

Фізіологічний журнал

ТОМ 56 № 5 2010

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф.

Роль оксиду азоту у розвитку скоротливих реакцій міокарда тренуваних тварин . . . 3

Войтичук О.І., Асмолова В.С., Гула Н.М., Оз М., Шуба Я.М. Вплив N-стеароїл-
та N-олеоїлетаноламіну на потенціалзалежні натрієві канали кардіоміоцитів 13

Тальнов А. М. Кореляція змін частоти гіпокампального θ -ритму з сигнальним
значенням звукових стимулів, прихованими періодами та тривалістю умовно-
рефлекторних пересувань у щурів 23

Melnick I.V. Electrically silent neurons in substantia gelatinosa of the rat spinal cord 34

Берегова Т.В., Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Єщенко В.А. Вміст цинку та секреторного
матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі . . 40

Лаповець Н.Є. Цитокіновий спектр сироватки крові при запальних процесах у
черевній порожнині 45

Попова Л.Д., Васильєва І.М. Дослідження вмісту тестостерону
та тиреоїдних гормонів у плазмі крові щурів із субмісивним та агресивним
типами поведінки 49

Воронич С.М., Павликівська Б.М., Воронич-Семченко Н.М. Фізіологічні аспекти
аналізу показників варіабельності серцевого ритму підлітків
із латентним гіпотиреозом 53

Коряк Ю.А. Нервно-мышечные ответы трехглавой мышцы голени
на продолжительное пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы
у человека в условиях механической разгрузки 62

Бродяк І.В., Гнатюш А.Р., Сибірна Н.О. Морфологічна характеристика
плазматичних мембран лімфоцитів за умов експериментального цукрового
діабету на тлі впливу L-аргініну та аміногуанідину 77

Чуян О.М., Бірюкова О.О., Равасва М.Ю. Вплив керованого дихання з індивідуально
підбраною частотою на показники варіабельності ритму серця 86

ОГЛЯДИ

<i>Федоренко О.А., Марченко С.М.</i> Спонтанно активні іонні канали мембран ядерної оболонки	95
<i>Сукманський О.І., Дрогомирецька М.С., Деньга О.В., Сукманський І.О.</i> Роль глікозаміногліканів у патогенезі атеросклерозу	106
<i>Dyugovskays L., Polyakov A.</i> Neutrophil apoptosis and hypoxia	115

Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

Роль оксиду азоту у розвитку скоротливих реакцій міокарда тренуваних тварин

Оксид азоту синтезується в значних кількостях у тренуваних тварин. Він покращує як процеси вазодилатації, так скоротливу та насосну функцію серця. Залишається нез'ясованим його вплив на реакції серця у відповідь на навантаження об'ємом і кальцієм, що спостерігається при тривалих фізичних навантаженнях. В експериментах на ізольованому за методом Лангендорфа серці щурів покращувався функціональний стан серця як наслідок адаптації протягом 4 тиж до навантаження плаванням, що проявлялось у збільшенні скоротливої активності міокарда на 20 % і коронарного потоку (з $12,0 \pm 0,8$ до $16,0 \text{ мл/хв} \pm 1,5 \text{ мл/хв}$), зменшенні частоти серцевих скорочень, а також збільшенні функціональних резервів серця. При однаковому розтягуванні лівого шлуночка серця тренуваних щурів відповідали більш потужною силою скорочення. Вперше встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій серця тренуваних щурів був достовірно вищий, ніж у контрольних тварин ($-176,5 \pm 8,4$ та $-156 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$ відповідно), що свідчить про збільшення спряження окисного фосфорилування. Курс тренування плаванням запобігав швидкому росту кінцево-діастолічного тиску та появі аритмій при відтворенні моделі кальцієвого перевантаження (CaCl_2 від 1,7 до 12,5 ммоль/л). У тренуваних тварин відмічали відкриття мітохондріальних пор при більш високих концентраціях кальцію у перфузійному розчині. Показано, що адаптація до фізичного навантаження та збільшення резервів серця зумовлені впливом оксиду азоту, блокада синтезу якого за допомогою L-NAME (10^{-4} моль/л) усувала вказані адаптаційні зміни.

Ключові слова: оксид азоту, ізольоване серце, фізичне тренування плаванням, крива Франка–Старлінга, перевантаження кальцієм.

ВСТУП

Тренованість, що розвивається внаслідок регулярних фізичних навантажень, передбачає складний комплекс перебудови всіх систем організму і забезпечує можливість виконання інтенсивної фізичної роботи протягом тривалого часу. Така перебудова стосується насамперед серцево-судинної системи і спрямована на посилення кровопостачання працюючих м'язів, в яких спостерігається збільшення кровотоку в декілька разів. Останнє в свою чергу забезпечується значним зростанням насосної та скоротливої функції серця, а також вазодилатацією судин скелетних м'язів. Робоча гіперемія, як відомо, пов'язана зі збільшенням синтезу оксиду азоту в ендоте-

ліальних клітинах судин [31, 36], про що свідчить значне підвищення активності NO-синтази (NOS) в скелетних м'язах [30, 36] і судинах тренуваних тварин [1]. Синтез оксиду азоту у таких тварин відбувається не тільки внаслідок посилення активності NOS, а також і експресії різних ізоформ NO-синтаз [37].

Підвищений синтез оксиду азоту впливає і на скоротливу активність кардіоміоцитів [18]. Покращення функціонального стану міокарда у тренуваних організмів значною мірою забезпечується саме змінами на клітинному рівні, які супроводжуються збільшенням сили та швидкості скорочень кардіоміоцитів. Останнє зумовлено прискоренням кальцієвих транзєнтів та підвищенням чутливості міофіламентів

© Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

до іонів кальцію [22, 34]. Однак збільшення скоротливої активності міокарда у тренуваних організмів можливе лише за умов його енергетичного забезпечення. Така збільшена потреба клітин міокарда в енергії вирішується як внаслідок стимуляції розмноження мітохондрій [29], так і більш ефективного синтезу аденозинтрифосфату (АТФ). Вказані зміни функції мітохондрій в основному зумовлені здатністю того ж оксиду азоту, що синтезується в клітинах міокарда, пригнічувати відкривання мітохондріальних пор [7, 14, 15, 32] і покращувати функцію мітохондрій. Посилення скоротливої і насосної функції серця при фізичних навантаженнях також залежить від механізмів, що забезпечують збільшення серцевого викиду при зростанні притоку крові до серця. Попередні дані свідчать про можливу роль у цій реакції оксиду азоту [28].

Мета роботи полягала у з'ясуванні ролі оксиду азоту у розвитку скоротливих реакцій міокарда тренуваних тварин.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986). Тренування щурів відбувалося у резервуарі з водою при 30–32 °С протягом 4 тиж за схемою, що детально описана раніше [5]. Вивчали резервні можливості та зміни показників скоротливої активності і кисневого обміну міокарда, вивільнення у коронарний потік мітохондріального фактора при дії зростаючих концентрацій CaCl_2 у щурів у контрольних умовах і після дозованого фізичного навантаження плаванням на тлі блокади синтезу оксиду азоту і без неї.

Експерименти виконували на ізольованих серцях самців щурів лінії Вістар масою 300–350 г. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно (за методом Лангендорфа) в умовах постійного

тиску (75–80 мм рт. ст.) при 37 °С розчином Кребса–Хензеляйта такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; NaHCO_3 – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; CaCl_2 – 1,7. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95 % O_2 і 5 % CO_2). Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{лш}}$) та його першу похідну dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, „Elema”, Швеція) і реєстрували на комп'ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Значення коронарного потоку оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв.

