1576-82.
7. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):207-11.
8. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(Pt 9):1679-88.
9. Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumour necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol.* 2001 Nov 9;431(1):103-10.
10. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med.* 1998 Nov 16;188(10):1929-39.
11. Furumatsu K, Nishiumi S, Kawano Y, Ooi M, Yoshie T, Shiomi Y, et al. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Dig Dis Sci.* 2011 Sep;56(9):2532-44.
12. Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R, et al. A Crohn's disease variant in Atg16L1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature.* 2014 Feb 27;506(7489):456-62.
13. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 2008 Nov 13;456(7219):264-8.
14. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1135-45.
15. Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RW. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity--a potential mechanism for statins-mediated pleiotropic effects? *J Leukoc Biol.* 2009 Jan;85(1):186-93.
16. Jahovic N, Gedik N, Ercan F, Sirvanci S, Yüksel M, Sener G, et al. Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Aug;41(8):954-62.

17. Lee JY, Kim JS, Kim JM, Kim N, Jung HC, Song IS. Simvastatin inhibits NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates acute murine colitis. *Int Immunopharmacol.* 2007 Feb;7(2):241-8.
18. Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, et al. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology.* 1993 Mar;104(3):749-58.
19. Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, Di Giovine FS, Vecchi M, Kam L, et al. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1999 Oct;117(4):806-13.

Received 08.11.2014

Динамика глутаминсинтетазной активности в головном мозгу крыс в модели пренатальной гипоксии

В.Р. Хаирова, М.И. Сафаров

*Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана, Баку;
e-mail: venerakhairova@yahoo.com; safarovmatlab@yahoo.com*

Метою нашої роботи було виявлення змін в активності одного з ключових ферментів обміну глутамату – глутамінсинтетази – в головному мозку потомства білих щурів, які перенесли гіпоксію на різних стадіях пренатального онтогенезу. Модель гіпоксії створювали поміщенням самиць щурів у терміни вагітності, відповідні зародкового періоду, органогенезу і плодового періоду пренатального розвитку, в барокамеру, куди подавалася суміш газів: 5% кисню і 95% азоту з експозицією 20 хв щодня. Потомство, отримане від контрольної та дослідної груп, було використано для біохімічних визначень по досягненні 1- і 3-місячного віку. Встановлено, що гіпоксія, перенесена вагітними самицями в період ембріонального органогенезу, викликає значні зміни в активності ферменту, особливо виражені в корі і мозочку, порівняно з прогестаційною і плідною гіпоксією. У 1-місячних щурів ферментативна активність знижується більшою мірою порівняно з тримісячними. Отже, вплив стресу в період інтенсивних процесів проліферації і міграції клітин формується в мозку і порушує глутаматний метаболізм.

Ключові слова: глутамінсинтетаза; пренатальна гіпоксія; головний мозок; онтогенез.

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития нейробиологии, нейрхимии и медицины к числу наиболее актуальных проблем относится проблема ухудшение здоровья беременных женщин и как результат – высокая степень перинатальных потерь и патологий [1].

Наиболее распространенным и клинически значимым стресс-фактором, которому может быть подвержен организм в процессе эмбрионального развития, считается гипоксия. В головном мозгу как наиболее восприимчивом к недостатку кислорода органе, подверженном гипоксическому воздействию на основных этапах своего формирования, нарушается морфофункциональная организация, приводящая впоследствии к изменению поведенческих реакций и когнитивных функций [2, 3]. Нередко вызванные внутриутроб-

ной гипоксией микроповреждения мозга в раннем постнатальном периоде практически не диагностируются. Но в процессе роста и развития организма обусловленные внутриутробным стрессом церебральные нарушения проявляются в большей степени, и в итоге могут привести к изменениям социальной адаптации [4, 5].

Причины обусловленных гипоксией церебральных патологий кроются не только в изменении морфоструктурной организации мозга, но и биохимических характеристик. Показано, что следствием гипоксического воздействия является ослабление антиоксидантной защиты, интенсификация свободно-радикальных процессов и развитие оксидативного стресса, что в свою очередь нарушает метаболические процессы мозга, приводящие к отклонениям в механизмах синаптической передачи нейронов [6, 7]. При этом

© В.Р.Хаирова, М.И.Сафаров

важную роль играет нейротрансмиттерный дисбаланс, проявляющийся в гиперактивации ионотропных глутаматных рецепторов типа NMDA и AMPA, чрезмерном выбросе глутамата и провоцируемом им избыточном потоке кальция через NMDA-рецепторы, а также стимуляции каспазного каскада, т.е. запускается программа клеточного апоптоза, пусковым механизмом которого является глутаматная эксайтотоксичность [8–10].

Поэтому изучение метаболизма глутамата и активности ферментов, вовлеченных в его синтез и расщепление, представляет большой интерес с позиций нейрофизиологии и медицины. Одним из звеньев в метаболической цепи превращения глутамата в глутамат-глутаминовом цикле является реакция превращения глутамата в глутамин с детоксикацией аммиака, катализируемая ферментом глутаминсинтетазой. Обладая высокой чувствительностью к действию оксидантов, фермент поддерживает нормальное содержание глутамата и ионов аммония, регулируя клеточный кислотно-основной баланс.

Целью нашей работы было выявление изменений глутаминсинтетазной активности в структурах головного мозга потомства белых крыс, перенесшего гипоксию на разных стадиях пренатального онтогенеза.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования в работе были использованы половозрелые белые крысы-самки линии Вистар. Животные на протяжении 3 нед до начала эксперимента содержались в отдельных клетках вивария в обычном режиме с целью исключения и выведения из эксперимента больных и беременных особей. По истечении указанного срока выдержки для спаривания к самкам подсаживали самцов в соотношении 3:1 на 2 сут. Первый день беременности констатировали по выявлению сперматозоидов во влагищном мазке нормально циклирующих самок. Далее все животные были разделены

на 2 группы: контрольную и опытную. Опытную группу в свою очередь распределяли на 3 подгруппы: 1-я, 2-я и 3-я – самки, подвергнутые гипоксии на первой (зародышевый период внутриутробного развития плода); второй (период органогенеза); и на третьей неделе беременности (плодный период) соответственно.

Модель гипоксии создавали помещением самок крыс в указанные сроки беременности в барокамеру, куда подавалась смесь газов: 5% кислорода и 95% азота с экспозицией 20 мин ежедневно в течение 7 сут. Контрольные особи также содержались в барокамере в аналогичные сроки беременности, но при свободном поступлении кислорода в воздухе. Потомство, полученное от контрольной и опытной групп, было использовано для биохимических определений по достижении им 1- и 3-месячного возраста. При моделировании эксперимента мы руководствовались принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директиве Европейского сообщества.

После декапитации крыс в условиях гипотермии головной мозг был извлечен из черепной коробки, разделен на соответствующие структуры и идентифицирован. Из 5 церебральных структур – коры, мозжечка, гипоталамуса, среднего и продолговатого мозга – был приготовлен гомогенат по общепринятой методике. Определяли активность глутаминсинтетазы (КФ:6.3.1.2) [11] в митохондриальной фракции, полученной методом дифференциального центрифугирования.

Полученные результаты исследования были обработаны с применением статистического пакета программ «Statistica for Windows», а также «Microsoft Excel». Применяли t-критерий Фишера-Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов исследования влияния внутриутробной гипоксии вы-

явил тенденцию снижения активности глутаминсинтетазы в головном мозгу 1-месячных крыс. Однако степень снижения различна в зависимости от стадии пренатального онтогенеза, на которой животное было подвержено гипоксическому воздействию. Так, у крыс, перенесших гипоксию в период прогестации (зародышевый период), отмечается снижение энзиматической активности в митохондриальной фракции коры и мозжечка (20 и 17%), менее выраженное снижение в среднем и продолговатом мозгу (10%) и сохранение контрольного уровня в гипоталамусе (табл. 1).

Воздействие гипоксии в период органогенеза пренатального развития привело к более выраженному падению уровня глутаминсинтетазной активности в головном мозгу крыс. Установлено, что в сравнении с контролем, процент снижения активности в митохондриях коры и мозжечка составляет около 40%, гипоталамуса и среднего мозга – 30%, в продолговатом мозгу – 27%. У этих крыс выявлена высокая чувствительность коры и мозжечка к гипоксии относительно других структур. В головном мозгу крыс, подвергнутых гипоксии в плодном периоде внутриутробного развития, также наблюдаются изменения в активности исследуемого энзима, выражающиеся в ее снижении в пределах 10-17% относительно контрольных значений.

В следующей серии экспериментов, проведенной на 3-месячном потомстве, пережившем пренатальную гипоксию, были

получены результаты, несколько отличающиеся от показателей 1-месячных крысят. У крыс, гипоксированных в зародышевый период, сохраняется контрольный уровень энзиматической активности в коре и слабо выраженное повышение в остальных структурах мозга в пределах 10% относительно контроля (табл. 2).

Воздействие гипоксии на стадии органогенеза вызвало снижение показателя во всех структурах мозга: в коре – на 23%, мозжечке – 27%, гипоталамусе – 20%, среднем и продолговатом мозгу на 27 и 19% соответственно относительно контрольной группы. Эффект снижения активности глутаминсинтетазы сохраняется и у крыс, перенесших гипоксию в плодном периоде пренатального онтогенеза, однако, в сравнении с предыдущим периодом, оно находится в пределах 10-15% относительно контрольных значений.

При обсуждении характера изменений активности глутаминсинтетазы в головном мозгу пренатально стрессированных животных необходимо отметить следующее. В нашем исследовании были выбраны три критических периода воздействия гипоксии на беременных самок: прогестации, органогенеза и плодный период. Результаты работы выявили наиболее выраженные изменения активности энзима в головном мозгу пренатально гипоксированных крыс, достигших 1-месячного возраста. Следует отметить, что последствия гипоксии в период органогенеза более зна-

Таблица 1. Динамика глутаминсинтетазной активности (мкмоль $\text{NH}_3 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) в митохондриях различных структур головного мозга 1-месячных крыс, подвергнутых гипоксии на различных стадиях пренатального онтогенеза ($M \pm m$, $n=10$)

Структуры головного мозга	Контроль	Гипоксия в пренатальном онтогенезе		
		Зародышевый период	Период органогенеза	Плодный период
Кора	8,4±0,1	6,8±0,1**	5,3±0,1*	7,2±0,1**
Мозжечок	6,5±0,1	5,4±0,1**	4,0±0,1*	5,4±0,1**
Гипоталамус	7,1±0,2	7,2±0,2	4,9±0,2*	6,5±0,2
Средний мозг	5,3±0,1	4,7±0,1	3,7±0,1*	4,4±0,1**
Продолговатый мозг	4,4±0,2	3,9±0,2	3,2±0,2*	3,9±0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ по отношению к контролю

Таблица 2. Динамика глутаминсинтетазной активности (мкмоль $\text{NH}_3 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) в митохондриях различных структур головного мозга 3-месячных крыс, подвергнутых гипоксии на различных стадиях пренатального онтогенеза ($M \pm m$, $n=10$)

Структуры головного мозга	Контроль	Гипоксия в пренатальном онтогенезе		
		Зародышевый период	Период органогенеза	Плодный период
Кора	9,7±0,2	10,3±0,3	7,5±0,2*	8,5±0,2
Мозжечок	7,7±0,2	8,5±0,2	5,7±0,2*	6,8±0,2
Гипоталамус	8,2±0,2	9,0±0,2	6,6±0,2**	7,4±0,2
Средний мозг	6,5±0,1	7,0±0,1	4,8±0,1*	5,7±0,1
Продолговатый мозг	5,3±0,2	5,8±0,2	4,3±0,2**	4,8±0,2

чительны по сравнению с прогестационной и плодной гипоксией. Можно предположить, что воздействие гипоксического стресса в период интенсивных процессов пролиферации и миграции клеток формирующегося мозга изменяет морфоструктурную организацию и нарушает биохимические процессы в мозгу, что впоследствии приводит к изменениям поведенческих реакций. Характер повреждения при одних и тех же патогенных воздействиях в значительной степени обусловлен стадией пренатального развития, что особенно отчетливо проявляется в период органогенеза.

Как было отмечено выше, ведущим фактором в патогенезе нейродегенеративных процессов в мозгу в результате гипоксических повреждений является эксайтотоксичность глутамата. Глутаминсинтетаза, выполняя роль своеобразного нейропротектора, нейтрализует нейротоксичность высоких концентраций глутамата в нормальных условиях путем превращения его в глутамин и связывания аммиака. Но в условиях гипоксии, когда происходят структурно-функциональные изменения в клетках и повреждение нейронов, а также изменение пластичности нейронных сетей, глиальные клетки, сохраняя свою способность к захвату глутамата за счет энергии гликолиза, не могут полностью нейтрализовать его избыток из-за сниженного содержания глутаминсинтетазы. Поэтому усиление экспрессии последней в астроцитах способствует защите нейронов от токсического действия избытка глутамата, что

можно использовать в дальнейших поисках новых подходов в лечении нейродегенеративных процессов.

С другой стороны, активация таких энзимов глутаматного метаболизма, как глутаматдегидрогеназа, аспартат- и аланинаминотрансфераза обеспечивает перевод глутамата в α -кетоглутарат – субстрат для ЦТК, что носит компенсаторно-адаптивный характер, препятствующий дальнейшей гибели нейронов [12].

Согласно исследованиям Mikheeva и соавт. [13], у крыс в модели гипоксии в период органогенеза наблюдается повышение содержания серотонина в структурах мозга. И именно на фоне высокого этого показателя в мозгу 21-суточных крыс отмечались наиболее выраженные отклонения в поведенческих реакциях относительно контрольной группы. Кроме того, высокое содержание катехоламинов в результате стресса, являясь токсичным, усугубляет развитие окислительного стресса, вызывая повреждение и/или гибель клеток.

Следует отметить прямую корреляцию между нарушением поведенческих реакций и отклонениями в когнитивных функциях с изменениями биохимических характеристик организма, перенесшего пренатальную гипоксию. Следствием является изменение морфофункциональной организации центральной нервной системы, вызываемое нарушением процессов пролиферации и

миграции нейробластов тех отделов мозга, которые закладываются во время действия патологического фактора.

Результаты нашей работы свидетельствуют, что каждый период пренатального онтогенеза характеризуется общими и специфическими чертами ответных реакций на гипоксическое воздействие. Влияние гипоксии в зародышевый период внутриутробного развития может быть незначительным в связи с отсутствием адекватных ферментных систем, что может привести к небольшим биохимическим отклонениям в головном мозге (небольшой процент падения активности глутаминсинтетазы) или к ранней гибели и резорбции зародыша. На более поздних сроках пренатального развития плод менее восприимчив к повреждающим факторам, поэтому наблюдаемые нами изменения активности глутаминсинтетазы в процентном соотношении также ниже по сравнению с гипоксированными в период органогенеза животными.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что ответная реакция структур головного мозга на гипоксическое воздействие проявляется в различной степени выраженности изменении активности исследуемого фермента, что обусловлено морфофункциональными особенностями структур, плотностью глутаматергических нейронов, пластичностью мозга, а также связано с критическими периодами пренатального онтогенеза, на каждом из которых все элементы нервной системы проходят свои этапы повышенной чувствительности и восприимчивости к повреждающим факторам.

V.R. Khairova, M.I. Safarov

DYNAMICS OF GLUTAMINE SYNTHASE ACTIVITY IN RAT BRAIN IN PRENATAL HYPOXIA MODEL

Prenatal ontogenesis is a period of high sensitivity to stressful impact, so any stressor can lead to changes of physiological, biochemical indicators, behavioral and cognitive functions. The most common and clinically significant stress factor, which the embryo may be exposed during embryonic

development, is hypoxia. In this case pathological changes in the central nervous system depend on the duration and severity of hypoxic exposure, individual tolerance and the stage of prenatal development, at each of which in the brain take place the basic histogenetic processes. By activating energetically disadvantageous anaerobic glycolysis hypoxia leads to excess of glutamate emission and cell apoptosis. Glutamine synthase is a basic enzyme that regulates metabolism of glutamate, catalyzing conversion of glutamate to glutamine with ammonia detoxification. The aim of the presented work was to reveal changes in the activity of one of the key enzyme of glutamate metabolism— glutamine synthetase - in the brain of offspring of white rats undergone to hypoxia at different stages of prenatal ontogenesis. Hypoxia was created by placing female rats at stages of the pregnancy, corresponding to progestation period of organogenesis and fetal period of prenatal development, in the hypobaric chamber with exposure to 5% oxygen and 95% nitrogen gas mixture during 30 minutes per day. The offspring obtained from females of control and experimental groups were used for biochemical determinations in the age of 1 and 3 month. It has been established that hypoxia exposed to pregnant females during embryonic organogenesis causes significant changes in enzyme activity, particularly pronounced in the cerebral cortex and cerebellum, as compared with progestational and fetal hypoxia. Enzyme activity decreased in a greater degree in one-month-old rats undergone to prenatal hypoxia, than three- month-old animals.

Thus, stress during intensive processes of proliferation and migration of cells of the forming brain violates glutamate metabolism of the brain.

Key words: glutamine synthetase; prenatal hypoxia; brain; ontogenesis.

Institute of Physiology, Azerbaijan National Academy of Science, Baku

REFERENCES

1. Ignat'eva R.K. Perinatal'nye problemy v Rossii [Perinatal problems in Russia]. Moscow, 2006. 40 p [Russian].
2. Graf A. V., Maklakova A.S., Maslova M.V. Vliyanie prenatal'noi gipoksii, provedennoi na stadii organogeneza, na povedenie belykh krysv v postnatal'nom ontogeneze. The impact of prenatal hypoxia conducted at the stage of organogenesis, on behavior of white rats in postnatal ontogenesis. *Izv. Ros. Akad. Nauk = Math. Ros. Acad. Sci* 2006; 4: 476-481. [Russian].
3. Delcour M., Russier M., Amin M. et al. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behav. Brain Res.* 2012; 232(1): 233- 244.
4. Basovich S.N. Gipoksiya v geneze i terapii mental'nykh otklonenii: obzor [Hypoxia in the genesis and treatment of mental abnormalities: a review]. *Vestn. Mezhd. Akad. Nauk, Rus. sektsiya = Bull. of the Inter. Acad. Sci., Russ. section* 2011; №1 [Russian].
5. Zhuravin I.A, N. L. Tumanova N.L., Vasil'ev D.S. *Izm-*

- enenie adaptivnykh mekhanizmov mozga v ontogeneze krysa, perenesshikh prenatal'nyu gipoksiyu [Changing the adaptive mechanisms of the brain during ontogenesis in rats undergoing prenatal hypoxia]. Dokl. Akad. Nauk = Dokl. Acad. Sci 2009; 425 (1):123-125 [Russian].
6. Slobodin V.B., Tomilova I.K., Kadykova E.L., Bogatov D.N.. Svobodno-radikal'nye protsessy i osobennosti metabolizma glutamata v golovnom mozge novorozhdennykh krysa, razvivavshikhsya pri nedostatocnosti matochno-platsentarnogo krovoobrashcheniya [Free-radical processes and features of glutamate metabolism in the brains of newborn rats that developed at insufficiency of uteroplacental circulation]. Pat. fiziol. i eksp. terapiya = Pathol. physiol. and exp. terapiya 2007; (2): 17-19 [Russian].
 7. Fadeeva N.I., Khovalyng N.M., Remneva O.V. Oksidantno-antioksidantnyi status nedonoshennykh novorozhdennykh s perinatal'nyim porazheniem tsentral'noi nervnoi sistemy [Oxidant-antioxidant status in preterm infants with perinatal lesions of the central nervous system]. Ross. Vestnik perinat. i pediatrii = Russ. Bull. perinat. and pediatrics 2010; 55(3):26-30 [Russian].
 8. Boldyrev A.A. Vzaimodeistviya mezhdru glutamatnymi retseptorami [Interactions between glutamate receptors]. Byul. eksperim. boil. i meditsiny = Bull. exper. biol. and medicine 2000; 130(9): 244 – 251 [Russian].
 9. Bol'shakov A.P. Glutamatnaya neirotoksichnost': narusheniya ionnogo gomeostaza, disfunktsiya mitokhondrii, izmeneniye aktivnosti kletocnykh sistem [Glutamate neurotoxicity: violation of ion homeostasis, mitochondrial dysfunction, changes in the activity of cellular systems]. Neirokhiimiya = Neurochemistry 2008; 25(3): 157-169 [Russian].
 10. Samoilov M.O., Mokrushin A.A., Semenov D.G. Vovlecheniye glutamatnykh retseptorov (NMDA-tipa) v reaktsii neuronov mozga na anoksiyu razlichnoi dlitel'nosti [Involving glutamate receptors (NMDA-type) in response to the neurons in the brain anoxia of various duration]. Vestn. RAMN = Vestn. RAMS 2000; (9): 34-39 [Russian].
 11. Silakov A.I., Trubin G.P., Yavilyakova A. Mikrometod opredeleniya ammiaka i glutamina v tkanyakh GMKh ekstraktakh [Micromethods determination of ammonia and glutamine in the tissue extracts GMH]. Vopr. med. khimii = Probl. Med. chemistry 1962; 8(5): 538-544 [Russian].
 12. Gadirova L.B., Abbasova M.T., Khairova V.R. Vliyanie gipoksii, perenesennoi v post- i prenatal'nyy periody ontogeneza, na aktivnost' nekotorykh fermentov obmena glutamata v mozge krysa [The impact of hypoxia in the pre- and postnatal periods of development on the activity of certain enzymes of glutamate metabolism in the rat brain]. «Izvestiya» NAN Azerbaidzhana. Baku. Elm = Proceedings of National Academy of Sciences of Azerbaijan. Baku. Elm 2010; (1-2):100-104 Russian [].
 13. Mikheeva I.G., Ryukert E.N., Brusov O.S. Soderzhanie serotoninina v syvorotke krovi novorozhdennykh detei s gipoksicheski-ishemicheskim porazheniem TsNS [The content of serotonin in the blood serum of neonates with hypoxic-ischemic CNS]. Pediatriya = Pediatrics 2008; (1): 40-44 [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 29.01.2015*

Функціонування протеїназ у слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків

Т.В. Ішук, О.М. Савчук., Я.Б. Раєцька, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка;
e-mail: tanuka - 05@ukr.net

Досліджували активність протеолітичних ферментів, участь металопротеїназ (ММП) та їх тканинних інгібіторів (ТІМП) за розвитку лужного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня. Виявлено підвищення вмісту ТІМП у гомогенатах стравоходу після опікової травми (у середньому на 31-56% залежно від ступеня опіку). Показано зниження активності серинових протеїназ за умов опіку 1-го ступеня на 15-ту, 21-шу добу на 35 та 18% відповідно, а 2-го ступеня — на 54 та 50%. Встановлено зниження ММП при опіку 1-го ступеня на 15-ту та 21-шу добу на 30, 19% відповідно, за умов хімічного опіку 2-го ступеня на 15-ту та 21-шу добу на – 30 і 37%. Отримані результати вказують на розвиток рубцевих змін за умов лужного опіку стравоходу. Подальше дослідження участі ММП та ТІМП у процесі загоєння ран, є перспективним при створенні ефективних підходів для профілактики утворення післяопікових рубців стравоходу.

Ключові слова: лужний опік стравоходу; металопротеїнази; тканинні інгібітори металопротеїназ.

ВСТУП

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я відзначається стабільне зростання числа хімічних опіків стравоходу, що корелює зі збільшенням кількості порівняно доступних технічних і побутових агресивних рідин [1]. Згідно зі статистикою основною групою ризику є діти від 1 до 3 років [2].

До ранніх наслідків хімічних опіків стравоходу належать набряк гортані, екзотермічний шок, кровотеча, некрози [3]. Проте основним результатом опікових уражень є формування рубців. Розвиток ранніх рубцевих змін починається вже з 3-го тижня після опікової травми [4]. Лише в 30% випадків загоєння ураження після хімічного опіку відбувається без рубцевих утворень, відповідно, у 70% пацієнтів формуються стійкі рубці [5]. Причиною розвитку рубцевих змін слизової шлунково-кишкового тракту є тривале та надмірне накопичення матриксних компонентів. Так, формування фіброзу (рубців) супроводжується накопиченням колагену та

морфологічними змінами тканини, що призводить до порушення балансу між процесами синтезу та деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Наразі відомо, що утворення рубців спричинено надмірним синтезом колагену та зміною співвідношення металопротеїназ (ММП) та їх тканинних інгібіторів (ТІМП) [6].