Для виявлення функціональних резервів міокарда проводили дозоване додаткове розтягування балончика з кроком 34 мкл і будували криву Франка–Старлінга у контрольних і тренуваних щурів.

Щоб оцінити чутливість мітохондріальних пор до відкривання, в експериментах *in situ* відтворювали модель кальцієвого навантаження. У перфузійний розчин кожні 15 хв додавали CaCl_2 , концентрація якого протягом експерименту послідовно збільшувалася від 1,7 до 15 ммоль/л. У пробах розчину, який відтікав від серця кожні 15 хв, реєстрували мітохондріальний фактор [4]. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні хвиль 230–260 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46.

Для розрахунку споживання кисню міокардом за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 («Radiometer», Данія) реєстрували напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця. Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця (ІСФ – добуток $P_{\text{лш}}$ та частоти серцевих скорочень).

Синтез NO блокували L-NAME (N (G)-нітро-L-аргінін метил естер гідрохлорид, «Sigma») у дозі 10^{-4} моль/л, яким перфузували серця протягом 15 хв.

Виділення мітохондрій з тканин серця здійснювали за допомогою методу диференційного ультрацентрифугування [2]. Серця ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2–4 °C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g 8 хв (4 °C), супернатант – повторно при 11000 g 16 хв (4 °C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН 7,2–7,4 і одразу використовували в дослідах. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі.

Вимірювання мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій здійснювали методом, запропонованим Брандом [13, 27]. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило 120 ммоль/л KCl, 25 ммоль/л тріс-НСl, 3 ммоль/л $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_7$, 5 % знежиреного бичачого сироваткового альбуміну; рН 7,2–7,4. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану ТРМР⁺-селективним електродом (трифенілметилфосфоній) вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а роботу АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат Na (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою електрода Кларка та

газоаналізатора BMS 3 Mk-2 («Radiometer», Данія).

Мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [11].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Origin 6.1 з використанням методу різниць. Всі результати виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Навантаження щурів плаванням протягом 4 тиж поліпшувало функціональний стан їхнього серця (таблиця): істотно (на третину) збільшувався коронарний потік, підвищувалася скоротлива активність міокарда, достовірно зменшувалася частота серцевих скорочень.

При посиленій м'язовій роботі інотропні впливи на серце, що зумовлені ефектом Франка–Старлінга, відіграють провідну роль у інтенсифікації серцевої діяльності. Скорочення скелетних м'язів викликає періодичне стискання вен кінцівок, що призводить до збільшення венозного притоку внаслідок мобілізації резерву депонованої в них крові. В наших експериментах при додатковому розтягуванні лівого шлуночка серця тренуваних плаван-

Вплив тренування плаванням на показники функціонального стану серця щурів (M \pm m)

Показник	Контроль	Фізичне навантаження	Фізичне навантаження та введення L-NAME
Тиск, що розвивається у лівому шлуночку, мм рт.ст.	85,4 \pm 8,5	96,0 \pm 3,8	83,0 \pm 4,3
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	0,38 \pm 1,73	3,46 \pm 1,53	0,14 \pm 0,91
Швидкість скорочення міокарда, мм рт.ст./с	1559 \pm 127	1875 \pm 58*	1484 \pm 124 **
Швидкість розслаблення міокарда, мм рт.ст./с	1537 \pm 118	1895 \pm 103*	1520 \pm 140 **
Коронарний потік, мл/хв	12,0 \pm 0,8	16,0 \pm 1,5 *	10,3 \pm 1,0 **
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	217 \pm 11	183 \pm 10 *	220 \pm 10 **

* P < 0,05 відносно значення в контрольній групі; ** P < 0,05 відносно значення у групі тварин після курсу фізичних тренувань.

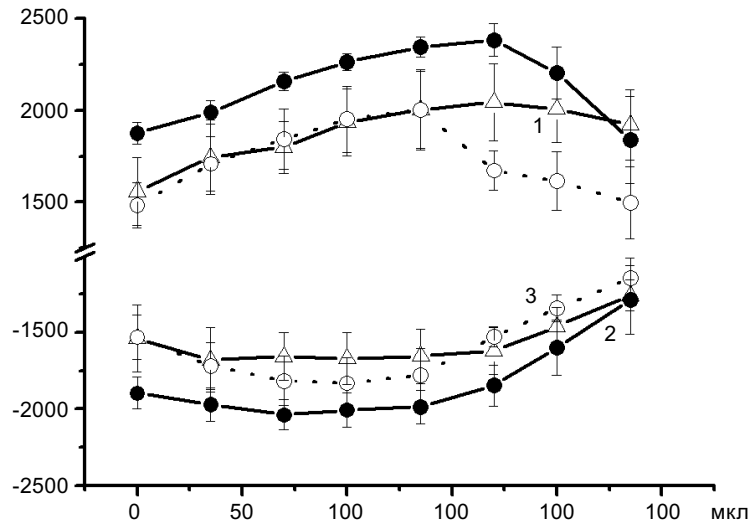


Рис. 1. Зміни скоротливої активності міокарда ($\pm dP/dt$) при дозованому збільшенні об'єму лівого шлуночка: 1 – контроль, 2 – треновані щури, 3 – треновані щури і введення L-NAME

ням щурів відповідали більш потужною силою скорочень і мали високу здатність до розслаблення в період діастолі. Це свідчило про великий функціональний потенціал сердець тренованих тварин, що, ймовірно, зумовлюється оптимізацією процесів регуляції обміну в міокарді (рис. 1).

Таким чином, тренування щурів плаванням протягом 4 тиж позитивно впливало на показники кардіодинаміки, що супроводжувалося підвищенням скоротливої активності серця, коронарного потоку та збільшенням його функціональних резервів.

Потужна робота серця потребує великих енергетичних витрат. Для порівняння ефективності роботи дихального ланцюга у контрольних і тренованих тварин реєстрували рівень мембранного потенціалу та поглинання кисню у суспензії мітохондрій серця. Встановлено, що в умовах блокади АТФ-синтази та максимальної швидкості дихання мембранний потенціал у суспензії мітохондрій серця тренованих щурів становив $-176,5 \text{ мВ} \pm 8,4 \text{ мВ}$ і був достовірно вищим, ніж у суспензії мітохондрій, ізольованих із сердець контрольних тварин ($\Delta\psi_m = -156,5 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$, $P < 0,05$; рис. 2). Аналогічний характер змін мембранного потенціалу спостерігали при дослідженні

суспензії мітохондрій печінки: $\Delta\psi_m = -172,0 \pm 7,0 \text{ мВ}$ щодо $-150,0 \text{ мВ} \pm 7,4 \text{ мВ}$ у контролі, $P < 0,05$. Таким чином, навантаження щурів плаванням протягом 4 тиж мало системний адаптаційний ефект.

Підвищений порівняно з контрольним мембранний потенціал у мітохондріях серця тренованих плаванням щурів свідчив про ефективне функціонування дихального ланцюга, підвищене спряження окисного

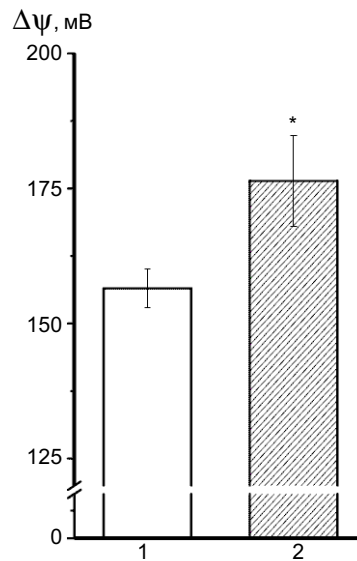


Рис. 2. Значення мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця щурів без (1) та після курсу фізичного навантаження плаванням (2)

фосфорилування і, відповідно, високий рівень синтезу АТФ. Останнє, очевидно, забезпечувало продуктивну роботу серця тренуваних тварин. Відомо, що мембранний потенціал безпосередньо залежить від ступеня протонної провідності мітохондріальних мембран. Зареєстроване нами високе значення мембранного потенціалу у щурів після фізичного навантаження свідчило, що витік протонів, який спостерігається при утворенні мітохондріальних пор і дії роз'єднувальних білків, мінімізований.

Для виявлення адаптаційних можливостей міокарда та його чутливості до утворення мітохондріальних пор відтворювали модель кальцієвого перевантаження міокарда – послідовно збільшували концентрацію CaCl_2 у розчині, яким перфузували

ізолюване серце. Через 15 хв після підвищення дози Ca^{2+} брали проби розчину, що відтікав від серця, для вимірювання його оптичної густини і виявлення мітохондріального фактора. Вивільнення останнього було показником порушення проникності мітохондріальних мембран [4].

Встановлено, що курс тренування плаванням запобігав швидкому підвищенню КДТ та появі аритмій при відтворенні моделі кальцієвого перевантаження. При однаковій концентрації Ca^{2+} у перфузійному розчині серця тренуваних щурів розвивали більш потужну реакцію, яка проявлялась у підвищенні $P_{\text{лш}}$, скорочувальної активності, коронарного потоку та інтенсивності роботи міокарда (рис. 3). Слід відмітити, що максимальна інотропна стимуляція серця у

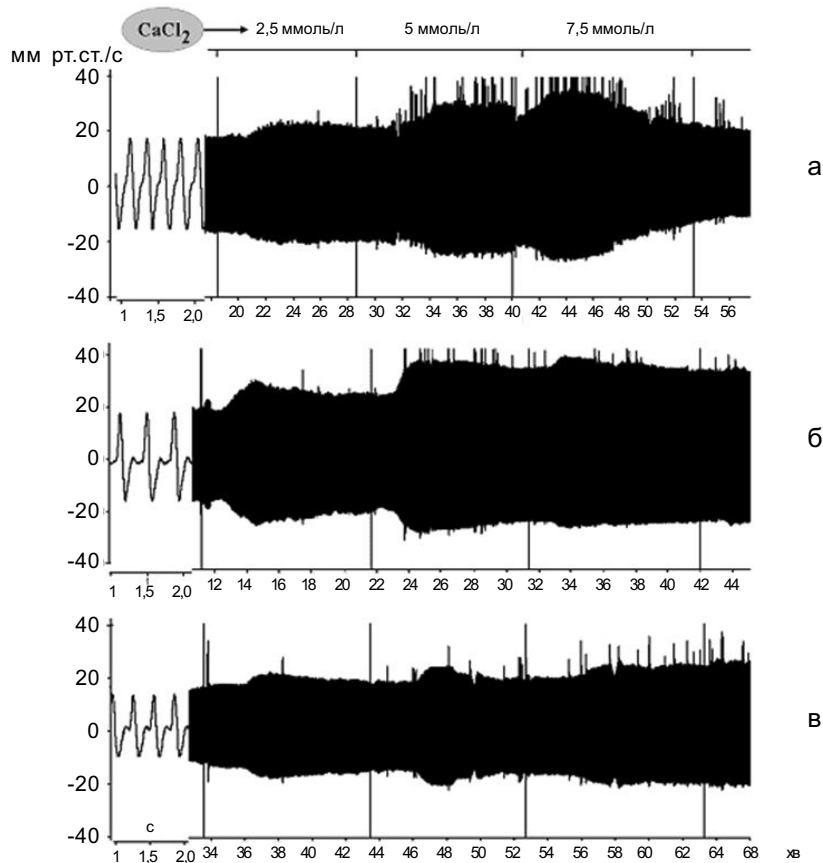


Рис. 3. Зміни скорочувальної активності міокарда при підвищенні концентрації іонів кальцію у перфузійному розчині у контрольних щурів (а), у щурів після курсу фізичного навантаження плаванням без (б) і після введення L-NAME (в)

контрольних тварин спостерігалася у відповідь на введення 7,5 ммоль/л CaCl_2 , а у тренуваних – на 10 ммоль/л CaCl_2 , що було підтвердженням наявності потужних функціональних резервів міокарда як наслідок його адаптації до фізичного навантаження. У контрольних тварин при 10 ммоль/л, а у тренуваних – тільки при 12,5 ммоль/л CaCl_2 у перфузійному розчині відмічали зниження приросту скоротливої реакції міокарда. Отримані результати позитивно корелювали з даними про вивільнення мітохондріального фактора. У контрольній серії він рееструвався при більш низьких концентраціях Ca^{2+} : 7,5–10 ммоль/л, в той час як у адаптованих до тренування тварин – при 12,5 ммоль/л, що було ознакою зменшення чутливості сердець тренуваних щурів до дії Ca^{2+} , а отже, і до утворення мітохондріальних пор. Таким чином, навантаження плавання супроводжувалося збільшенням ефективності обміну кальцію між кардіоміоцитами та позаклітинним середовищем, а також зменшенням чутливості сердець до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} .

Ми припустили, що механізм адаптації до фізичного навантаження здійснюється через активацію синтезу оксиду азоту. Як відомо, оксид азоту, що генерується при окисненні L-аргініну кальційзалежною конститутивною NO-синтазою (eNOS), відіграє одну з провідних ролей у регуляції функціональної активності міокарда завдяки своїм вазодилаторним ефектам [28]. Крім тонуусу судин [3, 16], NO здатний впливати на дихальну активність мітохондрій та чутливість мітохондріальних пор до відкриття [7, 9, 14, 32]. Виникає питання – чи превалюють будь-які ефекти NO при розвитку адаптаційних реакцій міокарда при тренуванні: його пригнічувальна дія на проникність мітохондріальних мембран або суто дилаторні впливи?

Нами встановлено, що блокада синтезу оксиду азоту за допомогою введення L-NAME практично скасовувала ефект адаптації до

фізичного тренування плаванням. Показники функціонального стану серця контрольних щурів і тренуваних щурів, яким вводили L-NAME, практично збігалися (див. таблицю). Це також стосувалось як реакції сердець на додавання CaCl_2 (рис. 4), форми кривої Франка-Старлінга (див. рис. 1), так і динаміки вивільнення мітохондріального фактора.

Таким чином, підвищення коронарного потоку і скорочувальної активності міокарда, збільшення функціональних резервів серця як наслідок адаптації до фізичних навантажень плаванням зумовлені дією оксиду азоту, оскільки блокада ферментів його синтезу нівелювала спостережувані нами адаптаційні можливості серця. Ці висновки підтверджуються даними біохімічних досліджень, які вказують на істотні зміни в системі синтезу NO як результату адаптації до регулярних фізичних навантажень плаванням [1]. Встановлено, що в мітохондріях, отриманих із сердець тренуваних щурів, спостерігалася стимуляція активності eNOS, iNOS і нітратредуктази, а вміст нітрат-аніона – маркера інтенсивності утворення і деградації пероксинітриду достовірно знижувався. Таким чином, формування адаптаційних можливостей міокарда при фізичному навантаженні зумовлено здатністю ендотелію коронарних судин і перикарда продукувати оксид азоту.