У динаміці загоєння післяопікових уражень клітинами секретуються, активуються та функціонують різні ММП. Зазначені ензими локалізуються в певних зонах ран, а їх активація припадає на різні періоди процесу загоєння [7]. Незважаючи на важливу роль, яку ММП відіграють у ремоделюванні позаклітинного матриксу, досліджень, присвячених вивченню протеолітичної активності протягом перших трьох тижнів (або ранніх рубцевих змін) післяопікових ран стравоходу недостатньо. Наукові праці з цієї проблематики, в основному, зосереджені на дослідженні або певних ММП, або їх інгібіторів тобто, не завжди комплексні [8].

© Т.В. Ішук, О.М. Савчук., Я.Б. Раєцька, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

Метою нашої роботи було визначення загальної активності протеолітичних ферментів та ролі ММП у загоєнні післяопікових ран за умов розвитку лужного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня.

МЕТОДИКА

У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90—110г (відповідають 3-4-річному віку дітей) із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Їм експериментально моделювали опік стравоходу розчином NaOH (10 і 20%) [9]. Гомогенати стравоходу для дослідження відбирали на 1,7,15 та 21-шу добу, які відповідають стадіям опікової хвороби. Методом виведення тварин із досліду була цервікальна дислокація.

Електрофорез ензимом проводили у 12%-му поліакриламідному гелі, який був заполімеризований з 1 мг/мл желатину. Після електрофорезу додецилсульфат натрію видаляли з гелю промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель залишали в 0,05 моль/л тріс-НСІ-буфері (рН 7,4) упродовж 12 год. Гель забарвлювали за допомогою Coomassі R-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за положенням незабарвлених плям [10].

Загальну активність протеїназ у зразках аналізували за визначенням казеїнолітичної активності з наступними модифікаціями. Для селективного дослідження активності ММП і серинових протеїназ до реакційної суміші (кінцева концентрація) додавали 0,2 моль/л етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА) або 0,2 моль/л фенілметилсульфоніл флуориду (ФМСФ) відповідно [11].

Вміст ТІМП-1 та ММП-1, ММП-2 визначали методом імуноферментного аналізу

[12]. Як антиген при цьому використовували солюбілізований білковий матеріал гомогенату стравоходу щурів, розведений до концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 моль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,4). Досліджувані зразки об'ємом 100 мкл інкубували в 96-луночковому планшеті протягом ночі при 4°C. Під час дослідження були використані первинні поліклональні антитіла («Santa Cruz», США), вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Bio-Rad», США) та субстрат о-фенілєндіамін перекису водню («Sigma», США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням програми OriginLab 8.0. та TotalLab 2.01. Зміни показників вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загоєння післяопікових ран є динамічним процесом і потребує балансу між механізмами синтезу та деградації компонентів ЕЦМ. Його можна розділити на три основні етапи: запалення, формування нової тканини (реепіталізація) та ремоделювання міжклітинного матриксу. Протеолітична деградація ЕЦМ є одним з ключових етапів загоєння опікових уражень (таких, як деградація матриксу, ангиогенез, міграція кератиноцитів і ремоделювання позаклітинного матриксу) та забезпечується протеолітичними ферментами [13].

Нами було визначено загальну протеолітичну активність гомогенату стравоходу за умов моделювання лужного опіку стравоходу (рис. 1). Так, на 1-шу добу експерименту показано підвищення активності протеолітичних ферментів за умов розвитку 1-го та 2-го ступеня опіку на 11 та 13% відповідно. Підвищення активності протеолітичних ферментів на 1-шу добу зумовлено пошкодженням клітин лугом і сприяє лізису некротизованих тканин для очищення опікової рани. Отримані результати узгоджуються з даними вітчизняних і закордонних дослід-

ників [14,15]. За умов моделювання лужного опіку 1-го ступеня на 7-му, 15-ту та 21-шу добу активність протеолітичних ферментів знижувалася на 23, 14 та 30% відповідно, 2-го ступеня — на 50 та 42% на 15-ту та 21-шу добу відповідно.

До основних протеїназ, які беруть участь у процесі ремоделювання післяопікових ран, належать серинові та ММП. Нами було визначено активність протеолітичних ферментів за наявності зазначених інгібіторів (рис.2). При розвитку хімічного опіку 1-го та 2-го ступеня на 1-шу добу активність ММП підвищувалась на 15 і 17%, на 15-ту та 21-шу добу відбувалось зниження на 30, 19% і на 30, 37% відповідно. Активність серинових протеїназ після моделювання опіку стравоходу 1-го ступеня підвищувалася на 1-шу добу на 30%, на 15-ту, 21-шу знижувалася на 35 та 18% відповідно. У разі опіку 2-го ступеня активність підвищувалася на 1-шу добу на 38%, на 15-ту, 21-шу — знижувалася на 54 та 50%.

Таким чином, лужний опік стравоходу 1-го та 2-го ступеня супроводжувався зниженням загальної протеолітичної активності, в тому числі активності ММП і серинових протеїназ. Опік 2-го ступеня характеризувався більш суттєвими змінами досліджуваних ферментів. Слід зазначити, що репараційні процеси за умов опіку стравоходу починаються з 10-15-

ї доби, тому зниження активності основних протеолітичних ферментів, які беруть участь у ремоделюванні ЕЦМ, можуть призводити до надмірного рубцювання опікової рани після опіку стравоходу 2-го ступеня.

Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [16, 17]. Разом з цим недостатньо експериментальних та клінічних даних стосовно ролі ММП у загоєнні післяопікових ран саме стравоходу.

Нами було визначено вміст ММП-1 та ММП-2 у гомогенаті слизової оболонки стравоходу щурів після моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня (рис.3). Вміст ММП-1 зростає протягом усього експерименту, максимальне підвищення спостерігалось на 1-шу добу при опіку 1-го та 2-го ступеня на 287 та 217% відповідно порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-2 у гомогенатах стравоходу вірогідно підвищувався. Так, за умов лужного опіку 1-го ступеня він підвищувався на 1-шу та 21-шу добу на 108 та 105% відповідно, при опіку 2-го ступеня — на 163 та 153%. Слід зазначити, що за умов моделювання лужного опіку стравоходу 2-го ступеня, вміст ММП-2 був вищим протягом всього дослідження, порівняно з опіком 1-го ступеня.

Після травми ММП-1 синтезується базальними кератиноцитами дистальних діля-

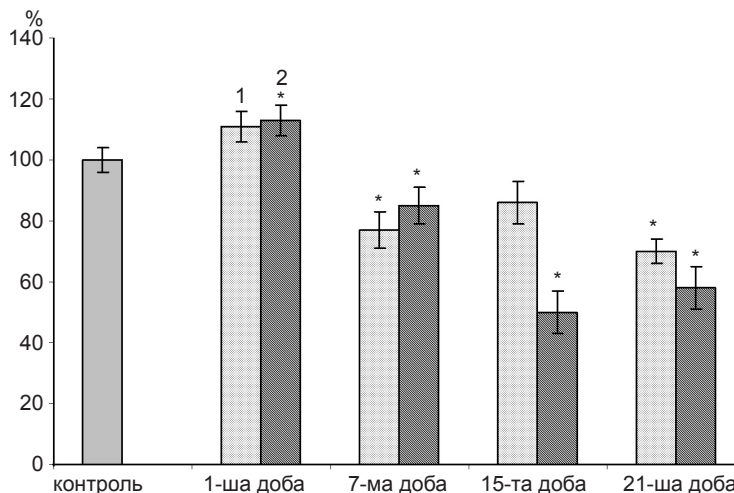


Рис. 1. Загальна протеолітична активність гомогенату стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го (1) та 2-го (2) ступеня. * $P < 0,05$ відносно контролю

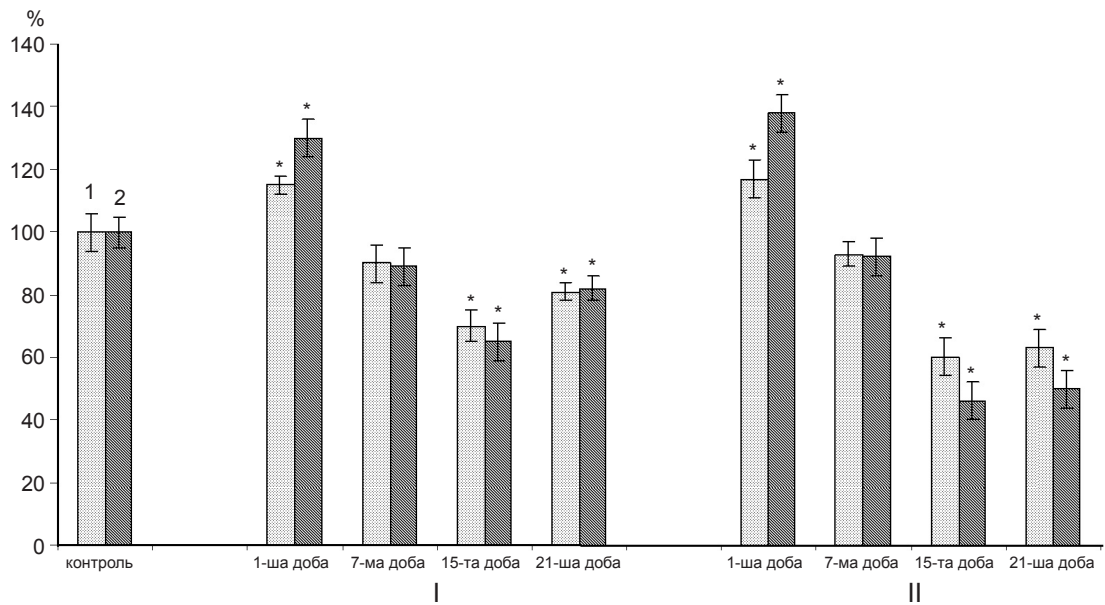


Рис. 2. Активність серинових протеїназ (I) та металопротеїназ (II) гомогенату стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня. *P<0,05 відносно контролю

нок епідермісу декількох типів опікових уражень (ранової інфекційні рани, хронічні виразки, післяопікові рани) [13]. Окрім того, автори опублікували дані, що показали участь ММП-2 та ММП-3 у загоєнні післяопікових ранах [18,19]. Варто вказати, що вміст ММП-2 зростає протягом 1-2-ї доби після пошкодження шкіри та зберігається на до-

сить високому рівні навіть за умов повного загоєння рани [18].

Аналіз ензимограми гомогенату стравоходу контрольних зразків і таких після моделювання опіку 2-го ступеня виявив білкові фракції з молекулярними масами 75, 72, 57, 53 та 28 кДа. Білкова фракція з молекулярною масою 72 кДа, ймовірно, від-

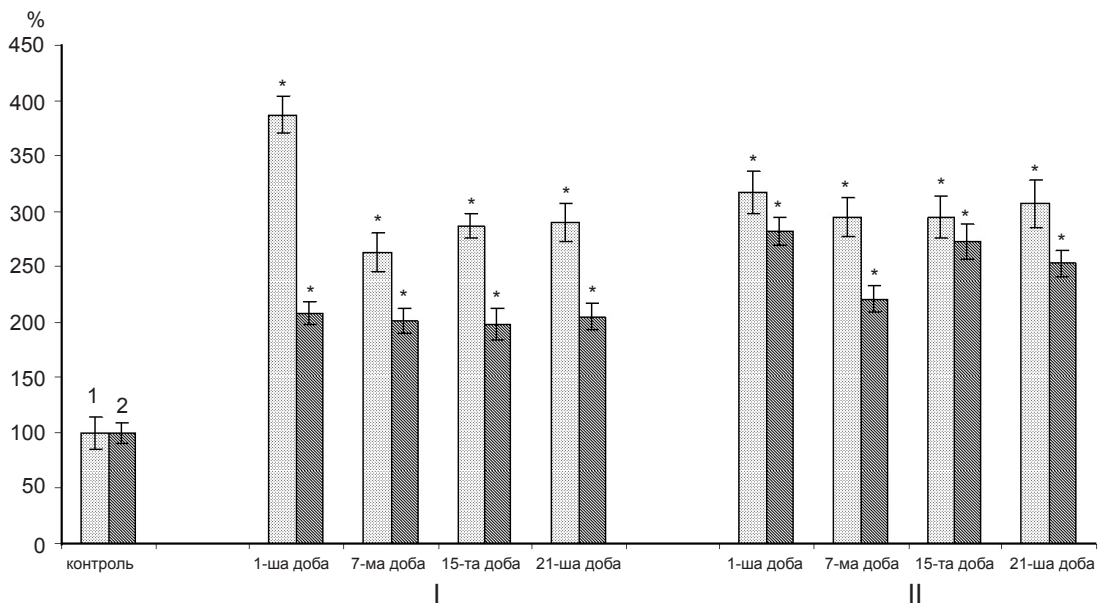


Рис. 3. Вміст металопротеїнази-1 (I) та металопротеїнази-2 (II) у гомогенаті стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня. *P<0,05 відносно контролю

повідас ММП-2. Фракція з молекулярною масою 57 кДа може відповідати ММП-3 (стромелізін-1), яка каталізує деградацію багатьох компонентів сполучної тканини, включаючи протеоглікани, колаген типів II, IV, IX і XI, ламінін і фібронектин. ММП-3 секретується, як профермент і активується в природних умовах через обмежений протеоліз тканинними і плазматичними ендопептидазами [18].

Білкова фракція з молекулярною масою 75 кДа, можливо відповідає ММП-8 (також відома, як нейтрофільна колагеназа). Цей фермент міститься в специфічних гранулах поліморфноядерних лейкоцитів (PMNs) у вигляді неактивного проферменту. ММП-8 – ключовий фермент початкових етапів процесів руйнування ЕЦМ, особливо при патологічних запальних процесах. Benedict та співавт. встановили, що його вміст в уражених ділянках шкіри підвищується на 4-ту добу ранового процесу більше ніж у 2 рази порівняно з ММП-1 [20], що пов'язано з особливостями профілів синтезу ММП-8. У перші години після пошкодження шкіри нейтрофіли починають інфільтрувати тканини рани, що триває впродовж усієї стадії запалення. Як відомо, ці клітини продукують численні цитокіни та білкові фактори, у тому

числі і деякі протеїнази, зокрема ММП-8 [17].

Виявлена білкова фракція з молекулярною масою 53 кДа може відповідати ММП-10, або стромелінази-2, яка здатна розщеплювати кілька білків, що беруть участь у ремодельованні та загоєнні ран: колаген типів III і IV, желатин, нідоген, ламінін-1, еластин і протеоглікани. Активний фермент здатен активувати про-ММП-1, -7, -8 і -9. Фракція з молекулярною масою 28 кДа ймовірно відповідає ММП-7, однієї з найменших протеїназ, що складається з продому та каталітичного домену. ММП-7 синтезується в нормальних і стресованих епітеліальних клітинах [7].

Наразі відомо, що порушення процесу загоєння післяопікових ран (рубцювання) є причиною надмірного синтезу колагену, який спричинений дисбалансом у співвідношенні ММП та ТІМП [21]. Dietmar та співавт. показали збільшення експресії ТІМП-1 та ТІМП-2 в гіпертрофічній рубцевій тканині після опіків [17]. Очевидно, ТІМП також має велике значення для патогенезу ранового процесу.

Нами було визначено вміст інгібіторів ММП, ТІМП-1, в гомогенатах стравоходу після моделювання 1-го та 2-го ступеня

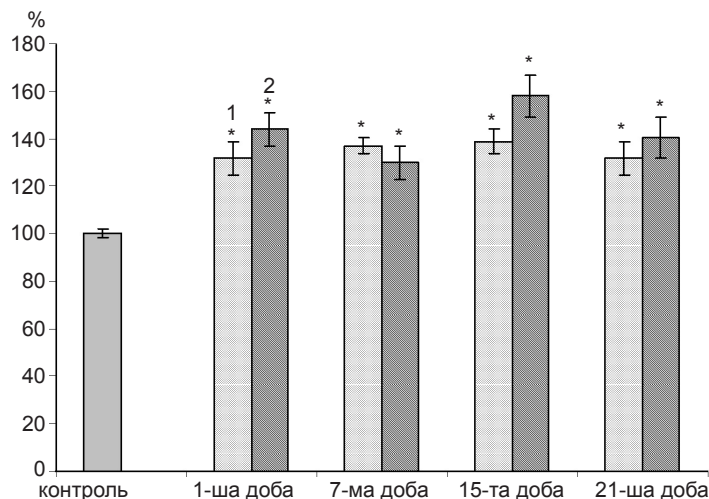


Рис. 4. Вміст тканинних інгібіторів металопротеїназ-1 у гомогенаті стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го (1) та 2-го (2) ступеня. * $P < 0,05$ відносно контролю

лужного опіку (рис.4). Так, протягом усього експерименту цей показник вірогідно зростає порівняно з контролем. Найвище значення спостерігали на 15-ту та 21-шу добу після моделювання опіку стравоходу 2-го ступеня. Значне підвищення вмісту ТІМП-1 за умов опіку 2-го ступеня та зниження активності протеолітичних ферментів на 21-шу добу експерименту може свідчити про розвиток рубцевих змін.

Отже, лужний опік супроводжувався зниженням активності протеолітичних ферментів гомогенату стравоходу. Показано участь ММП у загоєнні післяопікових ран. Отримані результати, щодо підвищення вмісту ТІМП та зниження активності ММП гомогенату стравоходу свідчать про розвиток рубцевих змін за умов моделювання лужного опіку 2-го ступеня.

**T.V. Ishchuk, O. M Savchuk, Ya.B. Raetska,
V.V. Vereschaka, L.I. Ostapchenko**

FUNCTIONING PROTEASES IN THE ESOPHAGUS MUCOSA AFTER CHEMICAL BURNS

The main result of esophagus burn is the formation of scars, that caused by excessive synthesis of collagen and changes the balance of metalloproteinases and their tissue inhibitors. It was studied the activity of proteolytic enzymes, participation of MMP (metalloproteinase) and their tissue inhibitors (TIMP) in alkali burns of the esophagus 1st and 2nd degrees. We have shown a significant increase of TIMP level in homogenate after alkali burns of the esophagus (an average of 31-56% depend on of burn degree). We observed a reduced activity of serine proteinase after 1st degree burns on 15th, 21st day 35 and 18% respectively, after burns 2nd degree on 15th, 21st day 54 and 50%. The decrease of activity MMP after 1st degree burns on 15th and 21st day 30, 19%, respectively, in conditions of chemical burns 2nd degree on 15th and 21st day 30, 37%. These data may indicate the development of scarring after burn simulation of 2nd degree. Further investigation of the MMP and TIMP in the process of wound healing can be useful in creating effective approaches to prevent formation of post scarring of the esophagus.

Keywords: caustic burns of the esophagus; matrix metalloproteinases; tissue inhibitor of metalloproteinases.

*Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv.*

**Т.В. Ищук, А.Н. Савчук, Я.Б. Раецкая,
В.В. Верещака, Л.И. Остапченко**

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОТЕИНАЗ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПИЩЕВОДА ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОГО ОЖОГА

Исследовали активность протеолитических ферментов, участие металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТІМП) в условиях развития щелочного ожога пищевода 1 и 2-й степени. Выявлено повышение содержания ТІМП в гомогенатах пищевода после ожоговой травмы (в среднем на 31-56% в зависимости от степени ожога). Показано снижение активности сериновых протеиназ при ожоге 1-й степени на 15-е, 21-е сутки на 35 и 18% соответственно, а при 2-й степени - на 54 и 50%. Установлено снижение активности ММП при ожоге 1-й степени на 15-е и 21-е сутки на 30, 19% соответственно, в условиях развития ожога 2-й степени на 15-е и 21-е сутки на 30 и 37%. Полученные результаты указывают на развитие рубцовых изменений после моделирования ожога пищевода. Дальнейшее исследование участия ММП и ТІМП в процессе заживления ран, является перспективным в создании эффективных подходов для профилактики образования послеожоговых рубцов пищевода.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода; металлопротеиназы; тканевые ингибиторы металлопротеиназ.

УНЦ «Институт биологии», Киевского национального университета им. Тараса Шевченко.

REFERENCES

1. Yong H, Qing-Shu C, Xiao-Fei L, Xiao-Ping W. Surgical management of esophageal strictures after caustic burns: A 30 years of experience. World J Gastroenterol. 2013; 10 (9): 2846-49.
2. Kalkan Y, Tumkaya L, Akdogan R, Yucel A, Tomak Y, Sehitoğlu I, Pergel A. A novel model approach for esophageal burns in rats: A comparison of three methods. Toxicol Ind Health. 2013;1-7.
3. Fallahi S, Hosseini S, Fallahi S, Salimi M, Akbar Hesam A, Hamideh Hoseini S. Extent of Injury of Gastrointestinal tract due to accidental ingestion of chemicals among children at Bandar Abbass Children Hospital 2009–2011. Life Sci J. 2012; 9(4): 2054-58.
4. Savvy S. A modified classification of chemical esophageal burn and its consequences. Clin Surgery. 2009; 3: 5-8 [Russian].
5. Boyko V, Kozin Y, Shevchenko A, Rajiv Kumar S, Novikov E, Klimenko V. Immunological disorders combined with post-burn strictures of the esophagus and stomach. Med Today and Tomorrow. 2009; 3–4: 92-5 [Russian].
6. Imaizumi R, Akasaka Y, Inomata N, Okada E, Ito K, Ishikawa Y, Maruyama Y. Promoted activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in keloid fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen bundle regions:

- implications for mechanisms of keloid progression. *Histopathology*. 2009; 54(6): 722-30.
7. Gill S, Parks W. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(6-7): 1334-47.
 8. Bálint N, Lívía S, Szilárd R, Csaba L, Barbara R, János L, Lajos B, Csaba C. Dynamic changes of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 after burn injury. *J Critical Care* 2015; 30 (1): 162-6.
 9. Raetska Y, Ischuk T, Dzhus O, Savchuk O, Ostapchenko L. Experimental modeling of 1st and 2nd degrees alkali esophageal burn in immature rats. *Biological system*. 2014; 6(1): 39 -44 (Ukrainian).
 10. Savchuk O. The investigation of protein-protein interactions in hemostatic system using enzyme electroforesis method. *Med Chemistry*. 2010; 12(1): 60-7 [Ukrainian].
 11. Hummel BC. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can J Biochem and Physiol*. 1959; 37: 1393-99.
 12. Crowther JR, editor. *The ELISA guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 2001.
 13. McCarty S, Percival S. *Proteases and Delayed Wound Healing*. *Adv Wound Care*. 2013; 2(8): 438-47.
 14. Mirastschijski U, Zhou Z, Rollman O, Tryggvason K, Ågren M. Wound Healing in Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase-Deficient Mice. *J Investigative Dermatology*. 2004; 123: 600-602.
 15. Protasov MV, Smagina LV, Yudintseva NM, Galibin OV, Pinaev GP. Possibility of predicting rat wound epithelization by changes in matrix metalloproteinases activities in wound exudates. *Cell and Tissue Biology*. 2009; 3 (3): 249-253 [Russian].
 16. Dasu M, Spies M. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severely burned children. *Wound Rep Reg*. 2003; 11:177-80.
 17. Dietmar U, Franziska U, Frank U, Andrzej P, Norbert P. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010; 63: 1015-21.
 18. Frossing S, Rono B, Hald A, Romer J, Lund LR. Skin wound healing in MMP2-deficient and MMP2 / plasminogen double-deficient mice. *Exp Dermatol*. 2010; 19 (8): 234-40.
 19. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K., Into T, Matsushita K. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol*. 2009; 175: 1905-14.
 20. Nwomen B, Hui-Xiu L, Diegelmann R, Coner K. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Rep Reg*. 1998; 6: 127-36.
 21. Li Q, Guo S, Liu D, Feng S, Wei Q. Correlation of the expressions of MMPs-9, TIMP-1 and TIMP-2 with cesarean section scar. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012; 32 (9): 1336-40.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.03.2015*

Вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії на вегетативний гомеостаз у дітей із радіоекологічно несприятливих регіонів

Л.М. Лісуха

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail:lisukha_lyubov@inbox.ru

Досліджено вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) саногенного рівня на дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях. Обстежених було поділено на три групи: 37 осіб основна (I група – медикаментозне лікування згідно з протоколами і сеанси ПНГ), 35 – порівняння (II – медикаментозне лікування), 30 – контрольна (III – здорові). Встановлено, що у дітей 6-11 років основної групи після комбінованого лікування з сеансами ПНГ (10-12 % кисню в азоті) вірогідно збільшило значення RMSSD на 36% у фоновому записі, а у дітей 12-17 років – на 27% при виконанні кліноортостатичної проби. Доведено, що симпто-вагальний індекс знизився на 23% у дітей 6-11 років відносно групи порівняння. Індекс напруження регуляторних систем знизився у дітей обох груп, що свідчить про зменшення центрального контуру управління серцевим ритмом. Ключові слова: переривчаста нормобарична гіпоксія; варіабельність серцевого ритму; кардіоінтервалографічні гіпоксичні маркери; кліноортостатична проба; діти з радіоактивно забруднених територій.