Механізми адаптації серця до фізичного навантаження досить широко досліджуються. Багато уваги приділяється вивченню ролі білків теплового шоку [20] і антиоксидантів [17]. Нині відомо, що фізичні тренування знижують генерацію вільних радикалів кисню мітохондріями [33], збільшують експресію ендогенних антиоксидантних ферментів та інших антиапоптогенних протеїнів [21], індукують ефект прекодиціювання у дорослих [39] і відновлюють його у старих тварин [8]. Показано підвищення при тренуванні експресії різних ізоферментів NOS [25, 35, 36]. При тривалих навантаженнях великої

інтенсивності зростає експресія iNOS [37], за помірних – cNOS [36]. Згідно з нашими результатами, адаптація до фізичного навантаження плавання супроводжувалася підвищенням мембранного потенціалу мітохондрій, що може свідчити про ефективність роботи дихального ланцюга і мінімізацію протонного витоку, а також зменшення чутливості сердець до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} , оскільки у тренуваних щурів вивільнення мітохондріального фактора в коронарне русло реєструвалося при значно більших концентраціях іонів кальцію в перфузійному розчині, ніж у контрольних тварин. Останнє підтверджується даними, отриманими на суспензії мітохондрій серця щурів [6]. Тренування щурів протягом 10 тиж на тредмілі також призводило до збільшення на 45 % кількості Ca^{2+} , який необхідний для відкриття мітохондріальних пор [26]. Регулярні

фізичні тренування зменшували чутливість мітохондріальних пор до Ca^{2+} за наявності субстратів для комплексу II. У такому разі цілком логічно, що реперфузійні порушення функції серця також проявлялися меншою мірою [5, 19, 12, 24].

Кардіопротекторний механізм, що формується у клітині при адаптації до фізичного тренування, може бути зумовлений насамперед істотним зростанням коронарного потоку, про що свідчать результати наших і інших досліджень [38]. Вазодилаторний ефект багато в чому є результатом дії оксиду азоту, збільшення акумуляції якого при фізичному навантаженні є наслідком підвищення експресії й активності NOS [10, 23, 30]. Одночасно NO здатен виступати ефективним інгібітором мітохондріальних пор [7, 32], і ми продемонстрували посилення цих його властивостей при тренуванні. Ймовірно, всі клітинні механізми, що

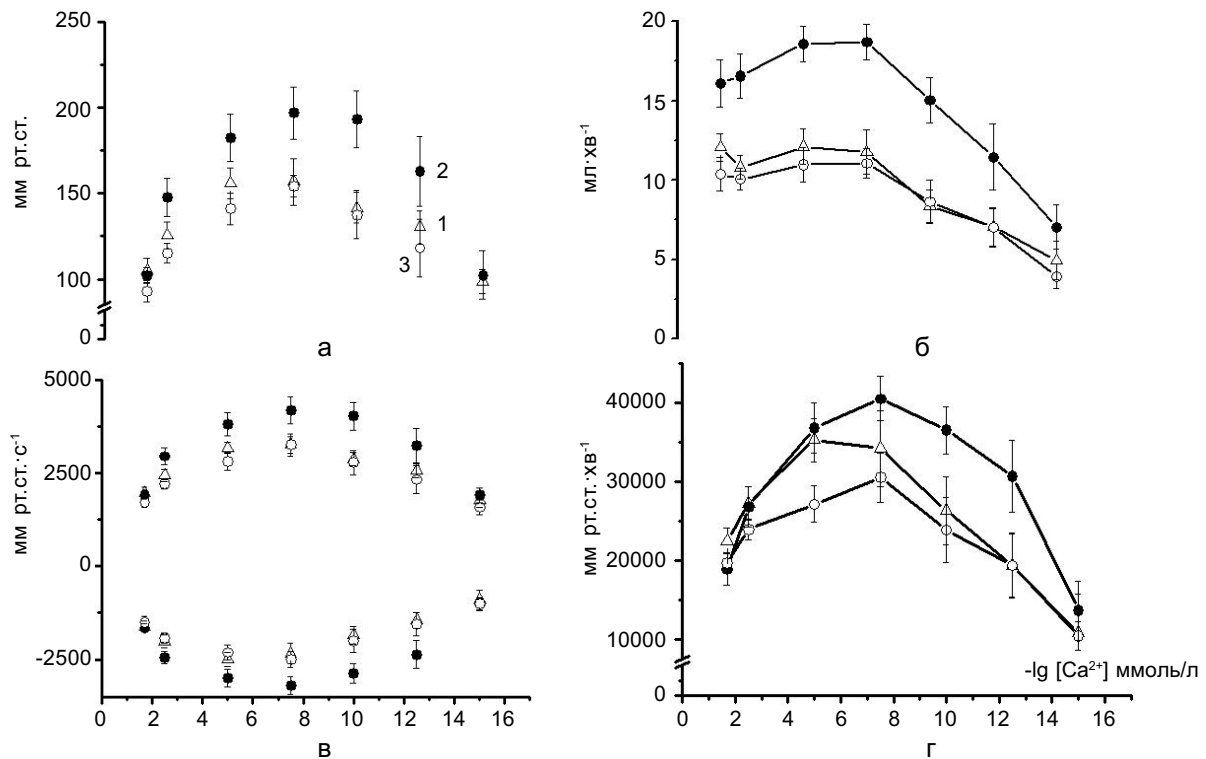


Рис. 4. Вплив блокади синтезу NO на зміни показників функціонального стану серця у відповідь на підвищення у перфузійному розчині концентрації Ca^{2+} у щурів без і після курсу фізичного навантаження плаванням: а – тиск, що розвивається у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення і розслаблення міокарда; г – інтенсивність скоротливої функції; 1 – контроль, 2 – тренувані щури, 3 – тренувані щури і введення L-NAME

спрямовані на блокаду утворення мітохондріальних пор і зниження проникності мітохондріальних мембран, будуть робити внесок у загальний захисний ефект, що спостерігається при адаптації серця до фізичного навантаження.

ВИСНОВКИ

1. Адаптація щурів до фізичного навантаження плаванням протягом 4 тиж супроводжувалася покращенням функціонального стану серця щурів, яке проявлялося у підвищенні скоротливої активності серця і коронарного потоку, збільшенні його функціональних резервів.

2. Навантаження щурів плаванням мало системний тренувальний ефект. Значення мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця та печінки тренуваних тварин були вищими, ніж у контрольній серії.

3. Фізичне навантаження плаванням призводило до зменшення чутливості сердець щурів до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} : вивільнення мітохондріального фактора у коронарний потік цих щурів спостерігали при дії більш високих концентрацій іонів кальцію.

4. Адаптаційні зміни функціонального стану серця, що формуються при фізичному тренуванні плаванням, були зумовлені впливом оксиду азоту, оскільки блокада ферментів його синтезу за допомогою L-NAME практично скасовувала спостережувані нами адаптаційні можливості серця.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень.

Т.В. Шиманская, Ю.В. Гошовская, В.Ф. Сагач

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ МИОКАРДА ТРЕНИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

У тренированных животных в значительных количествах синтезируется оксид азота. Он улучшает как процессы вазодилатации, так сократительную и насосную функцию сердца. Остается невыясненным его влияние на реакции

сердца в ответ на нагрузку объемом и кальцием, что наблюдается при длительных физических нагрузках. В экспериментах на изолированном по методу Лангендорфа сердце крыс улучшалось его функциональное состояние как следствие адаптации в течение 4-х недель к нагрузке плаванием, что проявлялось в увеличении сократительной активности миокарда на 20 % и коронарного потока (с $12,0 \pm 1,5$ до $16,0 \text{ мл/мин} \pm 0,8 \text{ мл/мин}$), уменьшении частоты сердечных сокращений, а также увеличении функциональных резервов сердца. При одинаковой степени растяжения левого желудочка сердца тренированных крыс развивали более мощную силу сокращения. Впервые установлено, что мембранный потенциал митохондрий сердца тренированных крыс был достоверно выше, чем у контрольных животных, что свидетельствует об увеличении сопряжения окислительного фосфорилирования. Курс тренировки плаванием предотвращал быстрый рост конечно-диастолического давления и появление аритмий при воспроизведении модели кальциевой перегрузки. У тренированных животных отмечали открытие митохондриальных пор при более высоких концентрациях кальция в перфузионном растворе. Показано, что адаптация к физической нагрузке и увеличение резервов сердца обусловлена влиянием оксида азота, блокада синтеза которого с помощью L-NAME (10^{-4} моль/л) отменяла указанные адаптационные изменения.

Ключевые слова: оксид азота, изолированное сердце, физическая тренировка плаванием, кривая Франка–Старлинга, кальциевая перегрузка.

T.V. Shimanskaya, Y.V.Goshovska, V.F. Sagach

NITRIC OXIDE AS THE MAIN MEDIATOR OF ADAPTATION TO PHYSICAL TRAINING

Intensive constitutive production of nitric oxide (NO) during physical training improves vasodilatation and heart function. However, it remains unclear how NO takes part in myocardial adaptation to workload, which is accompanied by an increased heart inflow and intracellular calcium content. Using isolated rat heart by Langendorf preparation, we studied myocardial response to gradually increased left ventricular volume (Frank-Starling law) and increasing concentration of Ca^{2+} in the perfusion solution (from 1.7mM to 12,5 mM) in trained and untrained rats. It was shown that 4 weeks swimming course improved heart function: heart rate was decreased; contractile activity (dP/dt max) and coronary flow were increased by 20% and 33%, respectively. Equal volume stretching of balloon in left ventricle provoked greater contraction in trained comparing to untrained hearts, demonstrating extended functional reserves after swimming course. Mitochondrial membrane potential was significantly increased in hearts of trained rats. Furthermore, training prevented fast increase of the end diastolic pressure during calcium upload. Mitochondrial factor release due to opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in trained hearts was detected at higher

concentrations of calcium that reveals extended calcium capacity of mitochondria and lesser sensitivity of MPTP to its inducitor – calcium. Blockade of NO synthesis with L-NAME application of (10^{-4} M for 15 min) abolished reaction of trained heart during Frank-Starling and calcium upload. Thus, heart adaptation to physical training and extension of functional reserves in heart are provided by endogenous NO production. Key words: nitric oxide, Frank-Starling law, physical training, calcium upload, mitochondrial permeability transition, membrane potential.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Степаненко Л.Г., Таланов С.О., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вікові особливості змін системи оксиду азоту в судинах і плазмі за умов адаптації до фізичних навантажень // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**. – №1. – С. 3–12.
2. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // *Биохимия.* – 1985. – **50**, №8. – С. 1350–1361.
3. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н., Дмитриева А.В. О роли эндотелия в реакции реактивной гиперемии коронарных сосудов // *Докл. АН СССР.* – 1989. – **307**, № 3. – С. 765–767.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, №4. – С. 6–12.
5. Таланов С.А., Бурый В.А., Сагач В.Ф. Влияние адаптации к дозированым физическим нагрузкам на функцию миокарда крыс // *Нейрофизиология.* – 2009. – **41**, №1. – С. 41–47.
6. Чорна С.В., Таланов С.А., Струтинська Н.А., Вавилова Г.Л., Коцюруба А.В., Гайдай М.І., Сагач В.Ф. Вплив тривалих фізичних навантажень на зміни функції серця шурів при ішемії–реперфузії, чутливість кальцій індукованої мітохондріальної пори та експресію роз'єднувального білка 3 // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**, №1. – С.13–21.
7. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская, Е.В. Рудык, Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии–реперфузии изолированного сердца // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2009. – **95**, №1. – С.28–37.
8. Abete P., Calabrese C., Ferrara N., Cioppa A., Pisanelli P., Cacciatore F., Longobardi G., Napoli C., Rengo F. Exercise training restores ischemic preconditioning in the aging heart // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2000. – **36**. – P.643–650.
9. Balakirev M., Khramtsov V., Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – **246**. – P. 710–718.
10. Bernstein R.D., Ochoa F.Y., Xu X.B., Forfia P., Shen W., Thompson C.I., Hintze T.H. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. – *Circulat. Res.* – 1996. – **79**. – P. 840–848.
11. Borutaite V., Mildaziene V., Brown G.C., Brand M.D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – **1272**. – P. 154–158.
12. Bowles D.K., Starnes J.W. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart // *J. Appl. Physiol.* – 1994. – **76**, issue 4. – P.1608–1614.
13. Brand M.D. in Brown G.C., Cooper C.E. Editors, *Bioenergetics: a practical approach.* – Oxford.: IRL Press. – 1995. – P. 39–62.
14. Brookes P., Salinas E., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P.20474–20479.
15. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // *J. Physiol.* – 2009. – **587**, №4. – P.851–872.
16. Endo T., Imaizumi T., Tagawa T., Shiramoto M., Ando S., Takeshita A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm // *Circulat.* – 1994. – **90**. – P. 2886–2890.
17. French J.P., Hamilton K.L., Quindry J.C., Lee Y., Upchurch P.A., Powers S.K. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain // *FASEB J.* – 2008. – **22**, №8. – P. 2862–2871.
18. Hoydal M.A., Wisloff U., Kemi O.J., Britton S.L., Koch L.G., Smith G.L., Ellingsen O. Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity // *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* – 2007. – **14**. – P.319–325.
19. Hwang H., Reiser P.J., Billman G.E. Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion // *J. Appl. Physiol.* – 2005. – **99**, №1. – P.230–236.
20. Quindry J.C., Hamilton K.L., French J.P., Lee Y., Murlasits Z., Tumer N., Powers S.K. Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **103**. – P. 1056–1062.
21. Kavazis A.N., McClung J.M., Hood D.A., Powers S.K. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli // *Amer. J. Physiol.* – 2008. – **294**. – P. H928–H935.
22. Kemi O.J., Ellingsen O., Smith G.L., Wisloff U. Exercise-induced changes in calcium handling in left ven-

- tricular cardiomyocytes // *Front Biosci.* – 2008. – **13**. – P.356–368.
23. Kingwell B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease // *FASEB J.* – 2000. – **14**. – P.1685–1696.
24. Le Page C., Noirez P., Counrty J., Riou B., Swyngedauw B., Besse S. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart // *Exp. Geront.* – 2009. – **44**. – P.177–182.
25. Maiorana A., O'Driscoll, Tayler R., Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system // *Sports Med.* – 2003. – **33**, № 7. – P.1013–1035.
26. Marcil M., Bourduas K., Ascah A., Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria // *Amer. J. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. H1549–H1557.
27. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection // *Biochem. J.* – 2006. – **395**. – P. 611–618.
28. Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart // *Circulation.* – 1997. – **96**, №4. – P.1320–1329.
29. Rimbaud S., Garnier A., Ventura-Clapier R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathology // *Pharmacol. Res.* – 2009. – **61**. – P.131–138.
30. Roberts C.K., Barnard R.J., Jasman A., Balon T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**. – P. E390–E394.
31. Sagach V.F., Kindyalyuk A.M., Kovalenko T.N. Functional hyperemia of skeletal muscle: role of endothelium // *J.Cardial. Pharmacol.* – 1992. – **20**, suppl. 12. – P.S170–S175.
32. Shimanskaya T.V Goshovska Y., Sagach V. The role of mitochondrial permeability transition pore in modulation of oxygen cost of myocardial work by endogenous NO. – In: *Advances in Biomedical Research.* – Cambridge. – 2010. – P.313–317.
33. Starnes J.W., Barnes B.D., Olsen M.E. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca^{2+} -induced dysfunction // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **102**. – P. 1793–1798.
34. Stolen T.O., Hoydal M.A., Kemi O.J., Catalucci D., Ceci M., Aasum E., Larsen T., Rolim N., Condorelli G., Smith G.L., Wisluff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca^{2+} control, and SR Ca^{2+} release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy // *Circulat. Res.* – 2009. – **105**. – P.527–536.
35. Strensberg A. Keller C., Hillig T., Frosig C., Wojtaszewski J.F., Pedersen B.K., Pilegaard H., Sander M. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in skeletal muscle // *FASEB J.* – 2007. – **21**, №11. – P.2683–2694.
36. Sun M., Zhang M., Gu J., Qian F.L., Gu J.Z., Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilatation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase // *Hypertens Res.* – 2008. – **31**, №5. – P. 805–816.
37. Tatchum-Talom R., Schulz R., McNeill J.R., Khadour F.H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – **279**, №4. – P.H1757–H1766.
38. Taylor R.P., Ciccolo J.T., Starnes J.W. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – **58**, №3. – P.575–581.
39. Yamashita N., Hoshida S., Otsu K., Asahi M., Kuzuya T., Hori M. Exercise provides biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation // *J. Exp. Med.* – 1999. – **189**. – P. 1699–1706.