ВСТУП

При адаптації до переривчастої нормобаричної гіпоксії важлива роль належить серцево-судинній системі [1, 2]. Вегетативна нервова система (ВНС) при цьому забезпечує належний кровообіг регулюванням частоти серцевих скорочень (ЧСС) і пульсового тиску крові за допомогою нейрогуморальних механізмів. Компенсаторно-приспосувальні реакції серцево-судинної системи мають індивідуальну залежність та забезпечують як системну гіпоксичну централізацію кровообігу, так і внутрішньомозковий регіональний розподіл крові до найбільш життєво важливих центрів [3, 4].

Одним з основних методів вивчення механізмів контролю серцево-судинної системи з боку ВНС є аналіз варіабельності серцевого ритму (ВСР) за допомогою кардіоінтервалографії (КИГ) [5–7]. Оцінка ВСР є сучасною методологією для дослідження

© Л.М. Лісуха

регуляторних систем організму. Чим сильніший вплив подразника на організм, тим вищий рівень регуляції бере участь у компенсаторно-приспосувальних механізмах. При цьому більш високі рівні (вегетативні центри кори головного мозку, лімбіко-гіпоталамо-ретикулярний комплекс) гальмують більш низькі (симпатичний і парасимпатичні відділи ВНС) [8–10]. Математичний аналіз ВСР дає можливість широко використовувати його для діагностики, перебігу, віддалених наслідків різних захворювань та ефективності лікування. Статистичний аналіз цього методу – сукупність послідовних часових інтервалів R-R з автоматичним обчислюванням тривалості. Його показники при підвищенні свідчать про зростання вагусної активності, а зниження – симпатичної. Спектральні методи на основі часових і частотних характеристик мінливості серця дають інформацію про активність симпатичного та парасимпатичного відділів ВНС, чутливість барорецепторів

судин, рівень метаболічного забезпечення організму. Аналіз за Баєвським характеризує ступінь адаптації серво-судинної системи і оцінює адекватність процесів регуляції.

Вегетативне забезпечення діяльності – це підтримання відносного рівня ВНС, яка регулює дію органів і систем в умовах навантаження. Найбільш інформативне і доступне визначення цього показника за кліноортопробою (КОП) – експериментальною реакцією організму при переході із горизонтального в вертикальне положення [11]. При цьому активується симпатичний відділ ВНС. Для забезпечення стійкості гемодинаміки при КОП має значення взаємодія серцевого і судинного факторів [12,13].

Відомо, що в патогенезі неінфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ): гастритів, гастродуоденитів, виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки суттєву роль відіграє ВНС. У хворих з вказаною патологією за даними КІГ, переважає вихідна ваготонія. А при проведенні КОП у більшості реєструється гіперсимпатикотонічна реактивність. Діти з перевагою парасимпатичної ланки мають порушення з боку гастродуоденальної зони. Це пояснюється фізіологічними особливостями будови ВНС [9, 14-15]. Дослідження ВСР у дітей, що мешкають на радіоактивно забруднених територіях у віддалений після аварії період і мають патологію ШКТ, практично не вивчено. Захворюваність таких дітей характеризується коморбідністю. Рання корекція відхилень ВНС, що пов'язана із надсегментарними та сегментарними порушеннями вегетативної регуляції, може запобігати розвитку патології.

У доступних нам літературних джерелах ми не знайшли даних щодо впливу ПНГ саногенного рівня на ВСР у дітей з патологією ШКТ, що потерпіли внаслідок Чорнобильської катастрофи. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчити вплив ПНГ саногенного рівня на ВСР у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях.

МЕТОДИКА

Дітей віком від 6 до 17 років, поділено на три групи: I (основна) – 37 осіб, II (порівняння) – 35, III (здорові) – 30. У дітей I та II груп була патологія ШКТ і вони проживали у 2, 3 та 4-й зоні за радіоактивним забрудненням [16] та знаходилися на стаціонарному лікуванні у ДУ «Національному науковому центрі радіаційної медицини НАМН України». Пацієнти I групи отримували комбіноване лікування (тобто медикаментозне згідно з затвердженими протоколами МОЗ України при захворюваннях ШКТ і сеанси ПНГ), а II групи – медикаментозне (згідно з протоколами). Діти III групи на момент обстеження мали середні значення показників фізичного і статевого розвитку, протягом 2 міс не хворіли на гострі захворювання та проживали в «чистих» щодо радіоактивного забруднення регіонах, і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії. Зважаючи на те, що в кожному групі входили обстежувані віком від 6 до 17 років, ми окремо аналізували показники у пацієнтів молодшого шкільного віку (6 – 11 років) та старшого шкільного віку (12 – 17 років).

Аналіз ВСР проводили за допомогою автоматизованого комплексу «КАРДІО+» (ТОВ «НВП «МЕТЕКОЛ» Ніжин). Прилад має державну реєстрацію за № 1952-2003 від 17.07.2009 та сертифікат відповідності № UA 1.003.0000031-11 від 05.01.2011. Оцінювали статистичний аналіз ВСР: ЧСС, SDNN – стандартне відхилення (SD) величин від нормальних інтервалів R-R (NN) – один з основних показників, що характеризує стан механізмів регуляції, залежить від впливу на синусовий вузол симпатичного і парасимпатичного відділів ВНС; RMSDD – квадратний корінь із середнього квадратів величин послідовних пар інтервалів NN – показує перевагу впливу парасимпатичного відділу; pNN50 – відсоток послідовних інтервалів NN, різниця між якими перевищує 50 мс, визначає перевагу впливу парасимпатичного відділу.

У разі спектрального аналізу вивчали: TP – загальна потужність спектра; HF – коливання високої частоти – відображають вагусний контроль серцевого ритму; LF – коливання низької частоти – мають барорефлекторну природу, відображають зміни як симпатичної так і парасимпатичної активності; HFn і LFn – потужність коливань високої і низької частоти в нормалізованих одиницях відповідно; VLF – дуже низькі коливання; LF/HF – симпато-вагальний індекс – характеризує співвідношення симпатичних і парасимпатичних впливів на ритм серця. Проводили аналіз за Баєвським: Мо – мода – значення R-R, які найбільш часто зустрічаються; Амо – амплітуда моди – число кардіоінтервалів у відсотках, Х – варіаційний розмах; ІВП – індекс вегетативного напруження, ВПР – вегетативний показник ритму; ПАПР – показник адекватності процесів регуляції; ІН – індекс напруження регуляторних систем, ПАРС – показник активності регуляторних систем. ВСР досліджували в КОП. Запис КІГ проводили в першій половині дня. Спочатку дитина перебувала у горизонтальному положенні 7-10 хв (фоновий запис), а потім дитина повільно приймала вертикальне і стоячи її обстежували (7-10 хв). За результатами КОП вивчали вегетативну реактивність (співвідношення ІН1/ІН2) та вегетативне забезпечення діяльності. Вимірювали артеріальний тиск та пульс до та після лікування.

Для дітей І групи застосовували нормобаричну газову гіпоксичну суміш, що складалася з 12 % кисню і 88 % азоту. ПНГ проводили за допомогою індивідуального апарата гірського повітря типу «Борей» виробництва наукового медико-інженерного центру «НОРТ» НАН України, м. Київ. Для кожного пацієнта підбирали індивідуальні режими проведення ПНГ [17].

Обстеження проведено з дотриманням національних норм біоетики та положень Гельсінської декларації (2013) за письмовою згодою батьків хворих дітей після докладного інформування про цілі, тривалість та процедуру дослідження.

При аналізі отриманих результатів використовували методи статистичної обробки з позиції доказової медицини [18, 19], програми «Microsoft Excel» та програмного забезпечення «SPSS Statistics (Version 17)». Нами застосовано методи параметричної і непараметричної статистики. Розраховували середні значення показників (М), їх стандартну похибку (m). Вірогідність розбіжностей для вибірок з нормальним розподілом оцінювали за критерієм t Стьюдента. Для вибірок, що не задовольняють критерій нормальності, нами застосовано непараметричні критерії Вілкоксона і Манна-Уїтні та ранговий кореляційний аналіз Спірмана. Статистично значущими вважалися відмінності результатів при $P < 0,05$, $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показники ВСР після проведеного лікування свідчили про складність адаптаційних реакцій у обстежуваних та мали різноспрямовані значення. Вихідний вегетативний тонус (ВВТ) за показниками КІГ у дітей 6-11 років І групи (комбіноване лікування) характеризувався як ейтонія у 35%, ваготонія у 59%, симпатикотонія у 6% та наближався до групи контролю 40% (ейтонія), 60% (ваготонія). У ІІ групі (медикаментозне лікування) такі характеристики ВВТ були у 20, 53, 7% відповідно, крім того реєструвалася гіперсимпатикотонія у 20%. У дітей 12-17 років ВВТ розподілився так: у І групі – у 55, 30, 10, 5%, у ІІ – у 20, 55, 15, 10%, у ІІІ – у 53, 20, 7, 20% відповідно. Таким чином, у пацієнтів молодшого та старшого шкільного віку зсув ВВТ після сеансів ПНГ був у бік ейтонії і ваготонії, а у дітей, що отримували лише стандартне лікування – ваготонії.

ПАРС характеризує адаптацію організму до навколишнього середовища. На основі індивідуального розподілу після комбінованого лікування у дітей від 6 до 11 років основної групи норму реєстрували у 35% (1-2 бали), помірне напруження 10% (3-4

бали), виражене – у 10% (5-6 балів), різко виражене – у 35% (7-8 балів). У групі порівняння 47, 13, 33, 7% відповідно, а у групі контролю 67, 10, 17, 6%. У дітей 12-17 років – 70, 15, 10, 5%, у групі порівняння – 50, 20, 15, 15% відповідно, а у групі контролю – 90 (норма), 5 (помірне), 5% (різко виражене). При різко вираженому напруженні ПАРС виникає незадовільна адаптація організму до навколишнього середовища та поступове виснаження адаптаційних резервів. У нашому дослідженні для більшості дітей 6-11 років характерною була надлишкова активність регуляторних систем. Це може бути зумовлено як анатомо-фізіологічними особливостями, так і підвищенням активації симпато-адреналової та гіпофізарно-наднирниковозалозної систем. Отже, у обстежуваних дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях, після проведеного лікування з сеансами ПНГ адаптаційні реакції (до навколишнього середовища не сягали контрольних значень, що може бути пов'язано з хронічним перебігом захворювання ШКТ, супутньою патологією, психо-емоційним навантаженням, процесом навчання та дією несприятливих екологічних факторів).

Після комбінованого лікування, значущі зміни та позитивний вплив було встановлено на показники ВСР. Результати дослідження показали, що у дітей у 6-11 років у спокої вірогідно збільшилися значення SDNN з $123,59 \pm 29,19$ до $215,59 \pm 33,07$, RMSSD з $55,29 \pm 5,16$ до $85,76 \pm 11,35$, проте першого не сягали ($231,27 \pm 43,98$), а другого були вищими ($78,07 \pm 5,37$) від контролю. Індивідуальні значення ЧСС нормалізувалися у більшості обстежуваних, а rNN50% мали тенденцію до підвищення. Це може свідчити про зменшення напруженості симпатичної ланки ВНС та підвищення активності парасимпатичної. При ортостатичному навантаженні ($P < 0,05$) знизився RMSSD з $31,18 \pm 6,59$ до $20,29 \pm 1,31$ та наблизився до групи контролю ($21,93 \pm 1,36$). Тенденцію до підвищення реєстрували SDNN та rNN50%. Це дає під-

ставу стверджувати про зниження тону су парасимпатичної ланки і активацію симпатичної. У дітей 12-17 років основної групи у фоновому записі ($P < 0,05$) зменшився SDNN з $116,60 \pm 23,42$ до $66,35 \pm 5,95$ та наблизився до значення III групи ($62,67 \pm 7,77$). RMSSD мав тенденцію до підвищення з $55,00 \pm 7,23$ до $70,10 \pm 9,83$ і був на 9% вищим від контролю. На фоні комбінованого лікування rNN50% ($38,75 \pm 6,47$) був ($P < 0,05$) знижений на 17% відносно групи порівняння ($46,63 \pm 5,59$) і наблизився до контрольної ($41,13 \pm 5,77$). При ортостатичному навантаженні статистично збільшився RMSSD з $14,05 \pm 1,80$ до $19,15 \pm 1,87$ ($P < 0,05$) та наблизився до значень III групи ($21,40 \pm 1,83$). Показники SDNN та rNN50% мали тенденцію до підвищення або зниження, проте не набували статистичної значущості відносно групи порівняння. Таким чином, у дітей старшого шкільного віку реєстрували активацію обох ланок ВНС і зменшення напруженості кардіореспіраторної системи.

RMSSD вважається гіпоксичним маркером (нормобаричної гіпоксичної гіпоксії) і досліджений у дорослих [20-22]. Його динаміка відображає ступінь активності процесів авторегуляції, що забезпечують підтримку адекватного парціального тиску кисню у тканинах. У літературі ми не знайшли даних щодо вивчення КІГ гіпоксичних маркерів у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях. У нашому дослідженні зростання цього показника після впливу ПНГ у дітей обох вікових груп (фоновий запис), може свідчити про зменшення вагусного контролю міокарда, зниження навантаження на кардіореспіраторну систему та ефективність проведеної нормобаричної гіпоксії саногенного рівня. Діти молодшого віку були більш чутливими і у них були кращими пристосувальні реакції серцево-судинної системи до сеансів ПНГ.

Як показав аналіз показників спектральної потужності (фоновий запис), результати дослідження яких наведено у табл. 1 і 2,

Таблиця 1. Зміна вихідних показників варіабельності серцевого ритму у дітей від 6 до 11 років залежно від проведеного лікування із сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії (M±m)

Показник	Основна група (n=17)			Група порівняння (n=15)	
	Контрольна група (n=15)	До лікування	Після комбінованого лікування з сеансами ПНГ	До лікування	Після лікування
Аналіз спектральної потужності					
Загальна потужність спектра, мс ²	9323,80±2229,79	6172,12±1673,66	8812,18±2006,69**	5521,87±1717,19	8755,60±2427,40
Коливання високої частоти, мс ²	291,47±51,69	402,94±98,21	374,53±61,04	321,33±50,87	248,40±31,40
низької частоти, мс ²	382,93±33,78	533,94±49,63*	375,94±54,91**,**	552,80±49,21*	538,13±53,24
високої частоти в нормалізованих одиницях, %	41,07±5,9	35,00±4,85	43,53±5,96	39,07±5,72	31,13±4,33
низької частоти в нормалізованих одиницях, %	56,87±5,73	64,18±4,8	55,71±6,01	59,27±5,59	66,80±4,21
Дуже низькі коливання, мс ²	8779,20±2246,40	3118,47±1442,67	6116,18±2072,63**	4098,33±1289,43	6530,93±1993,67
Симпто-вагальний індекс, мс	2,22±0,40	2,77±0,42	1,74±0,34	2,35±0,20	2,57±0,31
Аналіз за Басєвським					
Мода, с	0,92±0,08	0,78 ±0,07	0,82±0,06	0,87±0,07	0,77±0,07
Амплітуда моди, %	32,06±1,94	37,40±3,36	33,89±1,97	29,27±3,13	33,98±3,92
Варіаційний розмах, с	0,80±0,10	0,52±0,09*	0,84±0,15	0,52±0,09*	0,84±0,14
Індекс вегетативного напруження, %/с ²	51,97±8,33	92,72±14,21*	66,82±10,00	110,39±14,84*	104,75±30,74
Вегетативний показник ритму, с ⁻¹	1,88±0,28	3,55±0,53*	2,53±0,37	3,04±0,51*	3,40±0,86
Показник адекватності процесів регуляції, %/с	38,16±3,48	54,88±2,90*	42,27±2,36**	66,91±9,70*	51,10±8,90
Індекс напруження регуляторних систем, %/с ²	32,44±5,94	70,87±11,61*	36,89±6,47**,**	85,20±11,52*	79,01±28,88

Примітка: тут і в табл. 2 – 4

*P<0,05 – різниця показників у групах відносно контролю за критерієм Манна-Уїтні;

**P<0,05 – різниці показників до та після лікування за критерієм Вілкоксона;

*** P<0,05 – різниця показників після лікування відносно групи порівняння за критерієм Манна - Уїтні.

застосування комбінованого методу сприяло також підвищенню адаптаційних реакцій та збалансуванню роботи обох відділів ВНС. Різниця між показниками дітей молодшого та старшого шкільного віку зумовлена як анатомо-фізіологічними особливостями і адаптаційними реакціями, котрі відбуваються на фоні відносно незакінченого морфогенезу у

процесі розвитку, так і активацією підкіркових нервових центрів, гіпофіза, гіпоталамуса, що беруть участь у формуванні нового гормонального стану. Отже, у дітей 6-11 років вірогідне підвищення ТР, коливань LF та тенденція до зменшення індексу LF/HF може свідчити про активацію парасимпатичного відділу ВНС. При цьому нормалізацію веге-

Таблиця 2. Зміна вихідних показників варіабельності серцевого ритму у дітей від 12 до 17 років залежно від проведеного лікування із сеансами переривчастої нормобаричної гіпксії (M±m)

Показник	Контрольна група (n=15)	Основна група (n=20)		Група порівняння (n=20)	
		До лікування	Після комбінованого лікування з сеансами ПНГ	До лікування	Після лікування
Аналіз спектральної потужності					
Загальна потужність спектра, мс ²	1796,87±434,43	3676,00±1282,62*	2795,00±730,14	5891,42±1252,73*	4488,32±1024,04
Коливання високої частоти, мс ²	430,47±49,12	451,15±103,53	361,20±61,32**	375,32±65,43	352,11 ±47,32
низької частоти, мс ²	430,20±66,39	393,85±38,58	401,95±63,95	534,84±65,37	512,95±78,51
високої частоти в нормалізованих одиницях, %	50,87±5,28	45,75±4,82	48,35±5,85***	40,26±5,36	41,26±6,00
низької частоти в нормалізованих одиницях, %	57,87±10,83	49,40±4,94	57,40±5,00	58,74±5,36	56,21±5,86
Дуже низькі коливання, мс ²	954,27±401,29	3110,90±1390,45*	2014,80±732,23**	4978,79±1259,25*	3643,05±1014,41
Симпато-вагальний індекс, мс	1,44±0,38	1,44±0,3	1,75±0,34	2,19±0,3	2,09±0,36
Аналіз за Басвським					
Мода, с	0,89±0,05	0,71 ±0,06*	0,88±0,05**	0,72±0,06*	0,96±0,05**
Амплітуда моди, %	38,95±4,50	43,82±3,04	42,61±4,02	39,31±4,25	34,42±3,71
Варіаційний розмах, с	0,50±0,10	0,38±0,06	0,54±0,09	0,74±0,13	0,65±0,12
Індекс вегетативного напруження, %/с ²	173,66±57,25	155,24±25,32	118,39±22,11	109,65±18,10	90,09±19,69
Вегетативний показник ритму, с ⁻¹	4,06±0,76	3,99±0,49	3,70±0,61	3,24±0,59	2,93±0,50
Показник адекватності процесів регуляції, %/с	46,10±5,39	56,04±5,01	50,75±4,70	50,35±7,19	39,14±5,28
Індекс напруження регуляторних систем, %/с ²	100,73±30,17	130,43±38,0	55,64±10,17**	70,20±16,09	57,23±14,32

тативного балансу спостерігали у переважної більшості обстежуваних. У дітей 12-17 років статистично значущі зміни коливань HF і HF_n, зниження VLF, тенденція до зниження TP та збільшення LF/HF дає підставу стверджувати про активацію симпатичного відділу ВНС. Показник VLF є чутливим індикатором управління метаболічними процесами та свідчить про енергодефіцитний стан організму. Він пов'язаний з психоемоційним напруженням і станом кори головного мозку, відображає ерготропний вплив і ступінь

активації вищих вегетативних центрів. Його вірогідне збільшення у дітей молодшого віку говорить про перехід з менш ефективного рівня регуляції – гуморально-метаболічного на більш ефективний – вегетативний. У дітей старшого віку його вірогідне зниження відносно вихідного рівня може свідчити про зменшення впливу надсегментарних відділів.