О.І. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

Вплив N-стеароїл- та N-олеоїлетаноламіну на потенціалзалежні натрієві канали кардіоміоцитів

До групи N-ацилетаноламінів (NAE) належать ліпіди, які здатні модулювати роботу іонних каналів плазматичної мембрани клітин без участі канабіноїдних рецепторів. Проте вплив різних представників NAE на потенціалзалежні натрієві канали (ПЗНК) у серцевій тканині прямо не показаний. У цій роботі ми дослідили модуляцію насиченим N-стеароїлетаноламіном (NSE) та одноненасиченим N-олеоїлетаноламіном (OEA) біофізичних властивостей ПЗНК плазматичної мембрани неонатальних кардіоміоцитів. NSE в діапазоні концентрацій 1–200 мкмоль/л суттєво не впливав на амплітуду вхідного натрієвого струму (I_{Na}), але зміщував криві його стаціонарної активації та інактивації на 2,4 та 10,6 мВ відповідно (при 100 мкмоль/л) у бік гіперполяризації. Кінетика активації струму під дією NSE не змінювалась, а інактивація в діапазоні потенціалів -60 – -30 мВ прискорювалась приблизно в 1,2 раза. На відміну від NSE, OEA дозозалежно блокував I_{Na} з $K_D = 11,4$ мкмоль/л $\pm 1,6$ мкмоль/л і величиною максимального блоку $30\% \pm 3\%$, а також викликав більший порівняно з NSE гіперполяризаційний зсув кривих стаціонарної активації та інактивації струму (-6,4 та -14,0 мВ відповідно при 100 мкмоль/л OEA). OEA практично не змінював кінетику активації I_{Na} , але сильніше, ніж NSE, прискорював кінетику його інактивації. Отже, обидва представники NAE впливають на потенціалзалежність активації, інактивації та кінетику I_{Na} . Водночас ці дії є більш вираженими для одноненасиченого OEA, який на додаток ще і частково пригнічував струм. Описані впливи NSE і OEA на натрієві канали можуть частково зумовлювати зниження збудливості кардіоміоцитів під дією цих ліпідів у нормі та патології.

Ключові слова: неонатальні кардіоміоцити, N-ацилетаноламіни, потенціалзалежні натрієві канали, інактивація.

ВСТУП

N-стеароїл- (NSE) та N-олеоїлетаноламін (OEA) належать до великої групи мінорних сигнальних ліпідів, яка включає ендоканабіноїди, N-ацильовані молекули етаноламіну, ейкозаноїди та жирні кислоти [1, 19]. Ці біоактивні ліпіди впливають на перебіг багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесів, включаючи нейрональну збудливість [8], сон [6], епілепсію, нейропротекцію [6, 21], запалення та біль [3, 17], серцево-судинну модуляцію [12, 14], запліднення і проходження клітинного циклу [1, 7, 20]. У серцево-судинній системі активним амідом жирної кислоти є олеамід, який виступає ефективним вазодилататором та впливає

на структурний розвиток серцевого м'яза за допомогою інгібування зв'язків між кардіоміоцитами через щільні контакти [12]. Досить добре вивчена дія ендо- та екзоканабіноїдів у нервовій, серцево-судинній та імунній системах, яка опосередковується низкою таких специфічних до них рецепторів, як канабіноїдні CB_1 і CB_2 , ванілоїдний TRPV1, ядерні PPAR та G-білок-спряжені GPR18, GPR55 і GPR119 [1]. Найбільш досліджений представник N-ацилетаноламінів (NAE) – анандамід виявляє активність з представниками трьох груп рецепторів ($CB_{1,2}$, PPAR, TRPV1), в той час як OEA та інші представники NAE можуть по-різному впливати через деякі з

© О.І. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

них. Останні дослідження свідчать, що канабіноїди можуть діяти на низку іонотранспортних структур плазматичної мембрани клітин і без залучення вказаних рецепторів і сигнальних шляхів, які з ними пов'язані. Так, був описаний прямий вплив ендоканабіноїдів на функціональні властивості іонотропних серотонінових 5-HT₃-рецепторів, глутаматних NMDA, ГАМК_A, гліцинових та α7-нікотинових рецепторів [16]. Подібні ефекти були виявлені також на різні типи кальцієвих, калієвих, хлорних і лігандкероаних іонних каналів, у тому числі на ванілоїдний рецептор TRPV1 [1, 16].

Такі молекули ліпідної природи, як цис-9,10-октодецеаноамід, анандамід і синтетичні канабіміметики AM404 і WIN55,212-2 здатні також регулювати активність потенціалзалежних натрієвих каналів (ПЗНК) [15]. Зокрема, здатність насичених NAE (14:0, 16:0 і 18:0) пригнічувати швидкі ПЗНК була продемонстрована в диференційованих клітинах нейробластоми C1300N18, в яких ці сполуки зменшували як базальний, так і вератридинактивованій транспорт натрію, що свідчило про можливість модуляції ними нейрональної збудливості без участі канабіноїдних рецепторів [11]. Висновок про наявність прямої дії анандаміду на ПЗНК центральних нейронів було зроблено на основі даних про зміну зв'язування батрахотоксину з синаптосомами мозку під впливом цього ліпиду, а також про блокування ним вератридинзалежної деполяризації та тетродотоксинчутливої пачкової активності нейронів кори головного мозку [15]. В прямих електрофізіологічних дослідженнях на нейронах задньокорінцевих гангліїв було виявлено, що анандамід блокує як тетродоксинчутливу, так і тетродоксинрезистентну компоненти загального натрієвого струму (I_{Na}) і пришвидшує кінетику їх активації та інактивації [13].

У нашій попередній роботі ми показали, що NSE і, особливо, ОЕА здатні модулювати загальну збудливість кардіоміоцитів, змінюючи показники їх потенціалу дії (ПД)

та потенціалу спокою (ПС) [22]. Одним з ефектів цих речовин було деяке зменшення амплітуди та швидкості наростання ПД, що свідчило про їх можливий вплив на деполяризувальний, ПЗНК-опосередкований I_{Na} . Оскільки прямих відомостей щодо характеру дії цих представників NAE на ПЗНК у серці не існує, в цій роботі ми дослідили модуляцію біофізичних властивостей швидкого I_{Na} неонатальних кардіоміоцитів щурів за наявності NSE й ОЕА. Наші результати свідчать, що останні впливають на потенціалзалежність активації, інактивації та кінетику I_{Na} , що може частково зумовлювати зниження збудливості кардіоміоцитів під дією цих ліпідів у нормі та патології.

МЕТОДИКА

Первинна культура неонатальних кардіоміоцитів. Для виділення та культивування неонатальних серцевих міоцитів щурів використовували загальноприйнятну процедуру з незначними змінами [18]. Серця асептично виділяли із 2–3-добових щурів відразу після декапітації та поміщали в безкальцієвий фізіологічний розчин (ФР) при 0 °С такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, MgSO₄ – 1, KH₂PO₄ – 1,2, Na₂HPO₄ – 0,5, піруват натрію – 5, HEPES – 10, глюкоза – 10; рН 7,35. Після подрібнення шматочки тканини розміром близько 1 мм вміщували на 4–5 хв у ФР при 21 °С, який прогазовували карбогеном (суміш 95 % O₂ та 5 % CO₂). Ферментативне диспергування тканини проводили у ФР з додаванням 0,46 мг/мл колагенази (Type IA, «Sigma-Aldrich», США) при 37 °С протягом 30 хв з легким перемішуванням і прогазовуванням карбогеном. Після ферментативної обробки тканину піпетували, центрифугували при малих обертах (3000 хв⁻¹) і після видалення супернатанту вносили у ФР, що містив Ca²⁺ в концентрації 0,2 ммоль/л. Процес відмивки ферменту повторювали тричі, після чого концентрацію кальцію у ФР підвищували до 1,5 ммоль/л. Це давало змогу

підготувати кальційтолерантні клітини до перенесення в розчин з фізіологічною концентрацією кальцію. Після центрифугування протягом 1 хв при низьких обертах (3000 хв^{-1}), супернатант видаляли, клітини переносили в культуральне середовище DMEM з додавання 10%-ї телячої сироватки і ще раз піпетували. З суспензії, яку отримали, клітини наносили із щільністю близько 100000 см^{-2} на скельця, покриті желатином («Sigma-Aldrich», США) і поміщені в чашки Петрі із культуральним середовищем. Клітини інкубували в атмосфері газів 5% CO_2 і 95 % O_2 при 37°C протягом 1–3 діб. Кожні 24 год культуральне середовище замінювали на свіже. Життєздатні клітини, що прикріпилися до скла, спонтанно скорочувалися через 12 год після культивування. Характер і частота скорочень кожного кардіоміоцита були різними і не залежали від активності сусідніх клітин. Для електрофізіологічних дослідів використовували клітини, які перед цим спонтанно скорочувалися.

Електрофізіологічні експерименти та розчини. Досліди проводили за допомогою методу “patch-clamp” у конфігурації “ціла клітина” при 36°C з використанням підсилювача PC-ONE («Dagan Corp.», США), аналогово-цифрового перетворювача Digidata 1200A («Axon Instr.», США) персонального комп’ютера та програмного забезпечення pCLAMP-8 («Axon Instr.», США). Для швидкої зміни зовнішньоклітинних розчинів (за час близько 1 с) і прикладання речовин в умовах сталої температури використовували багатоканальну термостабілізовану мікроперфузійну систему власної розробки. Реєструвальні скляні мікропіпетки виготовляли за допомогою витяжки P-97 («Sutter Instr. Co.», США) з боросилікатних капілярів із зовнішнім діаметром 1,5 мм («World Precision Instruments», США). Після заповнення внутрішнім розчином піпетки мали опір 1–3 МОм. Для обробки та аналізу записів і візуалізації результатів використовували програмне

забезпечення Matlab («Mathworks Corp.», США) і Origin («OriginLab Corp.», США).

Для постійної перфузії клітин протягом електрофізіологічного дослідів використовували зовнішньоклітинний розчин Тіроде (PT) такого складу (ммоль/л): $\text{NaCl} - 144$, $\text{KCl} - 5,4$, $\text{CaCl}_2 - 1,8$, $\text{MgCl}_2 - 1,2$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,5$, $\text{HEPES} - 10$, глюкоза – 10; pH 7,4. Для запису натрієвих трансмембранних струмів клітину перфузували розчином зі зниженою концентрацією натрію, який містив іони цезію для усунення калієвої провідності та нікелю для блокування кальцієвих струмів, такого складу (ммоль/л): $\text{NaCl} - 35$, $\text{TEA-Cl} - 100$, $\text{CsCl} - 5$, $\text{CaCl}_2 - 0,5$, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{NiCl}_2 - 1$, $\text{HEPES} - 10$, глюкоза – 10; pH 7,4. Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): $\text{CsCl} - 40$, $\text{CsOH} - 85$, $\text{TEA-Cl} - 5$, аспарагінова кислота – 70, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{EGTA} - 10$, $\text{HEPES} - 10$, $\text{MgATP} - 4$; pH 7,3 (доводили за допомогою аспарагінової кислоти). Всі реактиви, які використовували для приготування розчинів, були від фірми “Sigma-Aldrich” (США). NSE та ОЕА були синтезовані в Інституті біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України (відділ біохімії ліпідів). Відповідність речовин та якість синтезу перевіряли за їх точкою плавлення, методом тонкошарової хроматографії за довжиною R_f і методом газорідинної хроматографії в порівнянні з комерційним аналогом [2]. NSE та ОЕА попередньо розчиняли у етанолі в концентрації 50 або 200 моль/л і додавали до PT для отримання необхідної концентрації речовини та обробляли ультразвуком протягом 5 хв. Концентрація етанолу у розчинах з NAE не перевищувала 0,05 %.

РЕЗУЛЬТАТИ

За наших експериментальних умов (35 ммоль/л Na^+ зовні з Cs^+ як основним внутрішньоклітинним катіоном) при деполяризації кардіоміоцита прямокутними імпульсами потенціалу наростаючої амплітуди (V_m ,

інкремент 10 мВ) від рівня підтримувального потенціалу (V_h) -90 мВ вхідний Na^+ -струм (I_{Na}) активується при -70 мВ, сягає максимального значення при -20 мВ, після чого поступово зменшувався, змінюючи свій напрям через неідеальну селективність ПЗНК, що дає змогу їм транспортувати у вихідному напрямку Cs^+ при видимому потенціалі реверсії (V_r) приблизно +60 мВ.

Прикладання NSE майже не змінювало амплітуду I_{Na} : навіть при концентраціях речовини 200 мкмоль/л амплітуда струму при $V_m = -20$ мВ зменшувалася тільки на 5 % (рис. 1,г). Водночас ОЕА викликав досить швидко (менше ніж за 1 хв) дозозалежне пригнічення максимальної амплітуди I_{Na} (рис. 2,г). У результаті апроксимації дозозалежності блокувальної дії ОЕА при потенціалі $V_m = -20$ мВ функцією Хілла були отримані значення максимального пригнічення при насичуючій концентрації речовини А, константи дисоціації K_D та коефіцієнта кооперативності p 30 %, 10,5 мкмоль/л $\pm 1,1$ мкмоль/л та 1,9 відповідно.