Індекс LF/HF є також гіпоксичним маркером і мав різноспрямовані значення у дітей різних вікових груп. У фоновому записі у дітей 6-11 років тенденція до його

Таблиця 3. Зміна показників варіабельності серцевого ритму у дітей від 6 до 11 років після виконання кліноортостатичної проби залежно від проведеного лікування із сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії (M±m)

Показник	Контрольна група (n=15)	Основна група (n=17)		Група порівняння (n=15)	
		До лікування	Після комбінованого лікування з сеансами ПНГ	До лікування	Після лікування
Аналіз спектральної потужності					
Загальна потужність спектра, мс ²	2557,47±208,12	3360,82±1193,41	2689,59±241,26	5773,93±2053,61	5506,93±1943,20
Коливання					
високої частоти, мс ²	291,73±16,38	225,59±20,91*	276,64±21,53 ^{**,***}	216,13±17,77*	237,33±29,30
низької частоти, мс ²	597,33±40,23	599,71±46,94	933,24±113,60 ^{***}	693,40±48,82	653,67±62,00
високої частоти в нормалізованих одиницях, %	35,00±1,48	25,82±1,43*	33,29±2,51 ^{**,***}	23,53±1,50*	26,13±1,51
низької частоти в нормалізованих одиницях, %	65,20±1,43	73,35±1,42*	68,35±1,84 ^{**}	75,40±1,49*	74,67±2,00
Дуже низькі коливання, мс ²	1675,33±237,87	2488,76±1211,75	1619,06±308,97	4654,93±1833,94	3559,53±1717,33
Симпто-вагальний індекс, мс	1,97±0,13	2,98±0,21*	2,23±0,17 ^{**,***}	3,35±0,25*	2,91±0,23
Аналіз за Басевським					
Мода, с	0,59±0,02	0,59±0,03	1,08±0,53 ^{***}	0,56±0,01	0,54±0,02
Амплітуда моди, %	42,73±2,99	45,64±3,39	47,09±2,41	41,10±6,37	46,71±3,58
Варіаційний розмах, сек	0,27±0,03	0,36±0,07	0,25±0,02	0,44±0,09	0,30±0,06
Індекс вегетативного напруження, %/с ²	188,39±26,38	193,95±24,87	217,62±26,41	143,72±21,86	272,91±94,83
Вегетативний показник ритму, с ⁻¹	6,91±0,68	7,15±0,80	8,02±0,70	5,79±0,63	7,82±1,24
Показник адекватності процесів регуляції, %/с	67,57±8,80	85,68±9,59	88,29±6,13	72,02±5,86	86,35±9,10
Індекс напруження регуляторних систем, %/с ²	171,66±25,64	177,6±24,7	202,1±27,0	128,9±19,6	195,3±43,2

зменшення дає підставу стверджувати про активацію парасимпатичного відділу у відповідь на нормобаричну гіпоксію, а у дітей 12-17 років (тенденція до підвищення) - про активацію симпатичного, хоча її ступінь був низький. При виконанні активної КОП у дітей молодшого віку ресстрували вірогідне зниження цього показника відносно вихідного рівня і групи порівняння та наближення до контролю. Це свідчить про короткострокові пристосувальні реакції, переважно з боку серцево-судинної системи. У дітей старшого

шкільного віку LF/HF індекс мав тенденцію до підвищення відносно вихідного рівня та групи порівняння. Враховуючи, що цей маркер відображає перехідні процеси у циклі деоксигенація-реоксигенація – деоксигенація («гіпоксія-відновлення-гіпоксія»), то його динаміка у дітей молодшого віку говорить про кращі пристосувальні реакції з залученням обох відділів ВНС у відповідь на нормобаричну гіпоксію саногенного рівня. LF/HF мав кореляційний зв'язок зі зменшенням парасимпатичної ланки ВНС та активацією

Таблиця 4. Зміна показників варіабельності серцевого ритму у дітей від 12 до 17 років після виконання кліноортостатичної проби залежно від проведеного лікування із сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії (M±m)

Показник	Контрольна група (n=15)	Основна група (n=17)		Група порівняння (n=15)	
		До лікування	Після комбінованого лікування з сеансами ПНГ	До лікування	Після лікування
Аналіз спектральної потужності					
Загальна потужність спектра, мс ²	3475,67±300,50	4925,05±487,78*	3805,55±452,82	5552,7±1650,5*	3226,79±299,97
Коливання високої частоти, мс ²	227,93±15,60	163,15±8,61*	236,15±13,69**	168,89±10,71*	205,21±18,81**
низької частоти, мс ²	775,07±52,78	616,10±41,20*	932,95±96,40**	691,63±67,57	854,57±123,20
високої частоти в нормалізованих одиницях, %	22,80±1,34	21,25±1,23	19,60±1,16	21,26±1,30	22,11±1,91
низької частоти в нормалізованих одиницях, %	75,80±1,31	78,20±1,35	79,40±1,16	76,16±1,86	76,58±1,95
Дуже низькі коливання, мс ²	2673,60±321,12	3289,30±537,16	2652,25±500,95	3424,37±1286,76	2190,05±338,61
Симпато-вагальний індекс, мс	3,48±0,21	3,85±0,24	4,35±0,36	3,72±0,34	4,13±0,49
Аналіз за Баєвським					
Мода, с	0,58±0,03	0,54±0,02	0,61±0,03	0,56±0,02	0,56±0,02
Амплітуда моди, %	42,95±3,21	51,59±3,30	48,30±2,76	46,61±3,13	44,55±2,01
Варіаційний розмах, с	0,26±0,01	0,25±0,03	0,26±0,04	0,32±0,06	0,24±0,02
Індекс вегетативного напруження, %/с ²	185,12±14,56	283,16±41,15	229,42±23,45	238,31±33,54	217,10±30,44
Вегетативний показник ритму, с ⁻¹	6,10±0,55	10,12±1,31*	7,94±0,69	9,40±1,24*	8,48±0,86
Показник адекватності процесів регуляції, %/с	74,78±7,89	98,87±7,36*	73,99±4,80**	99,60±6,32*	81,90±5,90**
Індекс напруження регуляторних систем, %/с ²	177,12±14,09	280,27±45,54	133,78±12,08***	208,44±40,63	203,03±34,92

симпатичної (сильний негативний зв'язок HF (R=-0,850) і позитивний з LF (R=0,619) у дітей 6-11 років; у дітей 12-17 років – HF (R=-0,716) і LF (R=0,951) відповідно).

Аналіз показників ВСР за Баєвським (табл.1) у дітей молодшого шкільного віку після комбінованого лікування свідчив про зменшення активації симпатичного відділу. Вірогідне зменшення ІН і ПАПР дає підставу стверджувати про зменшення центрального контуру управління серцевим ритмом. У дітей старшого віку реєстрували тенденцію до активації симпатичного відділу та зменшення

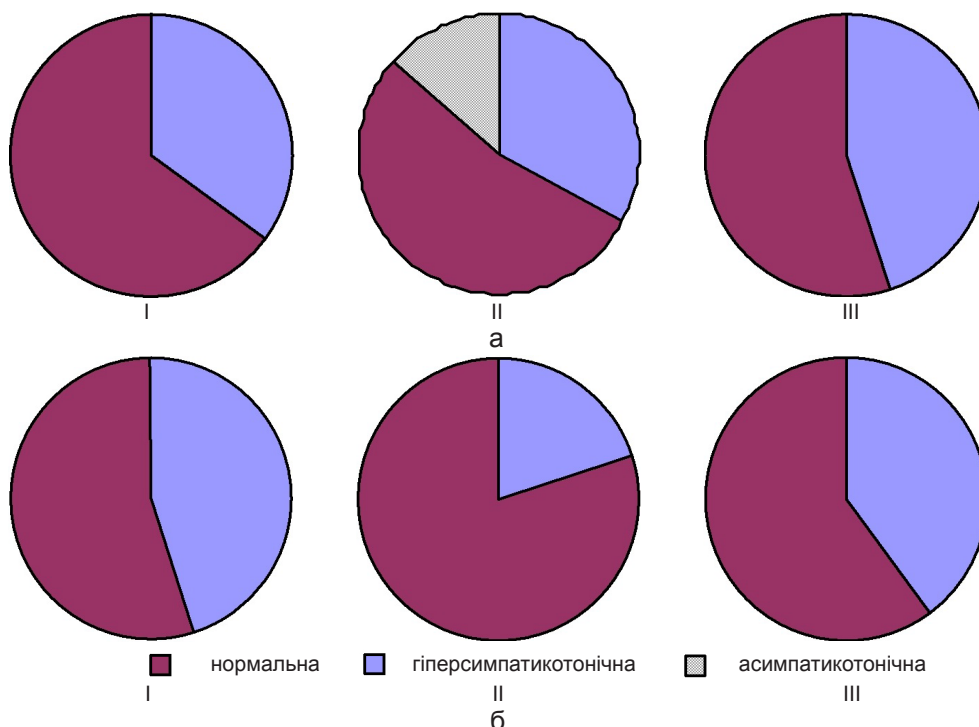
парасимпатичного. На фоні комбінованого лікування вірогідно знизився ІН (див. табл.2). При виконанні активної КОП (табл. 3, 4) після комбінованого методу лікування у дітей 6-11 років статистично значуще збільшився відносно групи порівняння Мо, що відображає гуморальний канал регуляції серцевим ритмом. Інші показники мали тенденцію до підвищення, що говорить про активацію парасимпатичного відділу у положенні стоячи. У дітей 12-17 років вірогідне зниження ПАПР і ІН дає підставу стверджувати про зменшення центрального контуру управління

серцевим ритмом і зсув у бік симпатичної ланки ВНС. Таким чином, можна вважати, що у дітей молодшого віку з патологією ШКТ, які постійно проживають на радіоактивно забруднених територіях, пристосувальні реакції серцево-судинної системи були кращими порівняно з дітьми старшого віку у відповідь на нормобаричну гіпоксію саногенного рівня. ІН (фоновий запис) у обстежуваних I групи мав кореляційний зв'язок зі зменшенням впливу парасимпатичної нервової системи за показниками RMSSD ($R=-0,822$) та pNN50% ($R=-0,722$) у дітей 6-11 років. Те саме реєстрували і у дітей 12-17 років ($R=-0,684$, $R=-0,539$ відповідно). При зменшенні ІН відмічався перерозподіл у бік автономного контуру управління серцевим ритмом у дітей обох вікових категорій (у молодшого шкільного віку – $R=0,449$ і у старшого – $R=0,517$).

Індикатором реакції серцево-судинної системи на сеанси ПНГ є коефіцієнт співвідношення ІН при ортостатичному навантаженні

до спокою, тобто вегетативна реактивність. На фоні проведеного комбінованого лікування вегетативна реактивність у дітей обох вікових категорій наблизилася до контролю (рисунок). Гіперсимпатикотонічний варіант вегетативної реактивності відображає ступінь захисних механізмів при будь-яких патологічних впливах, а асимпатикотонічний свідчить про виснаження симпатичної ланки. Отримані результати дають підставу стверджувати, що у переважної більшості дітей з патологією ШКТ, після сеансів ПНГ, було достатнє залучення симпатичної ланки і нормалізація вегетативної реактивності.

Вегетативне забезпечення діяльності є важливим показником узгоджуваності регуляторних систем організму та здатності на тривалу підтримку вегетативної реактивності на певному рівні. Так, у дітей 6-11 років на фоні комбінованого лікування нормальний варіант реєстрували у 53%, недостатнє забезпечення у 6%, надмірне – 41%. У групі порів-



Зміна вегетативної реактивності (%) у дітей 6-11(а) та 12-17 років (б) у I (основної групи – комбіноване лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії), II (порівняння – медикаментозне лікування) груп після лікування та III – контрольної

няння на фоні медикаментозного лікування ці значення були у 47, 6, 47% відповідно, а у групі контролю у 67 (нормальне), у 33 % (надмірне). У дітей старшого шкільного віку розподіл значень вегетативного забезпечення діяльності – у 50, 25, 25% відповідно, у групі порівняння – 50, 10, 40%, а у групі контролю значення були як у дітей 6-11 років. Таким чином, для дітей молодшого шкільного віку на фоні комбінованого лікування було характерним надмірне включення симпатoadреналової системи, а у дітей старшого віку відмічали певну рівновагу між ланками ВНС.

Отже, у дітей, що постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях, на фоні проведеного комбінованого лікування з сеансами ПНГ вірогідні зміни при аналізі статистичних показників ВСР свідчили про зменшення напруженості симпатичної ланки у дітей 6-11 років і активацію обох ланок у дітей 12-17 років. Аналіз спектральної потужності дає підставу стверджувати про зниження парасимпатичної ланки у обох групах. Діти молодшого шкільного віку виявилися більш чутливими до комбінованого лікування і пристосувальні реакції серцево-судинної системи у них були кращими, що підтверджує метод за Баєвським. Таким чином, дітям з захворюванням ШКТ крім патогенетичного лікування (згідно з протоколами), варто застосовувати комбіноване лікування з сеансами ПНГ саногенного рівня для нормалізації вегетативного дисбалансу.

ВИСНОВКИ

1. Після застосування комбінованого лікування з сеансами ПНГ у переважній більшості дітей основної групи зсув вихідного вегетативного тону був у бік ейтонії і ваготонії.

2. У дітей віком від 6 до 11 років після сеансів ПНГ (комбіноване лікування) вірогідно збільшився кардіоінтервалографічний гіпоксичний маркер RMSSD на 36% у фоновому записі і знизився на 35% при виконанні активної КОП. У дітей 12-17 років цей

показник вірогідно збільшився при КОП на 27%.

3. У пацієнтів молодшого шкільного віку після комбінованого лікування вірогідно знизився LF на 30% відносно групи порівняння у спокої. А при виконанні активної КОП збільшилися абсолютні показники – HF 14%, LF на 30% та відносний показник HF α на 21,5% (відносно групи порівняння). При цьому індекс LF/HF знизився на 23%, що свідчить про зниження активації парасимпатичної ланки та вегетативну рівновагу. Він мав кореляційний зв'язок зі зменшенням активації парасимпатичної ланки у дітей обох вікових груп.

4. У дітей 6-11 років статистично значуще зменшився ІН відносно групи порівняння на 53% і наблизився до контрольного значення, що свідчить про зниження центрального контуру управління серцевим ритмом у фоновому записі, а у дітей 12-17 років знизився на 34% при виконанні КОП.

5. Застосування комбінованого методу у дітей з патологією ШКТ, які постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях, виявилось більш ефективним та сприяло нормалізації вегетативного балансу, що підтверджено отриманими показниками ВСР.

Л.М. Лісуха

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕРЫВИСТОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ВЕГЕТАТИВНЫЙ ГОМЕОСТАЗ У ДЕТЕЙ С РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ РЕГИОНОВ

Исследовано влияние прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) саногенного уровня на детей, проживающих на радиоактивно загрязненных территориях. Обследованы были разделены на три группы: 37 человек основная (I группа-медикаментозное лечение согласно с протоколами и сеансы ПНГ), 35 - сравнение (II- медикаментозное лечение), 30 - контрольная (III - здоровье). Установлено, что у детей 6-11 лет основной группы после комбинированного лечения с сеансами ПНГ (10-12% кислорода в азоте) достоверно увеличило значение RMSSD на 36% в фоновой записи, а у детей 12-17 лет - на 27% при выполнении клиноортостатической пробы. Доказано, что симпато-вагальный индекс снизился на 23% у детей 6-11

лет относительно группы сравнения. Индекс напряжения регуляторных систем уменьшился у детей обеих групп, что свидетельствует об уменьшении центрального контура управления сердечным ритмом.

Ключевые слова: прерывистая нормобарическая гипоксия; вариабельность сердечного ритма; кардиоинтервалографические гипоксические маркеры; клиноортостатическая проба; дети с радиоактивно загрязненных территорий.

L.M.lisukha

INFLUENCE OF INTERMITTENT NORMOBARIC HYPOXIA ON THE VEGETATIVE HOMEOSTASIS IN CHILDREN FROM RADIOECOLOGICALLY AFFECTED REGIONS

The effect of intermittent normobaric hypoxia (INH) of sanogenic level on children living in radioactively contaminated territories has been investigated. Children divided into three groups: 37 patients were included in the main group (the 1st group – medical therapy according to the protocols and INH sessions), 35 persons – in the comparison group (the 2nd group – medical therapy), 30 persons – in the control group (the 3rd group – healthy persons). A significant increase in RMSSD index by 36% in phone registration was established in children aged 6-11 years of the main group after combined treatment with INH sessions (10-12% oxygen in nitrogen), and by 27% under the use of orthoclinostatic test in children aged 12-17 years. A decrease of the sympathovagal index by 23 % in children aged 6-11 years was demonstrated concerning the group of comparison. The tension index of regulatory systems was decreased in children of both groups, that is indicative of the decrease in the central contour of cardiac rhythm control. Key words: intermittent normobaric hypoxia; heart rate variability; cardiointervalographic hypoxic markers; orthoclinostatic test; children from radioactively contaminated territories.

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

REFERENCES

1. Streilkov RB, Chizhov AY. Intermittent normobaric hypoxia: prevention, treatment, rehabilitation. 2 nd ed. Yekaterinburg : «Ural worker»; 2001. [Russian].
2. Berezovskiy VA. Natural and instrumental oroterapia. Zaslavsky AY, ed. Donetsk; 2012. [Ukrainian].
3. Nesterov SV. Effect of acute cerebral circulation experimental hypoxia and vegetative regulation of human heart rate [dissertation]. St. Petersburg: St. Petersburg Medical Institute; 2004. [Russian].
4. Chizhov AY, Bludov AA. Heart rhythmograma - an indicator of the effectiveness of cardiorespiratory training to enhance the body's resistance to adverse factors. Bull People's Friendship University. A series of «Ecology and

- life safety.»1997; 2: 153 – 7. [Russian].
5. Baevskyy RM, Ivanov GG. Heart rate variability: Theoretical aspects and clinical possibilities of application. Moscow: Medicine: 2000. [Russian].
6. Baevsky RM, Ivanov IG, Chireykin LV. Analysis of heart rate variability using differences electrocardiographic systems. Bull Arrhythm. 2001; 24: 66-85. [Russian].
7. Baevsky RM, Kirillov OI, Kletskin SZ. Mathematical analyses of heart rate changes during stress. Moscow: Science: 1984. [Russian].
8. Baevsky RM. Analysis of heart rate variability in space medicine. Hum Phys. 2002; 28 (2): 70-82. [Russian].
9. Cardiointervalography in the assessment of the reactivity and the severity of the condition of sick children: method. recommendations. Moscow. 1985. [Russian].
10. Yabluchanskii NI, Martinenko AV. Heart rate variability for practicing doctor help. For real doctors. Kharkov: 2011. [Ukrainian].
11. Blagin AA, Filatov VN. Orthostatic test as a method of evaluation of stress impact. Func diagnost. 2005; 2: 32 – 5. [Russian].
12. Wayne AM, Voznesenskaya TG, Vorobyova OV. Vegetative disorders. Clinic, diagnosis, treatment. Moscow: OOO «Medical News Agency»; 2003. [Russian].
13. Maidannyk VG. Vegetative dysfunctions of children (pathogenics mechanisms and clinical forms. Ped Obstet and Genec. 2006; 1: 5 – 11. [Ukrainian].
14. Lezhenco GO, Pashcov OY. Vegetative dysfunctions of children. Pathogenesis, diagnostic and therapeutic strategy. Child doc. 2011; 4: 20 – 3.[Ukrainian].
15. Belyaeva LM. Pediatric cardiology and rhrumatology. Moscow: OOO «Medical News Agency»; 2011. p. 280-96. [Russian].
16. Medical and demographic consequences of the Chernobyl disaster in Ukraine. Chernobylinterinform. Kiev; 2004. p. 58–75. [Ukrainian].
17. Berezovskiy Horban YM, Levashov MI, Sutkovsky AD. Technology body resistance increase using hypoxotherapy. Kyiv; 2000. [Ukrainian].
18. Ayvazian SA Mkhitaryan VS Applied Statistics and Econometrics basics. Moscow; 1998. [Russian].
19. Leonov VP, Izhevsk PV. Applied Statistics in Medicine. Int J Med Pract. 1998; 4: 7 – 15. [Russian].
20. Bludov AA, Vorontsov VA. Dynamic analyses of heart rate variability during hyperventilation. RAS Hum Physiol. 1998; 6: 66 – 71. [Russian].
21. Bludov AA. Medico-ecological monitoring of functional systems of the body at the resonance hypoxitherapy [dissertation]. Moscow: Russian Medical Academy Postgraduate Education; 1999. [Russian].
22. Nesterov SV. Vegetative regulation of heart rhythm under conditions of acute experimental hypoxia. Hum Physiol. 2005; I: 82 – 7. [Russian].
23. Ishekov AN. Dynamics of cardiorespiratory system indices during adaptation to normobaric hypoxia in the European North of Russia. Hum Ecol. 2009; 9: 38 – 2. [Russian].
24. Vakulenko DV, Vakulenko LO. The study results of dif-

- ferential impact mechanisms of massage of patients with neurological syndrome degenerative disc disease of the cervical spine with a biorhythms digital analyzer. Clin Informat and Telemed. 2014; 11: 66-71. [Ukrainian].
25. Nekhanevich OB. Cardiovascular system deadaptation symptoms relatively according physical loads symptoms to heart rate variability data. Biol and Med Probl bull. 2014; 1(106): 317-20. [Ukrainian].
 26. Levchenko IL. State suprasedgmental vegetative regulation of different sexes patients with progredient types of multiple sclerosis. Int Neurolog J. 2012; 1 (47): 69-7. [Ukrainian].
 27. Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Circ. 1996; 93: 1043 – 65.
 28. Mourot L, Bouhaddi M, Perrey S. Decrease in heart rate variability with overtraining: Assessment by the Pioncare plot analyses. Clin Physiol Funct Imag. 2004; 24 (1): 10 – 8.
 29. Andre E, Seps B, Beckers F. Heart rate variability of athletes. Sport Med. 2003;33(12): 889 – 919.
 30. Manis G, Nikolopoulos S, Alexandridi A, Davos C. Assessment of the classification capability of prediction and approximation methods for HRV analysis. Comp Biol and Med. 2007; 37 (5): 642 – 654.
 31. Axelrod FB, Chelimsky GG, Weese-Mayer DE. Pediatric autonomic disorders. Pediatr. 2006;118(1) : 309 – 21.
 32. Kondrashova VG, Kolpacov IYe, Vdovenko VYu, Leonovych OS, Lytvynets OM, Stepanova YeI. Balans of autonomic nervous system in children having signs of endothelial dysfunction, that were born and domiciled in contaminated territories. Prob Radiat Medic and Radiobiol. 2014; 19: 298 – 309. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 28.04.2015*

Порушення про- та антиоксидантного балансу при застосуванні доксорубіцину та його корекція за допомогою куркуміну в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів

О.О. Лінник¹, Т.І. Древицька¹, О.О. Гончар¹, С.А. Чорний², О.М. Ковальов³, І.М. Маньковська¹

¹ Інститут фізіології О.О. Богомольця НАН України; ² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України; ³ Національний авіаційний університет, Київ; e-mail: newmulo@gmail.com

Досліджено вплив доксорубіцину на систему транскрипційного фактора індукованого гіпоксією (HIF), і про- та антиоксидантний баланс неонатальних кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину та можливість корекції його порушень куркуміном. Виявлено, що рівень експресії мРНК HIF-1 α при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл становив $2,9 \pm 0,8$ ум.од., тобто він зменшувався на 20 % вірогідно відносно контролю. Рівень експресії гена-мішені HIF піруват-дегідрогенази кінази-1 (PDK-1) також достовірно зменшувався у 4 рази. При інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилася на 50,4 %, а при сумісній дії доксорубіцину і куркуміну відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7 порівняно з використанням лише доксорубіцину. Доксорубіцинова інтоксикація призводила до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) у 3,6 рази та перекису водню на 64%. Також знижувалася ферментативна активність марганцевої супероксиддисмутази (Mn-SOD) на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% порівняно з контролем ($P < 0,05$). Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-SOD на 14%, каталази - на 23%. При цьому вміст ТБК-АП зріс в 1,4 рази порівняно з контролем, а H_2O_2 підвищився на 20%. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну значно знижувало рівень вільнорадикальних процесів на відміну від ефектів додавання самого доксорубіцину: відбувалося зниження вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4% відповідно) при зменшенні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-SOD (на 35%). Ключові слова: окисний стрес; кардіоміоцити; індукований гіпоксією фактор (HIF-1 α); доксорубіцин; куркумін.

ВСТУП

Порушення окисно-відновного стану клітини викликає підвищений рівень генерації таких активних форм кисню (АФК), як пероксиди і вільні радикали, надмірне утворення яких призводить до розвитку окисного стресу з його потужним пошкоджувальним ефектом на метаболічні процеси, структурні компоненти клітин, зокрема мітохондрії та їх геном [1,2]. У людини окисний стрес є причиною або важливою складовою частиною патогенезу багатьох захворювань, а саме: кардіо-

міопатія, атеросклероз, хвороба Паркінсона та інші нейродегенеративні захворювання, обструктивні захворювання легень, діабет, ожиріння, прискорене старіння тощо. Завдяки використанню сучасних молекулярно-генетичних технологій, стало відомо, що надзвичайно важливу роль у процесах вільнорадикального окиснення відіграють зміни експресії генів системи транскрипційного фактора, індукованого гіпоксією (HIF). Останній експресується в усіх видах клітин, у тому числі кардіоміоцитах, та є промотором десятків генів, задіяних у регуляції кисне-

вого гомеостазу, ангиогенезу, еритропоезу, виживання та загибелі клітини тощо [3]. Але лише нещодавно стало відомо, що HIF-1 має велике значення і в регуляції продукції АФК у мітохондріях завдяки різним механізмам: прямим – регуляція біогенезу та аутофагії мітохондрій, перебудова патерну експресії білків субодиниць цитохром С оксидази, а також опосередкованим – регуляція експресії піруватдегідрогенази (PDK-1), яка фосфорилує та інактивує піруватдегідрогеназу (PDH). Інгібування PDH за допомогою PDK-1 зменшує доставку NADH до дихального ланцюга і споживання кисню у мітохондріях, таким чином забезпечуючи протективний механізм проти підвищеної продукції АФК у мітохондріях. На підтримку цього положення можна вказати такий факт, що ембріональні фібробласти миші, в яких відсутній ген HIF-1 α , гинуть у результаті накопичення АФК, тому що в них немає механізмів індукції PDK-1 [4].

Активация вільнорадикального окиснення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами – антибіотиками, які наразі широко використовують при лікуванні онкологічних захворювань як апоптоз-промотуючі фактори. У зв'язку з розповсюдженістю онкологічної патології нині особливо актуально попередити розвиток побічної дії цих препаратів на серцево-судинну систему.

В експериментальних роботах останніх років [5] доведено спроможність антрациклінових антибіотиків блокувати роботу HIF і пригнічувати експресію залежних від нього генів. Але ще дуже мало відомо про молекулярно-генетичні механізми порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів за умов застосування антрациклінових антибіотиків, зокрема доксорубіцину.

Що стосується стратегії корекції порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів, то за останній час значно зросла кількість праць, присвячених дослідженню дії куркуміну – антиоксиданта рослинного

походження. Він є жовтим пігментом, отриманим з коренів рослини *Curcuma longa*. Повідомлялося, що куркумін має протективний ефект при пошкодженні міокарда та допомагає збереженню функцій серця [6], впливає на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, асоційованих із запаленням [7], здатний блокувати активацію та транслокацію із цитоплазми в ядро ядерного фактора κB (NF- κB) внаслідок перешкоджання деградації його інгібітора [8,9]. Крім того, куркумін зменшує токсичний вплив доксорубіцину на тканини серця, печінки та нирки за рахунок своїх антиоксидантних властивостей [10].

Метою нашої роботи було дослідити зміни експресії HIF та його генів-мішеней *in vitro* і стан про- та антиоксидантного балансу неонатальних кардіоміоцитів при застосуванні доксорубіцину, а також можливість корекції окисного стресу за допомогою куркуміну.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на культурі ізолюваних кардіоміоцитів дводобових неонатальних щурів лінії Вістар. Виділення і культивування кардіоміоцитів здійснювали відповідно до модифікованої методики. За допомогою цервікальної дислокації щурів знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітки виймали серце та відокремлювали шлуночки з подальшим їх відмиванням в буферному розчині, що містить HEPES - 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na₂HPO₄ – 0,4 та K₂HPO₄ – 0,4 ммоль/л та подрібненням. Ферментативне розщеплення проводили у середовищі виділення, яке на основі вищезазначеного буферу містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Ресуспендували клітини у середовищі для культивування такого складу: Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%, Na₂CO₃ – 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л

та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Підрахунок виділених клітин проводили з використанням світлової мікроскопії після фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Культивували протягом 1 доби при 37°C у газовому середовищі, яке містило 5% CO₂ та 95% атмосферного повітря. Після 24 год. інкубації в культуру додавали 0,5 мкмоль/мл доксорубіцину гідрохлориду (“Sigma Aldrich”, США), чи доксорубіцин у вказаній дозі разом з куркуміном (“Sigma Aldrich”, США) в дозі 20 мкмоль/мл.

Для кількісної оцінки життєздатності кардіоміоцитів, функціональної спроможності мітохондрій та впливу куркуміну використовували МТТ-тест (MTT Protocol, Wallertand Provost Lab), котрий базується на здатності живих клітин перетворювати блідо-жовтий водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-5-дифенілтетразолійбромід (МТТ) у блакитні кристали формазану (МТТ-ф), нерозчинні у воді. Кількість утвореного формазану визначали колориметричним методом після його розчинення в органічних розчинниках. Клітини саджали на 96-лункові планшети (20 тис. клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцином (“Sigma Aldrich”, США) в дозі 0,5 мкмоль/мл і з куркуміном в дозі 20 мкмоль/мл (“Sigma Aldrich”, США), який додавали, за годину до доксорубіцину, в середовищі DMEM+199 впродовж 24 годин. Через добу до кожної лунки додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (“Sigma Aldrich”, США) на 1 мл фосфатного буферу PBS) та інкубували 4 год. Результат оцінювали вимірюванням на спектрофотометрі оптичної щільності лізату, отриманого за допомогою додавання до кожної лунки по 200 мкл DMSO, при довжині хвилі 570 нм.

Для біохімічних досліджень клітини з чашок знімали за допомогою 0,2%го розчину натрієвої солі етилендіамінотетраоцтової кислоти (рН 8,1), який містив 0,15% трипсину, протягом 15 хв. Ступінь окисного стресу кардіоміоцитів оцінювали за вмістом

активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [11] та перекису водню [12], антиоксидантний захист – за активністю Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) [13] та каталази. [14]

Для оцінки змін експресії мРНК HIF-1 α і PDK-1 при застосуванні доксорубіцину використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР) [15]. Виділяли тотальну РНК з культури неонатальних кардіоміоцитів з використанням набору „Trizol RNA Prep 100” („Isogen”, Росія), який містить Trizol reagent (денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). Оцінку експресії генів проводили з використанням напівкількісної зворотної транскрипції, використовуючи набори для синтезу кДНК із зворотною транскриптазою „RevertAid H Minus M-MuLV RT” („Fermentas”, Литва). Транскрипційна суміш складалася з 5 мкл тотальної РНК (500 нг – 1 мкг/мкл), 1 мкл праймерів „RandomHexamer” (0,5 мкг/мкл), 20 од. інгібітора рибонуклеаз, 20 ммоль/л суміші дезоксирибонуклеотидів та 200 од. зворотної транскриптази. ПЛР проводили в термоциклері «AppliedBiosystems 2700» («PerkinElmer», США) за індивідуальними програмами для кожного гена. Для визначення експресії генів використовували метод ПЛР у реальному часі на термоциклері “7500 FastReal-Time PCR System”. Для гена PDK-1 ПЛР-ампліфікацію проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 30 ммоль/л кожного праймера: PDK-1 sense 5`-CAG GGT GTG ACT GAA TAC AAG G-3`, antisense 5`-GAG ATG CGA CTC ATG TAG AAC C-3`. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася з попередньої активації AmpliTaqGold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C та складалася з 50 циклів: денатурація – 95°C (15 с), приєднання праймерів та елонгація – 64°C (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 64 до 99°C із реєстрацією

зниження інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з SYBR®Green. Для визначення змін експресії гена HIF-1 α використовували систему TaqMan Gene Expression Assay. Експресію стандартизували відносно гена GADPH (набір TaqMan® Assay Reagents Rat GADPH). Початкова денатурація при 95°C протягом 20 с, ампліфікація складалася з 65 наступних циклів: денатурація при 95°C 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60°C 30 с. Аналіз отриманих результатів експресії генів проводили за допомогою програмного забезпечення 7500 FastReal-time PCR Software.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням електронних таблиць «Microsoft® Excel 2013», а також програми Origin. Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами було проведено дослідження рівня цитотоксичності різних доз доксорубіцину («Sigma Aldrich», США) та життєздатність кардіоміоцитів за допомогою МТТ-тесту [15]. А саме, при інкубації культури неонатальних

кардіоміоцитів з доксорубіцином в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкмоль/мл кількість живих клітин відносно до контролю зменшилася на $10,9 \pm 9,99$; $23,6 \pm 8,76$ та $31,5 \pm 9,86$ %, відповідно. Це дало можливість вибрати дозу доксорубіцину 0,5 мкмоль/мл як оптимальну для подальших досліджень. У цій роботі ми використовували середню дозу доксорубіцину – 0,5 мкмоль/мл, як таку, що вже викликала зміни, характерні для оксидативного пошкодження, але ще не призводила до суттєвої загибелі кардіоміоцитів [15].

Встановлено, що при використанні доксорубіцину в такій дозі суттєво змінюється експресія мРНК HIF-1 α і PDK-1 у культурі неонатальних кардіоміоцитів (рис.1).

А саме, рівень експресії мРНК HIF-1 α становив $3,6 \pm 0,7$ ум.од. у контролі і $2,9 \pm 0,8$ ум.од. при використанні доксорубіцину в зазначеній концентрації, тобто він зменшувався на 20 % відносно контролю ($P < 0,05$). Водночас, рівень експресії гена-мішені HIF PDK-1 зменшувався у 4 рази порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Отримані результати підтверджують самотні літературні дані щодо можливості доксорубіцину пригнічувати HIF, котрий, в свою чергу, змінює рівень експресії свого

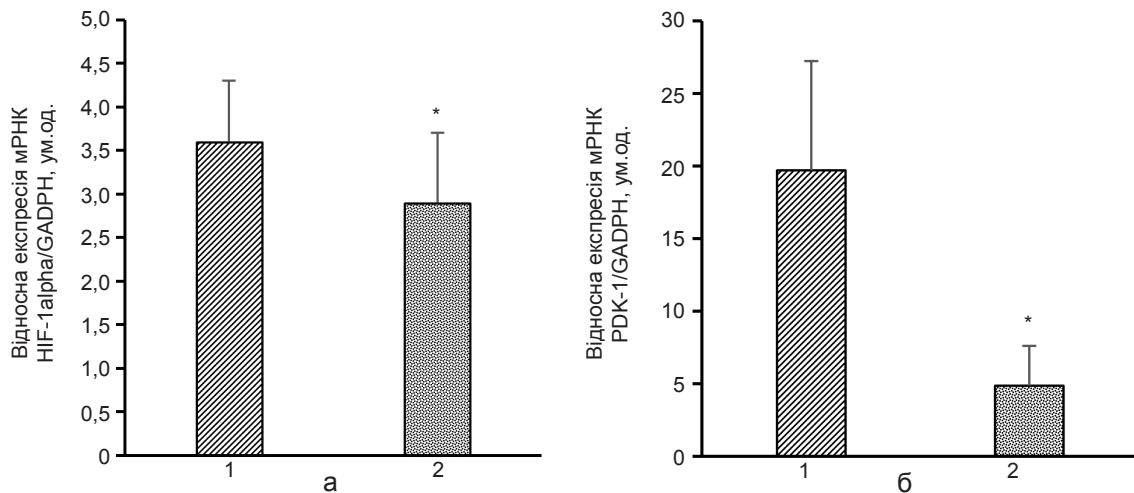


Рис.1. Зміни експресії мРНК фактора, індукованого гіпоксією-1 α , (HIF-1 α) (а) та піруватдегідрогеназикинази-1 (PDK-1) (б) при використанні 0,5 мкмоль/мл доксорубіцину в культурі неонатальних кардіоміоцитів при полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі: 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином * $P < 0,05$ вірогідні відмінності порівняно з контролем

гену мішені PDK-1. З'ясовано, що навіть за умов нормоксії HIF-1 може інактивувати PDK-1 і тим самим гальмувати цикл Кребса, зменшуючи утворення ацетил-*CoA* з пірувату, та дихання мітохондрій [16]. Lee із співавт. вважають, що доксорубіцин має здатність інгібувати HIF-1-опосередковані відповіді через блокування його зв'язку з ДНК пригніченням здатності гетеродимера зв'язуватися з чутливим до гіпоксії консенсусним елементом регуляторних ділянок -RCGTG- [17,18].

Крім того, нещодавно з'явилися відомості про можливість куркуміну інгібувати активність HIF-1 та, відповідно, рівень експресії його генів-мішеней внаслідок стимуляції протеасомної деградації субодиниці HIF-1 β (ARNT) окисленням та убіквітинізацією в пухлинних клітинах [19]. Але дослідження зміни експресії HIF та його генів-мішеней за умов подвійного та послідовного впливу доксорубіцину та куркуміну на непухлинні клітини досі не проводили. Також, є необхідність дослідження змін експресії транскрипційного фактора HIF та його генів-мішеней за умов подвійного та послідовного впливу доксорубіцину та куркуміну як на культуру неонатальних кардіоміоцитів, так і *in vivo* для знаходження ефективних методів протекції міокарда на молекулярно-генетичному рівні при використанні антрациклінів.

За результатами МТТ-тесту можна оцінити інтенсивність окисно-відновних процесів у клітинах культури і опосередковано характеризувати активність біомаси. За отриманими нами результатами можна зробити висновок про зміну рівня цитотоксичності доксорубіцину окремо та в поєднанні з куркуміном на неонатальні кардіоміоцити. При інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на 50,4 %, а з доксорубіцином та куркуміном відсоток загинувших клітин зменшився на 7,7 порівняно з використанням лише доксорубіцину (рис.2). Це підтвердило літературні дані щодо кардіопротекторних властивостей куркуміну [9].

Згідно з нашими дослідженнями, вплив доксорубіцину призводить до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти у 3,6 раза та перекису водню на 64% на відміну від контрольної групи ($P < 0,05$; рис.3). Це свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення, яке може призводити до змін у структурній організації клітин міокарда.

Ступінь деструктивно-метаболических порушень кардіоміоцитів за цих умов залежить від стану ферментних і неферментних антиоксидантних систем, узгоджена дія яких тримає під контролем як утворення, так і інактивацію активних форм кисню. Важливе значення у цих системах належить ферментам СОД та каталазі [20,21], що діють у взаємозв'язку. Початкові стадії процесу вільнорадикального окиснення контролюються СОД, яка дезактивує супероксидний радикал і, відповідно, зменшує загальний токсичний ефект АФК. Пероксид водню, що утворюється при дисмутації супероксидного аніона, розкладається каталазою. Вважається, що Mn-СОД відіграє найбільш суттєву роль у антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний рівень супероксид-аніона, а активація експресії СОД захищає клітини від окисного стресу різного генезу [22]. У нашій роботі тривала інкубація кардіоміоцитів з доксорубіцином знижувала ферментативну активність

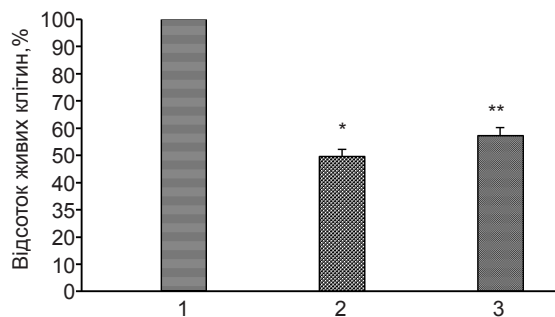


Рис.2. Відсоток живих клітин у культурі кардіоміоцитів за даними МТТ-тесту при використанні: 1- доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл; 2- при поєднанні доксорубіцину з куркуміном у дозі 20 мкмоль/мл. * $P < 0,05$ вірогідні відмінності порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

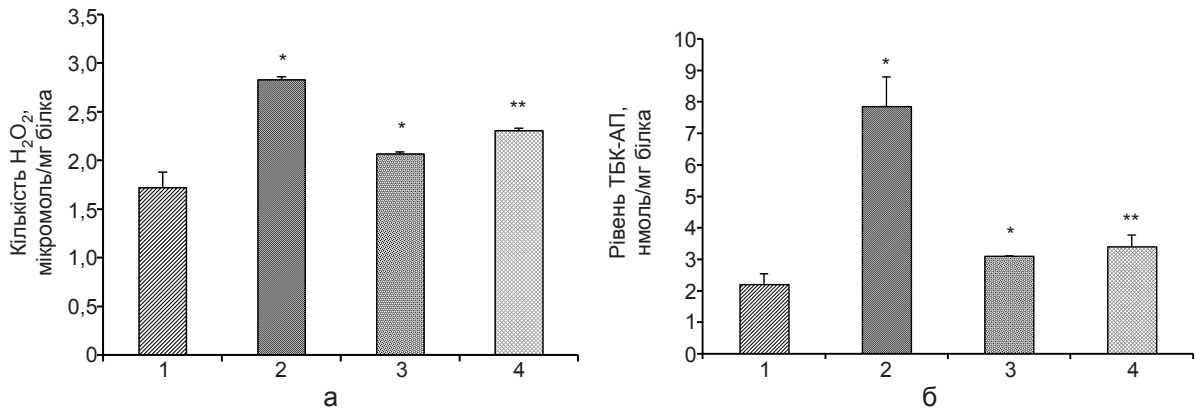


Рис.3. Зміна вмісту перекису водню (а) та активних продуктів тіобарбітурової кислоти (б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при: 1- інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), 2- куркуміном (20 мкмоль/мл), 3- при їх сумісному застосуванні в тих же дозах. *P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з контролем, **P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

Mn-SOD на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% порівняно з контролем (рис.4). Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції H₂O₂, який, як відомо, виступає субстратом для антиперекисних ферментів [20].

Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-SOD на 14%, каталази - на 23% порівняно з контролем, що підтверджує дані інших досліджень про властивості цього препарату як антиоксиданта [9].

Використання куркуміну поліпшує антиоксидантний статус і, тим самим, запобігає пошкодженню серця в основному через

його помірну антиоксидантну дію [23]. Антиоксидантні механізми куркуміну можуть включати в себе один або більше з наступних взаємодій: нейтралізація вільних радикалів [24], інгібування цитохром P₄₅₀ [25], зменшення доступності кисню до окисних реакції, взаємодія з окисним каскадом і запобігання його наслідкам [26], зменшення окисних властивостей таких іонів металів, як залізо [27, 28]. Таким чином, куркумін ефективно запобігає пошкодженню тканин за рахунок зменшення окисного стресу та відновлення антиоксидантного статусу.

Однак в наших експериментах при додаванні в культуру неонатальних кардіоміоцитів 20 мкмоль/мл куркуміну на 24

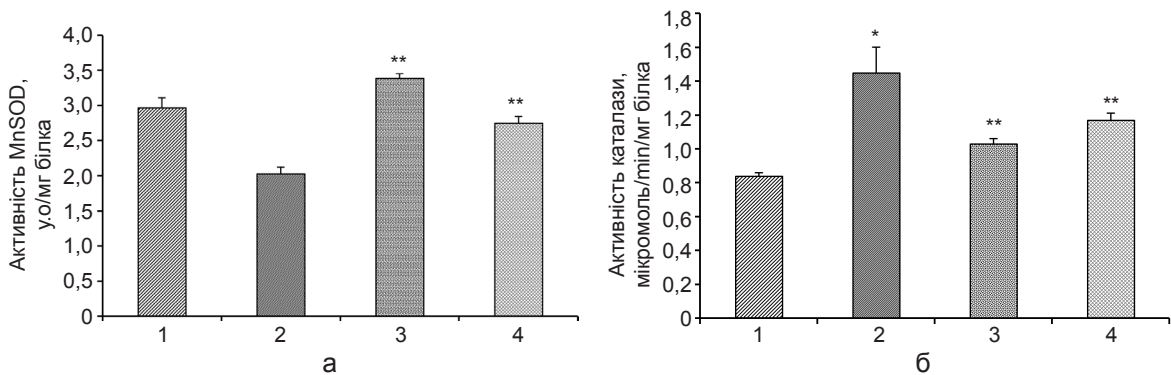


Рис.4. Зміна активності марганцевої супероксиддисмутази (а) та каталази (б) у культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з: 1- доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), 2- куркуміном (20 мкмоль/мл), 3- при їх сумісному застосуванні. *P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з контролем, **P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

год. ці процеси відбувалися на тлі деякого підвищення вмісту ТБК-АП і H_2O_2 , а саме: вміст ТБК-АП зріс у 1,4 раза порівняно з контролем, а H_2O_2 підвищився на 20% (див. рис.3). Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну в культурі кардіоміоцитів призводило до значного зниження рівня вільно-радикальних процесів на відміну від впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4%, відповідно; див. рис.3), при зниженні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-SOD (на 35%; див. рис.4) свідчить про тенденцію до відновлення про-антиоксидантної рівноваги кардіоміоцитів. Таким чином, додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину мало позитивний коригувальний вплив на вільнорадикальні процеси та антиоксидантний захист.

ВИСНОВКИ

Показано, що рівень експресії мРНК NIF-1 α у культурі неонатальних кардіоміоцитів при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл становив $2,9 \pm 0,8$ ум.од., тобто він зменшувався на 20 % відносно контролю - $3,6 \pm 0,7$ ум.од. ($P < 0,05$). Рівень експресії гена-мішені NIF PDK-1 також вірогідно зменшувався у 4 рази порівняно з контролем. За результатами МТТ-тесту при інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на 50,4 %. А разом з куркуміном відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7 % порівняно з використанням лише доксорубіцину. Додавання доксорубіцину призводило до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти у 3,6 рази та перекису водню на 64% порівняно з контролем ($P < 0,05$). Також тривала інкубація клітин з доксорубіцином знижувала ферментативну активність Mn-SOD на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72%. Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-

SOD на 14%, каталази - на 23% у порівнянні з контролем. При цьому вміст ТБК-АП зріс в 1,4 раза, а вміст H_2O_2 підвищився на 20% ($P < 0,05$). Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до значного зниження рівня вільно-радикальних процесів на відміну від ефектів застосування доксорубіцину *per se*. А саме, знижувався рівень ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4%, відповідно), при зменшенні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-SOD (на 35%). Пригнічення експресії генів NIF-1 α і PDK-1 підвищує роль прооксидантної ланки в про-антиоксидантному статусі кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину.

О.А. Линник, Т.И. Древицкая, О.А. Гончар, С.А. Черный, А.М. Ковалев, И.Н. Маньковская

НАРУШЕНИЕ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДОКСОРУБИЦИНА ТА ЕГО КОРРЕКЦИЯ КУРКУМИНОМ В КУЛЬТУРЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

Исследовано влияние доксорубицина на систему транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, NIF, и про-антиоксидантный баланс неонатальных кардиомиоцитов и возможность коррекции его нарушений с помощью куркумина. Выявлено, что уровень экспрессии мРНК NIF-1 α при использовании доксорубицина в дозе 0,5 мкмоль/мл составлял $2,9 \pm 0,8$ усл.ед., то есть он уменьшался на 20% относительно контроля $3,6 \pm 0,7$ усл.ед. ($P < 0,05$). Уровень экспрессии гена-мишени NIF пируватдегидрогеназы киназы (PDK-1) также достоверно уменьшался в 4 раза. При инкубации культуры неонатальных кардиомиоцитов с доксорубицином количество живых клеток по отношению к контролю уменьшилось на 50,4%, а совместно с куркумином – процент погибших клеток уменьшился на 7,7 по сравнению с использованием только доксорубицина. Добавление доксорубицина приводило к значительному повышению в кардиомиоцитах уровня активных форм тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) в 3,6 раза и перекиси водорода на 64%. Применение доксорубицина снижало также ферментативную активность Mn-SOD на 32%, при этом активность каталазы возрастала на 72% по сравнению с контролем. Добавление куркумина в клеточную культуру кардиомиоцитов способствовало повышению активности Mn-SOD на 14%, каталазы - на 23%. При этом уровень ТБК-АП вырос в 1,4 раза по сравнению с контролем, а уровень H_2O_2 повысился на 20%. Совместное применение доксорубицина и куркумина приводило к значительному

снижению уровня свободнорадикальных процессов в отличие от доксорубициновой интоксикации, а именно, вызывало снижение содержания ТБК-АП и H_2O_2 (на 56,7 и 18,4% соответственно), при уменьшении гиперактивации каталазы (на 19%) и росте активности Mn-СОД (на 35%).
Ключевые слова: окислительный стресс; кардиомиоциты; фактор индуцированный гипоксией (HIF-1 α); доксорубицин; куркумин.

O. Linnik, T. Drevytska, O. Gonchar, S. Chorny, O. Kovalyov, I. Mankovska

DOXORUBICIN-INDUCED ALTERATIONS IN PRO-AND ANTIOXIDANT BALANCE AND THEIR CORRECTION BY CURCUMIN IN THE NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES CULTURE

It was studied the effect of doxorubicin on the HIF system and the pro-antioxidant balance of neonatal cardiomyocytes as well as the possibility of the oxidative stress correcting using curcumin. It has been revealed that the expression of mRNA HIF-1 α using doxorubicin at a dose of 0,5 μ M was 2.9 ± 0.8 cu, so it decreased by 20% compared to control - 3.6 ± 0.7 cu ($P < 0.05$). The level of expression of the HIF target gene PDK-1 also significantly decreased (4 times). During the incubation with doxorubicin, the number of live cells decreased by 50,4% relative to control. And after using doxorubicin and curcumin together, the percentage of dead cells decreased by 7,7 compared to doxorubicin only. Doxorubicin intoxication led to a significant increase in the secondary products of lipid peroxidation (TBARS) in cardiomyocytes by 3.6 times and hydrogen peroxide by 64%. Prolonged incubation with doxorubicin reduced the enzymatic activity of Mn-SOD by 32%, while catalase activity increased by 72% compared to control. Adding of curcumin to the cardiomyocyte cell culture contributed to increasing of the Mn-SOD activity by 14%, catalase – by 23%. The level of TBARS increased by 1,4 times compared with the control, and the level of H_2O_2 increased by 20%. The joint use of doxorubicin and curcumin resulted in a significant reduction of free radical oxidation unlike effect of doxorubicin per se. Specifically, there was lessening of TBARS and H_2O_2 (at 56.7 and 18.4% respectively), while decreasing of the catalase hyperactivation (19%) and rising of the Mn-SOD activity (35%).

Key words: oxidative stress, cardiomyocytes, HIF-1 α , doxorubicin, curcumin.

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

REFERENCES

1. Cadenas E, Davis KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and ageing. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29: 222–30.

2. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals and apoptosis. *Semin. Med. Genet.* 2001; 106:62-70.

3. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int J Hematol.* 2012; 95:457–63.

4. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Review Cell Death and Differ.* 2008; 15: 621–27

5. Lee K, Qian D, Rey S, Wei H, Liu J, Semenza G. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(7):2353-8.

6. Chen TH, Yang YC, Wang JC, Wang JJ. Curcumin treatment protects against renal ischemia and reperfusion injury-induced cardiac dysfunction and myocardial injury. *Transplant Proc.* 2013; 45(10):3546-9.

7. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal B. Curcumin (diferuloylmethane) down regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69(1):195-206.

8. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kB proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Acta.* 2007; 1770:989-96.

9. Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, et al. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2012; 44: 73–7.

10. Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Zekry ZK, et al. The role of Curcuma longa against doxorubicin (adriamycin) - induced toxicity in rats. *J Med Food* 2009; 12: 394–402.

11. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method of determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry.* 1977; 66-8. [Russian].

12. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/ H_2O_2 /iodide system. *Eur. J. Biochem.* 1984; 141: 69-74.

13. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247(10): 3170-5.

14. Koroljuk M, Ivanov L, Mayorov I, Tokarev V. Method for determination of catalase activity. *Lab. Business.* 1988; 1:16-9 [Russian].

15. Linnik O, Drevytska T, Chornii S, Dosenko V, Mankovska I. Effect of doxorubicin on the culture of isolated neonatal rats cardiomyocytes. *Bulletin VNMU.* 2014; 2(18):383-7. [Ukrainian].

16. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006; 3:177–85.

17. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nature Reviews. Clinical Oncology.* 2012; 9:378-90.

18. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M. Anthracy-

- cline Inhibits Recruitment of Hypoxia-inducible Transcription Factors and Suppresses Tumor Cell Migration and Cardiac Angiogenic Response in the Host. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(42):34866-82.
19. Hyunsung Choi, Yang-Sook Chun, Seung-Won Kim, Myung-Suk Kim, and Jong-Wan Park. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol.* 2006; 70:1664–71.
20. Menshchikova E, Zenkov N. Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes. *Adv. Mod. Biol.* 1993; 113 (4):442-53. [Russian].
21. Sazontova T, Anchishkin N, Zhukov A. Role of reactive oxygen species and redox signaling in adapting to change of the oxygen content. *Fiziol. Zh.* 2008; 54 (2):18-32. [Russian].
22. Wang J, Ma J, Giffard R. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.* 2005; 38(8):1112-8.
23. Srivastav G and Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 14: 22–7.
24. Grisham M, McCord J. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor A, Matalon S, Ward P, editors. *Physiology of oxygen radicals.* Bethesda: Am Physiol Soc; 1986. pp. 1–18.
25. Appiah R, Commandeur JN, Vermeulen NP. Inhibition of human recombinant cytochrome P₄₅₀s by curcumin and curcumin decomposition products. *Toxicology.* 2007; 235:83–91.
26. Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:568–80.
27. Miriyala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P. Cardioprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:359–77.
28. Cremers NA, Lundvig DM, vanDalen SC, Schelbergen RF, vanLent PL, Szarek WA, Regan RF, Carels CE, Wagener FA. Curcumin-induced heme oxygenase-1 expression prevents H₂O₂-induced cell death in wild type and heme oxygenase-2 knockout adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int J MolSci.* 2014; 8;15(10):17974-99.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.02.2015*

Особливості адаптаційних реакцій чоловіків за умов силових навантажень

А.А. Чернозуб

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

Вивчали особливості адаптаційних реакцій організму людини в умовах силових навантажень різного обсягу та інтенсивності та чіткого розуміння закономірностей змін концентрації тестостерону в сироватці крові в процесі занять фітнесом. Встановлено, що підвищення концентрації тестостерону в сироватці крові нетренованих юнаків (в межах від 1,6 до 23,2%, $P < 0,05$) після фізичних навантажень порівняно зі станом спокою – відбувається у відповідь на силову роботу високої інтенсивності. Водночас використання в процесі тренувань силових навантажень середньої інтенсивності і з великим обсягом роботи сприяє зниженню концентрації досліджуваного гормону на 14,3% ($P < 0,05$). При цьому в процесі тривалого періоду тренувань спостерігали суттєве вірогідне підвищення показників максимальної м'язової сили на 32,5% у осіб контрольної та 53,1% у юнаків дослідної груп. Таким чином, досліджені адаптаційні зміни в процесі тривалих занять силовим фітнесом характеризуються зниженням темпів підвищення показників м'язової сили та обхватних розмірів тіла юнаків обох груп в порівнянні з вихідними значеннями, які були встановлені після першого місяця тренувань, внаслідок зростання рівня резистентності організму до фізичних навантажень. Одночасно виявлено, що гормональна відповідь на гостре тренування стає більш вираженою з кожним наступним місяцем занять силовим фітнесом тільки за умов використання під час тренувального заняття фізичних навантажень високої інтенсивності при малому обсязі роботи.
Ключові слова: концентрація тестостерону в сироватці крові; режими тренувальних навантажень; адаптаційні реакції; тренувальний процес; силовий фітнес.

ВСТУП

Гормональні зміни, які виникають в процесі рухової активності під впливом тренувальних навантажень, підкреслюють важливу роль ендокринної системи в метаболічних потребах організму, що виникають в умовах напруженої м'язової діяльності різної направленості [1, 2]. Зміни функціональної активності окремих ендокринних залоз (відповідно – концентрації в сироватці крові продукованих ними гормонів) виявляють певну залежність від тривалості виконання вправи, обсягу та інтенсивності тренувальної роботи, величини навантаження, а також рівня тренуваності організму людини [3, 4].

У силовому тренуванні основна роль стероїдного гормону тестостерону полягає

© А.А. Чернозуб

в індукції синтезу скорочувальних білків у м'язах, що піддаються фізичному навантаженню. Крім того, в період інтенсивних занять силовими вправами, він потрібний для мобілізації функціональних можливостей організму [5].

Зазвичай під час фізичних навантажень секреторна функція залоз-продуцентів анаболічних гормонів посилюється, що супроводжується стимулюванням процесів енергозабезпечення і фізичної працездатності організму. Водночас використання спортсменами (переважно професійними культуристами) в процесі інтенсивного силового тренування великої кількості повторень при низькій потужності часто викликає стійке зниження концентрації тестостерону в сироватці крові [6]. Можливо, що ці зміни пов'язані зі вто-

мою, що розвивається ще до реального зниження працездатності спортсмена [7].

Відсутність чіткого розуміння закономірностей змін концентрації тестостерону в сироватці крові нетренованих юнаків і специфіки адаптаційних реакцій їх організму до силових навантажень різного рівня інтенсивності та обсягу роботи, виключає наукове обґрунтування тренувального процесу, особливо в умовах занять силовим фітнесом. Останнє ініціює вкрай важливу проблему щодо з'ясування впливу змін концентрації цього гормону в крові в процесі тривалих силових тренувань на характер адаптаційних реакцій в організмі нетренованих юнаків, а також в отриманні інформації про надмірні тренувальні навантаження та можливість визначення безпечних меж величини фізичних навантажень.

Метою нашої роботи було визначити особливості змін концентрації тестостерону в сироватці крові нетренованих юнаків в умовах силового фітнесу та з'ясування ступеня їх впливу на адаптаційні зміни в організмі.

МЕТОДИКА

Обстежено 40 юнаків віком від 20 до 21 року фізично здорових, які не мають високого рівня резистентності до силових навантажень. Було створено дві групи, контрольну та дослідну.

Юнаки впродовж 3 міс тренувань з періодичністю два заняття на тиждень як модель м'язової діяльності використовували фізичні навантаження, які переважно складають основу силового фітнесу. Обстежувані контрольної групи виконували: 4 серії (сети) силових вправ із 8 повторень в кожному; інтервал відпочинку між серіями становив $60 \pm 3,8$ с; темп виконання вправи середній ($2/3 - 3$ с триває концентрична фаза руху, а 3 с – ексцентрична); вправи виконували з повною амплітудою; маса обтяження снаряда (штанги, гантелей) за цих умов становила близько 80-82% від максимальної (маса

снаряда з яким можна виконати лише одне повторення – 1 ПМ). Обстежувані дослідної групи виконували тренувальні навантаження наступного характеру: силові вправи – 4 серії з 4 повтореннями з інтервалом відпочинку 1 хв; темп виконання вправи дуже повільний ($3/6 - 3$ с у концентричному режимі, а 6 с – в ексцентричному); вправи виконували з частковою амплітудою (90% від максимальної); маса обтяження снаряда сягала 65-68% від максимальної. Загальна тривалість окремого тренувального заняття для представників кожної з груп становила $30 \pm 1,1$ хв.

Всі юнаки, які брали участь у дослідженні, попередньо пройшли повний медичний огляд і комплексний лабораторний контроль (9 показників), за результатами яких не мали медичних протипоказань для участі в експерименті.

Силові навантаження оцінювали за компонентами тренувальної роботи, які використовуються як інформативні показники в процесі занять силовим фітнесом. Для цієї мети застосовували метод визначення індексу тренувального навантаження [8]. Реєстрували параметри максимальної м'язової сили учасників у тестових вправах, розраховували показники навантаження: коефіцієнт зовнішнього опору (R_a), відносну вагу обтяження (W_a), значення силового навантаження (W_n), індекс тренувального навантаження (ITNA). Контроль досліджуваних показників проводили 4 рази з інтервалом в один місяць протягом 3-місячних занять силовим фітнесом. З аналогічним інтервалом у процесі дослідження контролювали динаміку показників антропометрії (обхватні розміри тіла).

Лабораторні дослідження сироватки крові відносно концентрації тестостерону проводили 4 рази протягом 3 міс тренувань з інтервалом в один місяць. Кожного разу при щомісячному контролі було проведено по два забори крові: до навантаження (у стані спокою) і відразу після закінчення тренувального заняття. Концентрацію тестостерону в сироватці крові визначали

методом імуноферментного аналізу в умовах сертифікованої медичної лабораторії.

Матеріали досліджень піддавали статистичній обробці з використанням пакету програм «Statistika» в системі «Microsoft Excel-2010» Були використані методи параметричної статистики для визначення середнього арифметичного, стандартної помилки середнього. Рівень вірогідності визначали за допомогою парного двовибіркового t-тесту для середніх.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів показників силового навантаження досліджень (табл. 1) вказує на наявність їх залежності від структури тренувального заняття та режиму фізичних навантажень (моделі тренувальної діяльності). Так, для контролю достовірності умов проведення експерименту, показники R_a (відображає рівень інтенсивності фізичного навантаження залежно від структури тренування та умов її проведення) і ITNA (відображає поріг стомлення організму спортсменів у процесі силових навантажень) – не змінювали своїх значень.

Протягом усього періоду досліджень значення W_a , що відображає найбільш адекватний функціональним можливостям організму маси снаряда в заданих характеристиках силового навантаження, демонструють позитивну динаміку як серед представників контрольної (від +17,83 до +7,10%), так і дослідної (від 26,92 до 9,04%) груп ($P < 0,05$). Однак стрімке підвищення значень цього показника за перший місяць тренувань, з кожним наступним місяцем занять силовим фітнесом стає менш вираженими, що свідчить про можливу адаптації організму юнаків до силових навантажень такого характеру.

Майже подібну тенденцію до змін було встановлено під час контролю значень показника W_p . Він відображає обсяг виконаної роботи за одиницю часу з урахуванням особливостей структури тренувального заняття і характеру силових навантажень. Встановлено, що у юнаків контрольної групи він на 68,6% ($P < 0,05$) вищий порівняно зі значеннями у осіб дослідної групи. Ця обставина вказує на досить істотний вплив умов тренувальної діяльності на різницю в обсязі виконаної роботи учасниками дос-

Таблиця 1. Значення параметрів силових навантажень, які використовували учасники досліджуваних груп протягом тривалих занять силовим фітнесом ($M \pm m$, $n=40$)

Показники	Вихідні значення	Після місяців тренувань		
		першого	другого	третього
Режим навантаження, ум.од				
контроль	0,64±0,01	0,64±0,01	0,64±0,01	0,64±0,01
дослід	0,71±0,01	0,71±0,01	0,71±0,01	0,71±0,01
Відносна вага обтяження, кг				
контроль	40,48±0,46	47,70±0,51*	53,80±0,49*	57,62±0,66*
дослід	45,02±0,34	57,14±0,51*	66,13±0,49*	72,11±1,04*
Індекс тренувального навантаження, ум.од.				
контроль	0,71±0,01	0,71±0,01	0,71±0,01	0,71±0,01
дослід	0,87±0,01	0,87±0,01	0,87±0,01	0,87±0,01
Силове навантаження, кг/хв				
контроль	506,01±8,66	596,25±7,27*	672,50±8,31*	720,25±6,54*
дослід	300,13±8,23	380,93±4,67*	440,86±5,81*	480,73±6,33*

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 * $P < 0,05$, в порівнянні з показниками попереднього місяця

ліджень, незважаючи на те, що вихідний рівень розвитку максимальної м'язової сили практично ідентичний серед юнаків обох груп.

У табл. 2 представлено значення показників контрольного тестування розвитку м'язової сили (1 ПМ, кг), які встановлені протягом тривалого (3 міс) періоду занять силовим фітнесом. У процесі тренувань у юнаків обох груп спостерігали позитивну динаміку морфофункціональних показників. Так, у осіб контрольної і дослідної груп в процесі тривалих занять силовим фітнесом було встановлено, що показники м'язової сили підвищилися на 32,5 і 53,1 % відповідно ($P<0,05$) щодо вихідних значень. При цьому позитивну тенденцію підвищення морфометричних показників учасників обох нетренованих груп представлено в табл. 3. Так, у групі юнаків, які використовували в процесі тренувань навантаження великої інтенсивності (дослідна група), виявлено підвищення досліджуваного показника на 7,0% ($P<0,05$), а серед осіб контрольної групи – лише на 4,5% ($P<0,05$).

Таким чином, аналіз результатів вказує на те, що силові навантаження високої

інтенсивності при малому її обсязі, використовувані під час тренувань юнаками дослідної групи, сприяють більш вираженій зміні значень морфофункціональних показників у порівнянні з контролем.

У табл. 4 представлено результати контролю концентрації тестостерону в сироватці крові нетренованих юнаків у спокої (до навантаження) та після тренувального заняття з використанням різних режимів навантаження в процесі тривалих занять силовим фітнесом. Слід відмітити, що після силового навантаження середньої інтенсивності з великим обсягом тренувальної роботи (див. табл. 4), концентрація тестостерону в сироватці крові юнаків контрольної групи демонструє зниження на 11,2% ($P<0,05$). У свою чергу силові навантаження високої інтенсивності при незначному її обсязі, що використовуються в процесі тренувального заняття юнаками дослідної групи, не викликають гормональної відповіді контрольованого показника на цьому етапі дослідження. Концентрація тестостерону в сироватці крові знижується в умовах збільшення обсягу роботи на протилежному інтенсивності тренувань, що є ознакою

Таблиця 2. Динаміка показників максимальної м'язової сили учасників досліджуваних груп в умовах тривалих занять силовим фітнесом ($M\pm m, n=40$)

Тренувальні вправи, 1 ПМ, кг	Етапи контролю			
	Вихідні значення	Після місяців тренувань		
		Першого	Другого	Третього
Жим лежачи				
контроль	62,50±1,72	73,00±1,72*	85,50±2,38*	91,00±2,80*
дослід	61,00±1,91	73,50±1,85*	85,00±1,99*	94,50±2,17*
Жим ногами				
контроль	116,25±4,00	145,25±5,28*	171,75±6,68*	188,25±7,19*
дослід	126,00±6,33	171,00±6,59*	205,00±6,33*	224,50±6,10*
Тяга за голову				
контроль	65,50±1,45	72,00±1,17*	78,00±1,28*	80,75±1,32*
дослід	59,75±1,56	69,00±1,56*	77,00±1,38*	83,25±1,27*
Молотки				
контроль	27,00±0,49	30,40±0,45*	33,80±0,54*	35,40±0,67*
дослід	26,40±0,45	30,20±0,61*	33,60±0,54*	37,00±0,57*

синдрому перетренованості [4].

Таким чином, на основі аналізу отриманих результатів та огляду літературних даних [2, 7, 9] можна припустити, що такий протилежний характер гормонального відповіді зумовлений вираженим стомленням, яке розвивалося під час заняття, а також низьким рівнем тренуваності юнаків або недостатньою адаптацією їх організму до цього виду стресу.

По закінченні першого місяця занять силовим фітнесом зміна концентрації тестостерону в сироватці крові учасників груп має різноспрямовану тенденцію у відповідь на силові навантаження різного характеру. Так, у юнаків контрольної групи при середній ($Ra=0,64$ ум.од) інтенсивності фізичного навантаження і великому обсязі роботи ($Wn=596,25$ кг/хв) спостерігається зниження концентрації тестостерону в сироватці крові на

13,4% ($P<0,05$). Разом з цим у осіб дослідної групи в умовах використання під час занять показників високої інтенсивності фізичного навантаження ($Ra=0,71$ ум.од.) і малого обсягу роботи ($Wn=380,93$ кг/хв) вміст гормону в крові збільшується на 9,9% ($P<0,05$) порівняно зі станом спокою. При цьому вірогідно збільшувалися показники максимальної м'язової сили та обхватних розмірів тіла у юнаків обох груп, що практично неможливо при стані перенапруги або перетренованості [4].

Після другого місяця систематичних занять силовим фітнесом виявлено, що характер і ступінь змін вмісту гормону в крові після гострого силового навантаження в середньому по групі практично аналогічні результатам, отриманим місяць тому. Однак у юнаків дослідної групи ці показники демонструють більш виражену динаміку. У свою чергу на тлі незначного зни-

Таблиця 3. Динаміка показників обхватних розмірів тіла учасників досліджуваних груп в умовах тривалих занять силовим фітнесом ($M\pm m$, $n=40$)

Обхватні розміри тіла, см	Етапи контролю			
	Вихідні значення	Після місяців тренувань		
		Першого	Другого	Третього
Грудної клітки				
контроль	101,90±1,29	103,75±1,35*	105,15±1,41*	105,98±1,41*
дослід	100,93±0,79	103,40±0,53*	104,93±0,45*	106,70±0,37*
Плеча				
контроль	32,83±0,33	33,53±0,38*	34,08±0,39*	34,48±0,40*
дослід	33,00±0,37	34,15±0,44*	34,93±0,42*	35,65±0,42*
Передпліччя				
контроль	26,20±0,18	27,00±0,20*	27,63±0,20*	28,00±0,22*
дослід	25,70±0,15	26,80±0,16*	27,70±0,19*	28,60±0,24*
Ший				
контроль	36,68±0,28	37,70±0,35*	38,35±0,34*	38,80±0,35*
дослід	37,25±0,20	38,30±0,17*	38,98±0,20*	39,48±0,25*
Стегна				
контроль	52,73±0,78	53,63±0,70*	54,00±0,66*	54,40±0,62*
дослід	54,43±0,51	56,00±0,56*	57,35±0,58*	57,90±0,58*
Гомілки				
контроль	35,98±0,42	36,53±0,39*	36,75±0,37*	36,83±0,37*
дослід	36,68±0,42	37,48±0,47*	38,00±0,48*	38,35±0,47*

ження темпів зростання морфофункціональних показників учасників обох груп значення силового навантаження продовжують збільшуватися, але з менш вираженою прогресією.

Результати досліджень, які встановлені в обох групах після 3-го місяця тренувань, демонструють аналогічну тенденцію динаміки, яку спостерігали після 2-го місяця експерименту, але знову з більш вираженою зміною концентрації тестостерону в сироватці крові юнаків дослідної групи після навантажень порівняно зі станом спокою.

В цілому, аналіз результатів вказує на те, що незважаючи на зниження (у контрольній групі) або підвищення (в дослідній групі) концентрації тестостерону в сироватці крові у відповідь на силові навантаження різного характеру в процесі тренувального заняття, спостерігається суттєве підвищення максимальної м'язової сили на 32,5% ($P<0,05$) у осіб контрольної та 53,1% ($P<0,05$) у юнаків дослідної груп протягом 3 міс занять силовим фітнесом. Водночас спостерігали незначну позитивну тенденцію підвищення обхватних розмірів тіла на 4,6% ($P<0,05$) у осіб контрольної групи та 6,7% ($P<0,05$) – дослідної. При цьому концентрація тестостерону в сироватці крові,

досліджена протягом усього періоду експерименту, демонструє тенденцію до підвищення у представників контрольної групи на 10,4% ($P<0,05$). Водночас у юнаків дослідної групи спостерігали її зниження на 11,7% ($P<0,05$) в стані спокою протягом 3 міс занять силовим фітнесом. Виявлений факт, можливо, зумовлений різним значенням обсягу та інтенсивності виконаної тренувальної роботи [1, 10, 11].

Таким чином, результати дослідження характеру і ступеня гормональної відповіді на гостре силове навантаження в процесі 3-місячних занять силовим фітнесом показали, що використання під час тренувань малої кількості повторень (4 рази в окремому сеті) з масою обтяження снаряда 65% від 1 ПМ при високій інтенсивності ($Ra=0,71$ ум.од.) і малому обсязі роботи (силове навантаження коливається в межах від 380 до 480 кг/хв) – призводить до підвищення (від 1,65 до 23,1%; $P<0,05$) концентрації тестостерону в сироватці крові порівняно зі станом спокою (до навантаження). У свою чергу, використовуючи під час силових навантажень середню кількість повторень (8 разів у сеті) з масою обтяження снаряда 82 – 85% від 1 ПМ при середній інтенсивності ($Ra=0,64$ ум.од.) і

Таблиця 4. Концентрація тестостерону (нмоль/л) у сироватці крові нетренованих юнаків обох дослідних груп в умовах тривалого періоду тренувань силовим фітнесом (n=40).

Етапи контролю	Концентрація тестостерону		Різниця, %	P
	До навантажень	Після навантажень		
На початку досліджень				
контроль	15,98±0,42	14,19±0,26	-11,2	<0,05
дослід	17,56±0,93	17,85±1,03	+1,6	>0,05
Після 1-го місяця тренувань				
контроль	16,29±0,37	14,11±0,51	-13,4	<0,05
дослід	16,66±0,91	18,31±0,53	+9,9	<0,05
Після 2-го місяця тренувань				
контроль	17,11±0,66	14,89±0,49	-12,97	<0,05
дослід	15,97±0,71	18,79±0,78	+17,6	<0,05
Після 3-го місяця тренувань				
контроль	17,64±0,76	15,11±0,62	-14,3	<0,05
дослід	15,51±0,69	19,11±0,64	+23,2	<0,05

великому обсязі роботи (від 596 до 720 кг/хв), спостерігали зниження концентрації досліджуваного гормону на 11,2 та 14,3% ($P<0,05$). Концентрація тестостерону до і після силового навантаження не виходила за межі фізіологічної норми.

Результати дослідження динаміки вмісту тестостерону в крові нетрениваних юнаків в умовах силових навантажень різного обсягу та інтенсивності свідчать про прояв достатньо не однотипної гормональної відповіді, встановленої протягом усього періоду досліджень. Підвищення цього показника відбувається у відповідь на силові навантаження високої інтенсивності при малому обсязі роботи. Водночас використання в процесі тривалих тренувань силових навантажень середньої інтенсивності з великим обсягом роботи сприяють зниженню концентрації досліджуваного гормону після тренувального заняття порівняно зі станом спокою. При цьому спостерігається протилежна динаміка базального вмісту тестостерону.

Таким чином, досліджені адаптаційні зміни в процесі тривалих занять силовим фітнесом характеризуються наявністю зниження темпів підвищення показників м'язової сили та обхватних розмірів тіла юнаків обох груп в щодо вихідних значень, які були встановлені після першого місяця тренувань, внаслідок зростання рівня резистентності організму до фізичних навантажень. Одночасно виявлено, що гормональна відповідь на гострі силові навантаження стає більш вираженою з кожним наступним місяцем занять силовим фітнесом тільки за умов використання під час тренувального заняття фізичних навантажень високої інтенсивності при малому обсязі роботи.

А.А. Чернозуб

ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ МУЖЧИН В УСЛОВИЯХ СИЛОВОГО ФИТНЕСА

Изучали особенности адаптационных реакций организма человека в условиях силовых нагрузок различного объема

и интенсивности и четкого понимания закономерностей изменений концентрации тестостерона в сыворотке крови в процессе занятий силовым фитнесом. Установлено, что повышение концентрации тестостерона в сыворотке крови нетренированных юношей (в пределах от 1,6 до 23,2%; $P<0,05$) после физических нагрузок по сравнению с состоянием покоя происходит в ответ на силовые нагрузки высокой интенсивности. В то же время использование в процессе тренировок силовых нагрузок средней интенсивности и с большим объемом работы – способствует снижению концентрации исследуемого гормона на 14,3% ($P<0,05$). При этом в процессе длительного периода тренировок, наблюдали существенное достоверное повышение максимальной мышечной силы на 32,5% у лиц контрольной и 53,1% – исследовательской групп. Таким образом, изученные адаптационные изменения в процессе длительных занятий силовым фитнесом характеризуются наличием снижением темпов роста показателей мышечной силы и обхватных размеров тела юношей обеих групп по сравнению с исходными значениями, которые были установлены после первого месяца тренировок, в результате роста уровня резистентности организма к физическим нагрузкам. Одновременно установлено, что гормональный ответ на острые силовые нагрузки становится более выраженным с каждым последующим месяцем занятий силовым фитнесом только в условиях использования во время тренировочного занятия физических нагрузок высокой интенсивности при малом объеме работы.

Ключевые слова: концентрация тестостерона в сыворотке крови; режимы тренировочных нагрузок; адаптационные реакции; тренировочный процесс; силовой фитнес.

A.A. Chernozub

FEATURES OF ADAPTIVE REACTIONS IN HUMANS UNDER POWER FITNESS

We studied the features of adaptive reactions of human body under conditions of power loads of different volume and intensity. It was found that an increase in the testosterone concentration in blood plasma of untrained young men to 23,2% ($P<0,05$) after exercise, compared with the state of rest takes place in response to the high power loads intensity. At the same time, medium intensity work with large amount of workload reduced the concentration of these hormones by 14,3% ($P<0,05$). During long-time training an increase in maximum parameters of muscle force (by 32.5% in control and 53,1% in test group) was observed. Thus, adaptive changes in the process of sustained power fitness are characterized by a slowdown of muscle strength and body size in both groups compared with baseline values, which were established after the first month of training. At the same time it was found that the hormonal response to acute power load becomes more pronounced with each subsequent month of classes in fitness force only under the conditions of use during the training sessions of high-intensity physical exercise for a small amount of work.

Keywords: concentration of testosterone in the blood serum; modes of training; loads; adaptive response; the training process; power fitness.

Chernomorsk State University named after P.Mogila, Nikolayev.

REFERENCES

1. Charro MA. Hormonal, metabolic and perceptual responses to different resistance training systems. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010; 50 (2) : 229-34.
2. Crewther B. The salivary testosterone and cortisol response to three loading schemes. *J Strength Cond Res*. 2008; 22 (1): 250-5.
3. Durand RJ. Hormonal responses from concentric and eccentric muscle contractions. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35 (6): 937-43.
4. Fry AC. Acute testosterone and cortisol responses to high power resistance exercise. *Hum Physiol*. 2010; 36 (4): 102-26.
5. Goto K, Ishii N, Kizuka R, Kraemer R. Hormonal and metabolic responses to slow movement resistance exercise with different durations of concentric and eccentric actions. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106 (5): P. 731-9.
6. Kraemer RR, Hollander DB, Reeves GV, Ramadan ZG. Similar hormonal responses to concentric and eccentric muscle actions using relative loading. *Eur J Appl Physiol*. 2006; 96 (5): 551-7.
7. Major RW, Pierides M, Squire IB, Roberts E. Bodybuilding, exogenous testosterone use and myocardial infarction. *QJM Advance Access published*. – 2014; 3:173.
8. Chernozub AA. Method of determining the index of training load in athleticism. Pat. UA 76705 U, MPK A61B 5/22 (2006.01), № u201208376. (rus)
9. Bosco C, Colli R, Bonomi R, Duvillard, SP, Viru, A. Monitoring of strength training: neuromuscular and hormonal profile. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000; 32: 202-8.
10. Seynnes OR, Kamandulis S, Kairaitis R. Effect of androgenic-anabolic steroids and heavy strength training on patellar tendon morphological and mechanical properties. *J Appl Physiol*. 2013; 115 (1): 84-9.
11. Wahl P, Mathes S, Köhler S, Mester J. Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different endurance training protocols. *Horm Metab Res*. 2013; 45 (11): 827-33.

*Матеріал надійшов
до редакції 28.05.2015*

Гліциновий рецептор: молекулярна організація і патології

Г.В. Малєєва^{1,2}, П.Д. Брежестовський¹

¹Інститут динаміки мозку, Університет Екс-Марсель, Марсель, Франція; ²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: galina_maleeva@ukr.net; piotr.brejestovski@univ-amu.fr

Гліциновий рецептор є аніонселективним каналом, що забезпечує швидку синаптичну передачу в центральній нервовій системі хребетних. Разом із ацетилхоліновим нікотинним, серотоніновим (5-НТ₃R) та рецептором гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК_A) він належить до родини цис-петельних пентамерних іонотропних рецепторів. В огляді відображено загальну картину, сформовану багаторічними дослідженнями, присвяченими гліциновому рецептору. Показано структуру й особливості субдинічної організації рецептора, розглянуто можливі причини гіперплексії – нейрологічного захворювання, пов'язаного з дисфункцією гліцинових рецепторів.

Ключові слова: синаптична передача; цис-петельні рецептори; аніонселективні канали; гіперплексія.

ВСТУП

Гліцин – найпростіша амінокислота біологічних організмів. Окрім основної ролі – будівельної «цеглинки» білкових макромолекул, гліцин виконує ще одну надзвичайно важливу функцію – є нейротрансмітером у синапсах нервової системи. Завдяки дослідженням, проведеним у 60–70-х роках минулого століття було доведено, що в нервовій системі хребетних швидка гальмівна передача забезпечується двома основними системами: ГАМК- та гліцинергічною. У першій нейропередавачем виступає гамма-аміномасляна кислота, у другій – гліцин. Іонотропні ГАМК_A-рецептори знаходяться переважно в синапсах головного мозку, в той час як гліцинові – в спинному мозку і стовбурі мозку. В деяких ділянках нервової системи ці рецептори колокалізовані [1, 2]. Більше того, ГАМК і гліцин можуть входити до складу однієї синаптичної везикули [2] і одночасно виділятися із пресинаптичного закінчення [3].

Фізіологічні функції гліцинергічної системи дуже різноманітні: від контролю мотор-

© Г.В. Малєєва, П.Д. Брежестовський

ної діяльності і генерації ритму до обробки сенсорної інформації. Основною функцією є передача гальмівних імпульсів у спинному мозку, що забезпечує швидку регуляцію моторної діяльності [4]. Функціонування гліцинових рецепторів залежить від місця їх локалізації в нервовій системі, субдинічного складу, регуляції вторинними посередниками (протеїнкінази, фосфатази, іони кальцію), а також від концентрації іонів хлору у внутрішньоклітинному та позаклітинному середовищах [5, 6].

В огляді представлені дані, що висвітлюють структуру гліцинових рецепторів, їх архітектуру і субдинічний склад, а також патологічні наслідки, зумовлені порушеннями молекулярної організації цих рецепторів.

Структура гліцинового рецептора

Гліциновий рецептор входить до складу родини цис-петельних лігандкерованих іонотропних каналів, до якої також відносяться нікотинний ацетилхоліновий (nAChR), серотоніновий (5-НТ₃) і ГАМК_A-рецептори [7]. Дані досліджень останніх років свідчать,

що вони широко розповсюджені серед біологічних організмів – від одноклітинних, молюсків, комах і до ссавців [8, 9]. Лігандкеровані іонні канали являють собою гомо- і гетеромерні ансамблі з 5 білкових субодиниць, що формують центральну пору каналу [10–12]. Всі вони мають спільні риси будови: довгий зовнішньоклітинний N-термінальний домен, що складається з понад 200 амінокислот, чотири трансмембранні домени (TM1–TM4), з'єднані петлями різної довжини (цитоплазматична петля, що з'єднує TM3- і TM4-домени нараховує майже 100 амінокислотних залишків), і коротку позаклітинну C-терміналь. N-термінальний домен кожної субодиниці має консервативну ділянку з 13 амінокислот, обмежених цистеїнами, що знаходиться між лігандзв'язувальним і трансмембранними доменами білкової субодиниці. З'єднуючись ковалентно, цистеїни формують цис-петлю, що й дало назву відповідній родині. Характерною особливістю гліцинового рецептора є наявність двох цис-петель у зовнішньоклітинному домені.

Розуміння молекулярної структури цис-петельних каналів значно розширилося завдяки важливим даним, що були отримані за останні роки. По-перше, відкриття ацетилхолінзв'язувального білка (АХЗБ) прісноводного молюска *Lymnaea satagnalis* і отримання його кристалічної структури з роздільною здатністю $2,7 \cdot 10^{-10}$ м [16]. Хоч цей білок і не асоційований з іонним каналом, він являє собою пентамер, схожий за своєю будовою із зовнішньоклітинним макромолекулярним лігандзв'язувальним кластером, що утворений N-кінцями nAHP і гліцинового рецепторів. Це дало змогу використати структуру АХЗБ для гомологічного моделювання рецепторних центрів всієї родини цис-петельних каналів. По-друге, встановлення структури ацетилхолінового каналу *Torpedo* з роздільною здатністю $4 \cdot 10^{-10}$ м [12] допомогло уточнити топологію цис-петельних каналів і встановити локалізацію значної кількості їх структурних компонентів.

По-третє, визначення з високим розділенням ($1,94 \cdot 10^{-10}$ м), кристалічної структури зовнішньоклітинного домену $\alpha 1$ -субодиниці nAHP миші, зв'язаного з α -бунгаротоксином [17], відкрило деталі молекулярної організації цієї ділянки АХР. І, по-четверте, отримання кристалічної структури двох прокаріотних каналів, що є гомологічними із цис-петельними рецепторами. Канал ELIC (від англ. pentameric ligand-gated ion channel), з бактерії *Erwinia chrysanthemi*, було кристалізовано в закритому стані, що дало змогу з'ясувати його структуру при розділенні $3,3 \cdot 10^{-10}$ м [18]. Кристалічна структура каналу GLIC, виділеного з бактерії *Gleobacter violaceus*, була визначена у відкритому стані з розділенням $2,9 \cdot 10^{-10}$ м [19]. Припущення щодо молекулярних особливостей конформаційних змін, котрі призводять до відкривання іонних пор, базуються на порівнянні цих двох каналів. Зупинимось дещо докладніше на їх архітектурно-функціональній організації.

Кінець N-термінального домену кожної субодиниці являє собою α -спіраль, за якою йде серія з 10 β -складчастих структур (β -листів). Вони формують дві гідрофобні зони, що утворюють сайт зв'язування агоніста. Консервативна цис-петля, яка входить до складу цього домену, а також петля, що зв'язує β -листи 2 і 3, вигинаються в бік трансмембранних доменів і, ймовірно, відповідають за передачу інформації від лігандзв'язувального сайту до каналактивуючих воріт, що містяться в порі [16, 20, 21]. У формуванні лігандзв'язувального сайту беруть участь центральні ділянки N-термінальних доменів двох сусідніх субодиниць, а саме А-С «головної» (або «+») субодиниці і D-F петлі «комплементарної» (або «-») субодиниці [22]. Ці петлі є лінкерними ділянками, що поєднують β -складчасті структури між собою. В момент зв'язування агоніста з рецептором аміногрупа ліганду взаємодіє із залишком фенілаланіну 159 В-петлі (триптофан 149 у випадку nAHP) за

механізмом катіон-π взаємодії [23]. Це призводить до фіксування агоніста в місці його зв'язування, переміщення цис-петлі і петлі, що з'єднує β-складчасті структури 1 і 2 в напрямку трансмембранних доменів і до їх взаємодії з TM2-TM3 лінкером [16, 24]. Таке переміщення здатне викликати конформаційні зміни інших доменів рецептора, зокрема TM2, котрий формує іонну пору.

Чотири трансмембранні домени субодиноць гліцинового рецептора представлені α- спіралями, що пронизують біліпідну мембрану. П'ять субодиноць, з яких складається рецептор, зорієнтовані таким чином, що їх TM2-домени утворюють іонселективну пору, а TM1-, TM3- і TM4-домени її оточують і взаємодіють з ліпідами цитоплазматичної мембрани [24]. У центрі кожного TM2-домени α спіраль перегинається, таким чином різні ділянки каналу мають різну ширину. В зоні перегину розміщені два гідрофобні кільця, утворені 9'-лейцинами і 13'-валінами, котрі, ймовірно, формують головні каналні ворота [24]. Згідно з моделлю Унвіна, відкриття іонного каналу запускається поворотом TM2- доменів та подальшою дестабілізацією гідрофобних взаємодій в каналних воротах. Ця модель базується на аналізі зображень nACh-рецептора електричного органа морського ската *Torpedo*, отриманих з допомогою електронного мікроскопа, з розділенням $4 \cdot 10^{-10}$ м [11, 12]. Спираючись на результати аналізу кристалічної структури прокаріотних іонних каналів (аналогічних цис-петельним каналам еукаріот) GLIC [17] і ELIC [18, 25] було запропоновано іншу модель, згідно з якою під час активації рецептора, TM2 – TM3-петля зміщується назовні і тягне за собою TM2-домени. Це призводить до узгодженого переміщення доменів TM2 і TM3 і супроводжується зміною їх нахилу та збільшенням діаметра пори з $2 \cdot 10^{-10}$ до $12 \cdot 10^{-10}$ м [20]. При цьому залишки кисню нижнього кільця глутаматів TM2-домени з'являються всередині каналу, динамічно формуючи його катіонну вибірковість. Однак

ця модель заснована на порівнянні структури різних каналів: ELIC – в закритому, GLIC – у відкритому станах і потребує подальшого уточнення. Більш детально архітектура і молекулярні моделі відкриття цис-петельних каналів представлені в оглядах [21, 22, 26].

Субодиноці гліцинового рецептора

Білок гліцинового рецептора уперше було біохімічно очищено зі спинного мозку щура, з використанням афінної хроматографії та високовибіркового антагоніста гліцинового рецептора – стрихніну [27]. Було виявлено три білки з молекулярною масою 49, 58 та 93 кДа, з яких перші два було ідентифіковано як α1 та β-субодиноці, гомологічні відповідним субодиноцям інших представників родини цис-петельних рецепторів. В подальших експериментах продемонстровано, що білок, молекулярна маса якого становить 93 кДа, специфічно зв'язується з β-субодиноцею і тубуліном, відіграючи, таким чином, головну роль у кластеризації гліцинових рецепторів [28]. Він отримав назву геферин.

З мозку ссавців виділено і клоновано чотири підтипи α-субодиноці гліцинового рецептора (α1, α2, α3, α4), котрі на 90 % гомологічні між собою [29], і β-субодиноцею, що має 47 % гомології із α1 [30]. Аналогічний набір субодиноць характерний для нервової системи риби зебри *Danio rerio* [31–33]. Субодиноці гліцинового рецептора було виявлено в усіх відділах її центральної нервової системи (ЦНС), і їх розподілення загалом схоже з тим, що було отримане на ссавцях [34].

α1-, α2-, α3-Субодиноці, на відміну від β-субодиноці, можуть формувати функціональні як гомомерні, так і гетеромерні (в комбінації з β-субодиноцею) рецептори [35, 36]. Важливою властивістю β-субодиноці є наявність у цитоплазматичному домені ділянки зв'язування з геферином – адапторним білком, головне завдання якого – забезпечення постсинаптичної кластеризації гліцинових рецепторів [37–39].

Властивості гомомерних і гетеромерних рецепторів дещо відрізняються. Встановлено, що провідність гомомерних рецепторів приблизно в 2 рази більше (80–100 пС), ніж гетеромерних (40–50 пС) [35]. Гомомерні рецептори високочутливі до блокувальної дії пікротоксину (ефективна доза 10 мкмоль/л), а чутливість гетеромерних α/β -рецепторів до цього блокатора в 100–500 разів менша [40, 41]. Це зумовлено відмінностями в амінокислотному складі доменів, що формують іонопровідний канал [42, 43].

За допомогою методу *in situ* гібридизації було показано, що для кожної субодиниці характерне специфічне місце локалізації в спинному мозку, стовбурі мозку і певних зонах головного мозку [44]. У ЦНС дорослих ссавців переважає $\alpha 1$ -субодиниця. Рівень її експресії достатньо високий у ядрах стовбура мозку, спинному мозку, таламусі і гіпоталамусі. Переважна синаптична локалізація $\alpha 1$ свідчить про формування гетеромерних α/β -рецепторів, оскільки саме β -субодиниця відповідає за синаптичне «заякорення» гліцинових рецепторів [37, 45, 46].

У період ембріонального розвитку $\alpha 2$ – найбільш поширена субодиниця гліцинового рецептора в ЦНС [44, 47]. Висока чутливість більшості ембріональних $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів до пікротоксину [48, 49] і висока провідність [50] свідчать про їх переважну гомомерність. Однак через три тижні після народження рівень експресії $\alpha 2$ -субодиниці різко знижується, а її локалізація набуває синаптичного характеру. В дорослому організмі більшість гліцинових рецепторів сформовані $\alpha 1$ -субодиницями, $\alpha 2$ була виявлена лише в сітківці [51], ядрі нюхового аналізатора та деяких зонах головного мозку [44]. Варто відмітити, що цей рецептор не є критично необхідним для нормального функціонування ЦНС, оскільки нокаут гена $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора не змінює поведінкових реакцій фенотипу [52].

Для $\alpha 3$ - і $\alpha 1$ -субодиниць характерна

подібна динаміка рівнів експресії, проте за кількісним показником $\alpha 1$ -рецептори значно переважають над $\alpha 3$ -гліциновими рецепторами [46]. Локалізація $\alpha 3$ -субодиниці була підтверджена в кількох зонах ЦНС, однак найбільш детально її поширення було вивчено в сітківці [53] і ноцицептивних нейронах I і II шарів задніх рогів спинного мозку (колокалізація з геферином говорить про синаптичне розташування) [54]. Субодиниця $\alpha 4$ -гліцинового рецептора поки що мало вивчена. Була показана її локалізація в спинному мозку, дорсальних гангліях, симпатичних гангліях курчат [55] і сітківці ока мишей [56].

За умови коекспресії α - і β -субодиниць формуються гетеромерні гліцинові рецептори. Стехіометрія такого рецептора довго залишалася спірною і нині остаточно не визначена. Певний час загальноприйнятою була комбінація $3\alpha:2\beta$ [57]. Більш пізніми дослідженнями, з використанням мутантних і радіоактивно мічених α - і β -субодиниць, було показано, що поєднання $2\alpha:3\beta$ є більш імовірним [58]. На його користь також свідчать досліди, виконані із застосуванням скануючої атомно-силової мікроскопії, в яких було проаналізовано число специфічних антитіл, котрі зв'язалися з гліциновим рецептором [59]. Однак в іншій праці, базованій на методі ступінчастого фотознебарвлення поодиноких молекул, отримано підтвердження поєднання $3\alpha:2\beta$ [60].

Як уже відмічалось раніше, однією із ключових властивостей β -субодиниці є її здатність зв'язуватися з білком геферином, котрий відповідає за формування кластерів гліцинових та деяких ГАМК-рецепторів у синаптичних мембранах [61]. Це – ще одне підтвердження того, що синаптичні гліцинові рецептори є гетеромерами. Окрім того, β -субодиниця, а точніше її ТМ2-сегмент, виступає детермінантом стійкості до пікротоксину [40, 43].

Таким чином, встановлено існування 5 субодиниць гліцинового рецептора: чотирьох

α і однієї β , що можуть формувати як гомомерні, так і гетеромерні рецептори. Таке різноманіття субодиночного складу дає змогу гліциновим рецепторам брати участь у широкому спектрі процесів, що відбуваються в нервовій системі хребетних. Оскільки різні підтипи рецепторів відрізняються фізіологічними характеристиками, мають відмінності в локалізації, а рівні їх експресії змінюються незалежно один від одного у процесі розвитку, вони можуть забезпечувати високоефективне функціонування специфічної системи контролю нейронних мереж організму.

Гіперплексія

Уперше гіперплексію описав у 1878 р. американський невролог Джордж Берд, спостерігаючи пацієнта зі спільноти франко-канадських лісників. Він назвав його «стрибаючим французом» (“jumping frenchmen”)[62]. Подальші дослідження показали, що гіперплексія – спадкове захворювання, яке фенотипово проявляється у вигляді сильно перебільшеної реакції на неочікувані акустичні і тактильні стимули [63]. Підвищення тону м’язів, що при цьому спостерігається, може призвести до неконтрольованого падіння і нападу задухи. Класичний напад гіперплексії супроводжується зажмурюванням очей, підніманням вигнутих рук над головою та згинанням шиї, тулуба, ліктів, стегон і колін. Під час нападу хворі перебувають у повній свідомості, що дає змогу чітко відрізнити гіперплексію та епілепсію [64].

Причини цього рідкісного спадкового захворювання були невідомі до 1993 р., тоді вперше було встановлено мутацію $\alpha 1$ -субодиночного гліцинового рецептора, яка була характерною для пацієнтів із вищеописаними симптомами [65]. Нині доведено, що гіперплексія виникає внаслідок мутацій не лише *GLRA1* (хоча ураження саме цього гена найчастіше стає причиною хвороби), але і *GLRB* [66, 67] та *SLC6A5*, що кодує пресинаптичний транспортер гліцину другого типу [68,

69]. Крім того, було виявлено, що мутації геферину та колібістину, білків, що забезпечують кластеризацію гліцинових рецепторів у постсинапсі, також можуть бути причиною гіперплексії [70, 71].

Мутації $\alpha 1$ -субодиночного гліцинового рецептора можна поділити на кілька груп. До першої відносяться missense-мутації, в результаті яких заміна одного нуклеотиду призводить до заміни амінокислоти; до другої групи належать nonsense-мутації, коли заміна нуклеотиду спричинює блокування синтезу білка; до третьої – deletion – випадіння значних ділянок нуклеотидної послідовності. Мутації можуть мати як рецесивний (більшість із них), так і домінуючий тип успадкування. Залежно від цього, вони формують кілька груп з досить чітко окресленими характеристиками і дають можливість передбачати наслідки конкретної мутації.

Missense-мутації гліцинового рецептора мають як аутосомний домінуючий, так і рецесивний характер. Більшість досліджень підтверджують високу сконцентрованість цього типу мутацій у *TM2* $\alpha 1$ -субодиночного гліцинового рецептора – при цьому кількість експресованих на поверхні клітини гліцинових рецепторів не зменшується, однак спостерігається порушення їх роботи – нестабільність закритого стану каналу, зниження чутливості до гліцину. Nonsense-мутації та делеції формують групу аутосомних рецесивних мутацій і спричинюють зниження кількості гліцинових рецепторів на поверхні клітини, однак варто підкреслити, що нормальний домінуючий алель здатний частково це компенсувати, окрім того, цей тип мутацій не має переважного місця локалізації [72].

Розглянемо більш детально механізми, за якими мутації $\alpha 1$ -субодиночного гліцинового рецептора можуть спричинювати порушення гліцинергічної передачі. Насамперед це спонтанна активність гліцинових рецепторів, що є наслідком аутосомно домінуючих missense-мутацій (Y128C [73], Q226E, V280M, R414H [74]). Заміна амінокислоти Q на E у локусі 226, розмі-

шеному на верхівці TM1-домену призводить до підсилення електростатичної взаємодії із R271, на верхівці TM2-домену сусідньої субодиниці і, як наслідок, збільшення просвіту закритого стану каналу [75]. Мутація V280M, що розміщується у TM2-TM3-петлі, призводить до підвищення чутливості до гліцину та спонтанної активації каналу, імовірно, внаслідок конформаційних змін TM-доменів, які уможливають віддалення TM2 від центру каналу і збільшення просвіту каналу неактивованого рецептора [75]. Заміни Y128C, що входить до складу одного з β -листіків зовнішнього домену, і R414H (TM4-домен) спричиняють неспецифічні структурні зміни. Вони відповідають за спонтанну активність гліцинового рецептора [66], яка призводить до того, що іони хлору, постійно надходячи до клітини, зміщують свій рівноважний потенціал у бік більш позитивних значень, а отже, знижується амплітуда струму та ефективність гальмівної гліцинергічної передачі. Наступний крок розвитку патології у цьому разі – формування хронічної деполяризації та підвищення частоти генерації потенціалів дії.

До механізмів формування гіперплексичного фенотипу також відносяться порушення відкриття каналу гліцинового рецептора. R271Q та R271L, розташовані на зовнішньоклітинному кінці TM2-домену, є найбільш частими та найбільш вивченими гіперплексичними мутаціями. Вони успадковуються аутосомно домінантно [65, 77–79]. Ці мутації не змінюють кількість гліцинових рецепторів на поверхні клітини, однак сильно впливають на їх чутливість до гліцину та провідність каналів [81, 82, 90]. Вірогідно, зниження провідності каналів пов'язане зі зникненням позитивно зарядженого залишку, при заміні R271 на Q, чи L, а отже, порушенням здатності пори накопичувати негативно заряджені іони хлору [72, 83]. Окрім того, важливе значення має локалізація R271 – поряд із TM2-TM3-петлею, яка відіграє ключову роль у відкритті

каналу, забезпечуючи передавання сигналу від сайту зв'язування гліцину до сайту, відповідального за безпосереднє відкриття каналу. Ймовірно, інші мутації, локалізовані в цій петлі (K276E/Q та Y279C/S), діють за таким самим механізмом [81, 84, 85]. Певну роль у порушенні відкриття гліцинового каналу можуть відігравати такі мутації: Q266H [86], T265I, S267N [66, 87], V260M [88].

Пришвидження десенситизації гліцинових рецепторів також може впливати на формування гіперплексичного фенотипу. Показано, що мутація P250T (у TM1–TM2-петлі) [89] спричинює нестабільність відкритого стану каналу і, як наслідок, швидку десенситизацію рецептора [90]. Мутація P230S (TM1-домен), окрім прискорення десенситизації, призводить до зниження амплітуди струму та чутливості до гліцину [73].

Як уже зазначалося вище, синаптичні $\alpha 1$ -гліцинові рецептори формують гетеромери із β -субодиницею, що забезпечує їх кластеризацію та мембранне «заякорювання». Це дало змогу припустити, що мутації β -субодиниці можуть бути певною мірою причетними до розвитку гіперплексії. Зареєстровано одну аутосомну домінантну мутацію Y470C [66] та значну кількість аутосомних рецесивних мутацій. Більшість з них (наприклад E24X, R50X, M177R, G229D) розміщені у зовнішньоклітинному домені *GLRB*, однак трансмембранні домени (S321F) та TM2–TM3-петля (W310C, R450X) також можуть містити гіперплексичні мутації. Головними наслідками згаданих амінокислотних замін у β -субодиниці є порушення мембранної експресії гетеромерних гліцинових рецепторів або зниження чутливості рецептора до агоніста [66, 67]. Також було виявлено одну *de novo*-мутацію L285R, яка провокує спонтанну активність каналу при експресії із нормальними $\alpha 1$ -субодиницями гліцинового рецептора [66]. Цей амінокислотний залишок розташовується в позиції 9' TM2-домену [12] і являє собою консервативний гідрофобний лейцин, заміна якого порушує стабільність закритого стану каналу.

Третя, найбільш поширена причина гіперплексії – мутації Na^+/Cl^- -залежного транспортера гліцину (GlyT2), котрий забезпечує накопичення нейротрансмітера в пресинаптичному закінченні. Мутації транспортера загалом унеможливають ефективну гліцинергічну передачу внаслідок зниження концентрації нейромедіатора у пресинаптичному закінченні. Окрім того, було зафіксовано мутації, що мають більш специфічний механізм реалізації. Заміна Y337X спричинює розривання GlyT2 у місці певної амінокислотної послідовності і, відповідно, повну відсутність функціональних транспортерів у пресинаптичній мембрані [91]. Для білків із замінами E248K та S513I характерне нормальне мембранне вбудовування, однак зменшення спорідненості до гліцину та Na^+ відповідно; мутація A257T знижує спорідненість як до гліцину, так і до Na^+ ; Y656H та G657A впливають на катіон- π взаємодії всередині білкової молекули, змінюючи її конформацію [92].

Таким чином, гіперплексія являє собою досить рідкісне нейрологічне захворювання, викликане мутаціями генів, що кодують білки гліцинергічної системи: $\alpha 1$ -та β -субодиниць гліцинового рецептора, пресинаптичного транспортера гліцину та постсинаптичних «заякорюючих» протеїнів геферину та колібістину. Нині найбільш ефективний засіб терапії гіперплексії – клонозепам, що забезпечує потенціацію ГАМК-рецепторів. Активізація ГАМКергічної системи гальмування компенсує порушення роботи гліцинергічної, однак не може повністю її замінити. Дослідження генетики гіперплексії спрямовані на розробку більш специфічних та ефективних засобів лікування цього захворювання.

ВИСНОВКИ

Гліциновий рецептор, що відноситься до родини цис-петельних іонотропних рецепторів, є ключовим елементом системи інгібіторного

контролю моторних нейронів, що забезпечує виконання складних і точних рухів.

Гліцинові рецептори мають досить різноманітний субодиничний склад, що дає їм змогу брати участь у широкому спектрі фізіологічних процесів. $\alpha 1$ - та β -Субодиниці гліцинового рецептора відіграють провідну роль у формуванні системи швидкого гальмування.

Гіперплексія – нейрологічне захворювання, що характеризується порушенням роботи гліцинергічної системи і проявляється у вигляді неконтрольованих рухів у відповідь на неочікувані стимули. Більшість зафіксованих випадків гіперплексії спричинені амінокислотними замінами, або повним випадінням певних послідовностей у $\alpha 1$ -, β -субодиницях рецептора чи Na^+/Cl^- -залежному везикулярному транспортері гліцину, що унеможливають ефективне функціонування цих білків.

Г. В. Малєєва, П. Д. Брежєстєвський

ГЛИЦИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ПАТОЛОГИЯ

Глициновый рецептор является анион-селективным каналом, обеспечивающим быструю синаптическую передачу в центральной нервной системе позвоночных. Вместе с ацетилхолиновым никотиновым, гамма-аминомасляным (ГАМК_A) и серотониновым (5-HT₃R), он принадлежит к семейству цис-петельных пентамерных ионотропных рецепторов. В обзоре описана общая картина, сформированная многолетними исследованиями, посвященными глициновому рецептору. Показана структура и особенности субъединичной организации рецептора, рассмотрены возможные причины гиперплексии – нейрологического заболевания, связанного с дисфункцией глицинового рецептора.

Ключевые слова: синаптическая передача; цис-петельные рецепторы; анион-селективные каналы; гиперплексия.

Maleeva G., Bregestovski P.

GLYCINE RECEPTOR: MOLECULAR ORGANIZATION AND PATHOLOGY

Glycine receptor is the anion-selective channel, providing fast synaptic transmission in the central nervous system of vertebrates. Together with the nicotinic acetylcholine, GABA and

serotonin (5-HT₃R) receptors, it belongs to the superfamily of pentameric cys-loop receptors. In this review we briefly describe main functions of these transmembrane proteins, their distribution and molecular architecture. Special attention is paid to recent studies on the molecular physiology of these receptors, as well as on presenting of molecular domains responsible for their dysfunction.

Key words: cys-loop receptors; anion-selective channels; hyperekplexia; inhibitory synaptic transmission.

Brain Dynamic Institute, Aix-Marseille University, Marseille, France;

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

REFERENCES

- Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy JM. Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABA_A-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res.* 1994;642:59–69.
- Vesselkin NP, Rio JP, Adanina VO, Repérant J. GABA- and glycine-immunoreactive terminals contacting motoneurons in lamprey spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 2000;19:69–80.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science.* 1998;281:419–24.
- Dutertre S, Becker CM, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* 2012;287:40216–23.
- Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse *Cell Mol life Sci.* 2001;58:760–93.
- Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004;84:1051–95.
- Miller PS, Smart TG. Binding, activation and modulation of cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:161–74.
- Kehoe J, Buldakova S, Acher F, Dent J, Bregestovski P, Bradley J. Aplysia cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity. *J Mol Evol.* 2009;69:125–41.
- Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol.* 2005;6:R4.
- Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:102–14.
- Unwin N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 2003;555:91–5.
- Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 2005;346:967–89.
- Moss SJ, Smart TG. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:240–50.
- Taly A, Corringer PJ, Grunnter T, Prado de Carvalho L, Karplus M, Changeux JP. Implications of the quaternary twist allosteric model for physiology and pathology of nicotinic acetylcholine receptors. *Prot Natl Acad Sci USA* 2006. 103:16965–70.
- Rajendra S, Schofield R. Molecular mechanisms of inherited startle syndrome. *Trends Neurosci.* 1995;18:80–2.
- Brejč K, Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* 2001;411:269–76.
- Dellisanti CD, Yao Y, Stroud JC, Wang ZZ, Chen L. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat Neurosci.* 2007;10:953–62.
- Hilf RJ, Dutzler R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature.* 2008;452:375–9.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature.* 2009;457:111–4.
- Corringer PJ, Poitevin F, Prevost MS, Sauguet L, Delarue M, Changeux JP. Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. *Structure.* 2012;20:941–56.
- Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des.* 2007;13:2350–67.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:431–58.
- Pless SA, Millen KS, Hanek AP, Lynch JW, Lester HA, Lummis SC, Dougherty DA. A cation-π interaction in the binding site of the glycine receptor is mediated by a phenylalanine residue. *J Neurosci.* 2008;28:10937–42.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* 2003;423:949–55.
- Hilf RJ, Dutzler R. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature.* 2009;457:115–8.
- Bregestovski P. Architecture of receptor-operated ion channels of biological membranes. *Biophysics (Oxf).* 2011;56:51–64.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem.* 1982;257:9389–93.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H. The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem.* 1991;266:22242–5.
- Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H. Molecular cloning of the antagonist-binding subunit of the glycine receptor. *J Recept Res.* 1988;8:183–93.
- Grenningloh G, Schmieden V, Schofield PR, Seeburg PH, Siddique T, Mohandas TK, Becker C., Betz H. Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J.* 1990;9:771–6.

31. David-Watine B, Goblet C, De Saint Jan D, Fucile S, Devignot V, Bregestovski P, Korn H. Cloning, expression and electrophysiological characterization of glycine receptor alpha subunit from zebrafish. *Neuroscien*. 1999;90:303–17.
32. Devignot V, Prado de Carvalho L, Bregestovski P, Goblet C. A novel glycine receptor α Z1 subunit variant in the zebrafish brain. *Neuroscience*. 2003;122:449–57.
33. Imboden M, De Saint Jan D, Leulier F, Korn H, Goblet C, Bregestovski P. Isolation and characterization of an alpha 2-type zebrafish glycine receptor subunit. *Neuroscience*. 2001;103:799–810.
34. Imboden M, Devignot V, Goblet C. Phylogenetic relationships and chromosomal location of five distinct glycine receptor subunit genes in the teleost *Danio rerio*. *Dev Genes Evol*. 2001;211:415–22.
35. Bormann J, Rundström N, Betz H, Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and heterooligomers. *EMBO J*. 1994;13:1493.
36. Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*. 1990;4:963–70.
37. Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor subunit. *Neuron*. 1995;15:563–72.
38. Kirsch J, Betz H. The postsynaptic protein gephyrin localization is regulated of the glycine receptor-associated by the cytoskeleton. *J Neurosci*. 1995;75:4148–56.
39. Kneussel M, Betz H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol*. 2000;525:1–9.
40. Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H, Pribilla I. The atypical M2 segment of the subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J*. 1992;11:4305–11.
41. Lynch JW, Rajenda S, Barry PH, Schofield P. Mutations affecting the glycine agonist transduction mechanism convert the competitive antagonist, picrotoxin into an allosteric potentiator. *J Biol Chem*. 1995;270:13799–806.
42. Yang Z, Cromer BA, Harvey RJ, Parker MW, Lynch JW. A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem*. 2007;103:580–9.
43. Zhorov BS, Bregestovski PD. Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. *Biophys J*. 2000;78:1786–803.
44. Malosio M, Marqueze B, Pouey A, Kuhse J, Betz H. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J*. 1991;10:2401–9.
45. Kim EY, Schrader N, Vannier C. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *EMBO J*. 2006;25:1385–95.
46. Bedet C, Bruusgaard JC, Groth-Pedersen L, Eimer S, Triller A, Vannier C. Regulation of gephyrin assembly and glycine receptor synaptic stability. *J Biol Chem*. 2006;281:30046–56.
47. Watanabe E, Akagi H. Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord. *Neurosci Res*. 1995;23:377–82.
48. Kungel M, Friauf E. Physiology and pharmacology of native glycine receptors in developing rat auditory brainstem neurons. *Brain Res Dev*. 1997;102:157–65.
49. Wang F, Xiao C, Ye JH. Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurones in ventral tegmental area of young rats. *J Physiol*. 2005;2:503–16.
50. Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron*. 1992;9:1155–61.
51. Veruki ML, Gill SB, Hartveit E. Spontaneous IPSCs and glycine receptors with slow kinetics in wide-field amacrine cells in the mature rat retina. *J Physiol*. 2007;581:203–19.
52. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56:303–9.
53. Haverkamp S, Müller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit. *J Comp Neurol*. 2003;465:524–39.
54. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfner DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 2004;304:884–7.
55. Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H. Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci*. 2000;12:994–1001.
56. Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the α 4 subunit. *J Comp Neurol*. 2007;500:693–707.
57. Burzomato V, Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG. Single-channel behavior of heteromeric alpha1beta glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J Neurosci*. 2004;24:10924–40.
58. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*. 2005;45:727–39.
59. Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW. Stoichiometry and subunit arrangement of α 1 β glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 2012;51:5229–31.
60. Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent JA. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci*. 2012;32:12915–20.
61. Kneussel M, Betz H. Clustering of inhibitory neurotrans-

- mitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci.* 2000;23:429–35.
62. Andermann F, Keene DL, Andermann E, Quesney LF. Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome. *Brain.* 1980;103:985–97.
 63. Lanska DJ. The history of movement disorders. In: Fingers, Boller F, Tyler K, eds. *Handbook of clinical neurology.* Elsevier B.V. 2010.
 64. Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA. Startle syndromes. *Lancet Neurol.* 2006;5:513–24.
 65. Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn A, O'Connell P, Wasmuth J. Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Genet.* 1993;5:351–8.
 66. Chung SK, Bode A, Cushion TD, Thomas RH, Hunt C, Wood SE, Pickrell WO, Drew CJ, Yamashita S, Shiang R, Leiz S, Longardt AC, Raile V, Weschke B, Puri RD, Verma IC, Harvey RJ, Ratnasinge DD, Parker M, Rittey C, Masri A, Lingappa L, Howell OW, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Lynch JW, Rees MI. GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet.* 2013;22:927–40.
 67. Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet.* 2002;11:853–60.
 68. Gimenez C, Perez-Siles G, Martinez-Villarreal J, Arribas-Gonzalez E, Jimenez E, Nunez E, de Juan-Sanz J, Fernandez-Sanchez E, Garcia-Tardon N, Ibanez I, Romanelli V, Nevado J, James VM, Topf M, Chung SK, Thomas RH, Desviat LR, Aragon C, Zafra F, Rees MI, Lapunzina P, Harvey RJ, Lopez-Corcuera B. A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *J Biol Chem.* 2012;287:28986–9002.
 69. Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R, Abbott KJ, Zuberi SM, Stephenson JB, Owen MJ, Tijssen MA, van den Maagdenberg AM, Smart TG, Supplisson S, Harvey RJ. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet.* 2006;38:801–6.
 70. Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, Hsu CC, Coleman SL, Miller J, Baer K, Waldvogel HJ, Gibbon F, Smart TG, Owen MJ, Harvey RJ, Snell RG. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem.* 2003;278:24688–96.
 71. Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Luscher B, Rees MI, Harvey RJ. The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci.* 2004;24:5816–26.
 72. Bode A, Lynch JW. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Molecular Brain.* 2014;7:2.
 73. Chung SK, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Robinson A, Hantke J, Hammond CL, Gilbert DF, Freilinger M, Ryan M, Kruer MC, Masri A, Gurses C, Ferrie C, Harvey K, Shiang R, Christodoulou J, Andermann F, Andermann E, Thomas RH, Harvey RJ, Lynch JW, Rees MI. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *J Neurosci.* 2010;30:9612–20.
 74. Bode A, Wood SE, Mullins JG, Keramidas A, Cushion TD, Thomas RH, Pickrell WO, Drew CJ, Masri A, Jones EA, Vassallo G, Born AP, Alehan F, Aharoni S, Bannasch G, Bartsch M, Kara B, Krause A, Karam EG, Matta S, Jain V, Mandel H, Freilinger M, Graham GE, Hobson E, Chatfield S, Vincent-Delorme C, Rahme JE, Afawi Z, Berkovic SF, Howell OW, Vanbellinghen JF, Rees MI, Chung SK, Lynch JW. New hyperekplexia mutations provide insight into glycine receptor assembly, trafficking, and activation mechanisms. *J Biol Chem.* 2013;288:33745–59.
 75. Rees MI, Andrew M, Jawad S, Owen MJ. Evidence for recessive as well as dominant forms of startle disease (hyperekplexia) caused by mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Hum Mol Genet.* 1994;3:2175–9.
 76. Laube B, Maskay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapse? *Trends in Pharmacol Sci.* 2002;23:519–27.
 77. Bode A, Lynch JW. Analysis of hyperekplexia mutations identifies transmembrane domain rearrangements that mediate glycine receptor activation. *J Biol Chem.* 2013;288:33760–71.
 78. Elmslie FV, Hutchings SM, Spencer V, Curtis A, Covanis T, Gardiner RM, Rees M. Analysis of GLRA1 in hereditary and sporadic hyperekplexia: a novel mutation in a family cosegregating for hyperekplexia and spastic paraparesis. *J Med Genet.* 1996;33:435–6.
 79. Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Fielder TJ, Allen RJ, Fryer A, Yamashita S, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutational analysis of familial and sporadic hyperekplexia. *Ann Neurol.* 1995;38:85–91.
 80. Langosch D, Laube B, Rundstrom N, Schmieden V, Bormann J, Betz H. Decreased agonist affinity and chloride conductance of mutant glycine receptors associated with human hereditary hyperekplexia. *EMBO J.* 1994;13:4223–8.
 81. Maksay G, Biro T, Laube B. Hyperekplexia mutation of glycine receptors: decreased gating efficacy with altered binding thermodynamics. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:285–8.
 82. Rajendra S, Lynch JW, Pierce KD, French CR, Barry PH, Schofield PR. Startle disease mutations reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:18739–42.
 83. Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;86:161–204.
 84. Lape R, Plested AJ, Moroni M, Colquhoun D, Sivilotti LG.

- The alpha1K276E startle disease mutation reveals multiple intermediate states in the gating of glycine receptors. *J Neurosci.* 2012;32:1336–52.
85. Lewis TM, Sivilotti LG, Colquhoun D, Gardiner RM, Schoepfer R, Rees M. Properties of human glycine receptors containing the hyperekplexia mutation alpha1(K276E), expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 1998;507(Pt 1):25–40.
86. Milani N, Dalpra L, del Prete A, Zanini R, Larizza L. A novel mutation (Gln266 -> His) in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine-receptor gene (GLRA1) in hereditary hyperekplexia. *Am J Hum Genet.* 1996;58:420–2.
87. Becker K, Breitinger HG, Humeny A, Meinck HM, Dietz B, Aksu F, Becker CM. The novel hyperekplexia allele GLRA1(S267N) affects the ethanol site of the glycine receptor. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:223–8.
88. del Giudice EM, Coppola G, Bellini G, Cirillo G, Scuccimarra G, Pascotto A. A mutation (V260M) in the middle of the M2 pore-lining domain of the glycine receptor causes hereditary hyperekplexia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:873–6.
89. Saul B, Kuner T, Sobetzko D, Brune W, Hanefeld F, Meinck HM, Becker CM. Novel GLRA1 missense mutation (P250T) in dominant hyperekplexia defines an intracellular determinant of glycine receptor channel gating. *J Neurosci.* 1999;19:869–7.
90. Breitinger HG, Lanig H, Vohwinkel C, Grewer C, Breitinger U, Clark T, Becker CM. Molecular dynamics simulation links conformation of a poreflanking region to hyperekplexia-related dysfunction of the inhibitory glycine receptor. *Chem Biol.* 2004;11:1339–50.
91. Eulenberg V, Armsen W, Betz H, Gomez J. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:325–33.
92. Carta E, Chung SK, James VM, Robinson A, Gill JL, Remy N, Vanbellinthen JF, Drew CJ, Cagdas S, Cameron D, Cowan FM, Del Toro M, Graham GE, Manzur AY, Masri A, Rivera S, Scalais E, Shiang R, Sinclair K, Stuart CA, Tijssen MA, Wise G, Zuberi SM, Harvey K, Pearce BR, Topf M, Thomas RH, Supplisson S, Rees MI, Harvey RJ. Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease. *J Biol Chem.* 2012;287:28975–85.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.09.2014*

CONTENTS

A.V. Kotsuruba, R.R. Sharipov, B.S. Kopyak, V.F. Sagach. Brain focal ischemia-reperfusion causes a decreased resistance of erythrocytes from venous blood to acid hemolysis, which is prevented by ecdysterone	3
O.I. Savchuk, M.O. Orlovsky, Ie.S. Iarmoliuk, S.V. Goncharov, V.E. Dosenko, G.G. Skibo. Proteasomal activity in brain tissue following ischemic stroke in wistar rats	11
D.S. Ziablitsev, O.S. Larin. Influence of single nucleotide polymorphisms of vitamin D receptor-gene on the level of osteoassociated hormones linkage with postmenopausal osteoporosis	21
A.G. Rodinsky, S.S. Tkachenko. Bioelectric activity of interneurons of spinal cord in the experimental menopause in femal rats	28
I.F.Labunets, S.A. Talanov, R.G. Vasilyev, A.E. Rodnichenko, N.A. Utko, I.A. Kyzminova, B.S.Kopjak, E.V. Podjachenko, V.F.Sagach, G.M. Butenko. Thymic hormones, antioxidant enzymes and neurogenesis of bulbus olfactorius in rats with hemi-parkinsonism: the effect of melatonin	35
R.V. Yanko. Morphofunctional state of the thyroid gland after exposure to melatonin	46
A.P. Lytvynenko, T. Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy. The role of no and mexidol in contractility of ovarian and cervical parts of uterus under the condition of immune-mediated injury in mice	52
A.S. Zherebiatiev, A.M. Kamyshny. Expression of receptor AHR and protein ATG1611 in experimental oxazolone-induced colitis in rats	57
V.R. Khairova, M.I. Safarov, A.I.Garayev. Dynamics of glutamine synthase activity in rat brain in prenatal hypoxia model	65
T.V. Ishchuk, O. M Savchuk, Ya.B. Raetska, V.V. Vereschaka, L.I. Ostapchenko. Functioning proteases in the esophagus mucosa after chemical burns	71
Лісцяха Л.М. Influence of intermittent normobaric hypoxia on the vegetative homeostasis in children from radioecologically affected regions	78
O. Linnik, T. Drevytska, O. Gonchar, S. Chorny, O. Kovalyov, I. Mankovska. Doxorubicin-induced alterations in pro- and antioxidant balance and their correction by curcumin in the neonatal rat cardiomyocytes culture	90
A. Chernozub. Features of adaptive reactions in humans under power fitness	99
REVIEWS	
G. Maleeva, P. Bregestovski. Glycine receptor: molecular organization and pathology	107