Порівняння пронормованих та усереднених вольт-амперних характеристик (ВАХ) I_{Na} в контролі і за наявності субмаксимальних концентрацій (100 мкмоль/л) NSE (див. рис. 1,б) та ОЕА (див. рис. 2,б) не виявило помітних змін у V_r струму, що свідчить про відсутність впливу цих речовин на селективність ПЗНК. Апроксимація висхідних гілок отриманих ВАХ функцією Голдмана–Ходжкіна–Каца, що описує “миттєву ВАХ” через відкриті канали за умов асиметричного розподілу проникаючих іонів (тобто при заданих V_r), інтерполяція “миттєвих ВАХ” в зону від’ємних потенціалів та ділення загальних ВАХ на значення “миттєвих ВАХ” при кожному значенні потенціалу дає змогу отримати залежності стаціонарної активації I_{Na} від потенціалу (див. рис. 1,в і 2,в). Їх апроксимації функціями Больцмана дали можливість визначити чи впливають NSE та ОЕА

на ключові показники стаціонарної активації – потенціал половинної активації – $V_{1/2}$ та фактор крутизни – k . Виявилось, що за контрольних умов ці показники становили: $V_{1/2} = -34,2$ мВ і $k = 8,2$ мВ. Прикладання 100 мкмоль/л NSE призводило до їх незначних, статистично недостовірних змін: гіперполяризаційного зсуву $V_{1/2}$ на 2,4 мВ (тобто до $V_{1/2} = -36,5$ мВ) і збільшенню k до 8,5 мВ. ОЕА в концентрації 100 мкмоль/л викликав суттєвіші зміни: гіперполяризаційний зсув $V_{1/2}$ на 3,0 мВ (тобто до $V_{1/2} = -37,1$ мВ) та підвищення k до 8,4 мВ, які, однак, теж не сягали порогу статистичної достовірності.

Для з’ясування того, чи впливають NSE та ОЕА на властивості інактивації ПЗНК, ми порівняли характеристики їх стаціонарної інактивації в контролі і за наявності 100 мкмоль/л кожної з речовин. Ці характеристики вимірювали за допомогою стандартного протоколу стимуляції, що складався з кондиціонуючого імпульсу змінної величини в діапазоні -100–70 мВ і тривалістю 400 мс, за яким слідував тестовий імпульс до $V_m = -20$ мВ. Для побудови самих характеристик амплітуди I_{Na} у відповідь на тестуючий імпульс нормувалися до амплітуди струму при кондиціонуючому імпульсі -100 мВ і відкладалися залежно від значення кондиціонуючого потенціалу. Отримані таким чином потенціалзалежності стаціонарної інактивації зображені на рис. 1,в і 2,в. Їх апроксимації функціями Больцмана дали змогу встановити, що за контрольних умов стаціонарна інактивація ПЗНК характеризується показниками $V_{1/2} = -78,6$ мВ і $k = 7,5$ мВ, які за наявності 100 мкмоль/л NSE змінюються до $V_{1/2} = -89,3$ мВ і $k = 7,4$ мВ, а за наявності 100 мкмоль/л ОЕА – до $V_{1/2} = -92,5$ мВ і $k = 8,4$ мВ. Таким чином, обидва представники NAE викликають зсув стаціонарної інактивації ПЗНК у бік гіперполяризації, однак з ОЕА цей зсув (14,0 мВ) був більшим, ніж з NSE 1(10,6 мВ).

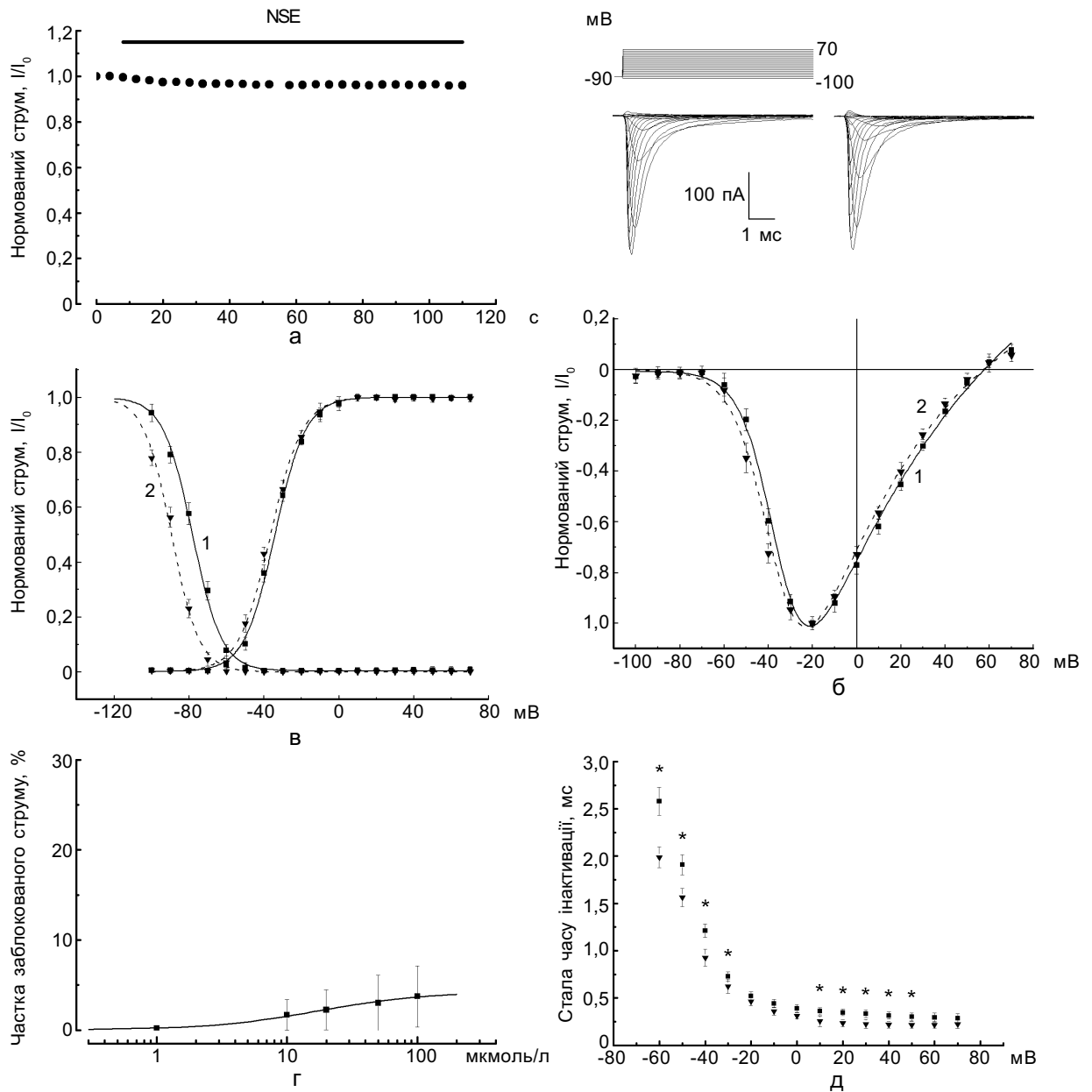


Рис. 1. Вплив N-стеарилетаноламіну (NSE) на струми через натрієві канали кардіоміоцитів: а – часозалежність змін амплітуди натрієвого струму (I_{Na}), активованого деполаризаційним імпульсом потенціалу (V_t) до -20 мВ, у відповідь на прикладання 100 мкмоль/л NSE, б – вольт-амперні характеристики контрольного (I_{Na}) (1; n=10) та I_{Na} за наявності 100 мкмоль/л NSE (2; n=6); амплітуди струмів індивідуальних кардіоміоцитів при кожному V_t були нормовані на максимальне значення при $V_t=-20$ мВ та усереднені; суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних залежностей добутком функцій Больцмана та Годмана–Ходжкіна–Каца; зверху показані типові записи струмів і протокол стимуляції до (зліва) та після прикладання 100 мкмоль/л NSE, в – криві стаціонарної активації та інактивації натрієвих струмів за контрольних умов (1; n=10) та за наявності 100 мкмоль/л NSE (2; n=6); суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних залежностей функцією Больцмана, г – дозозалежність блокувальної дії NSE на I_{Na} при потенціалі -20 мВ (n=6), суцільна лінія є апроксимацією залежності функцією Хіла, позначення символів ті самі, що і на б, д – зміна часу інактивації I_{Na} під дією NSE (n=6), позначення символів ті самі, що і на б. *P<0,05

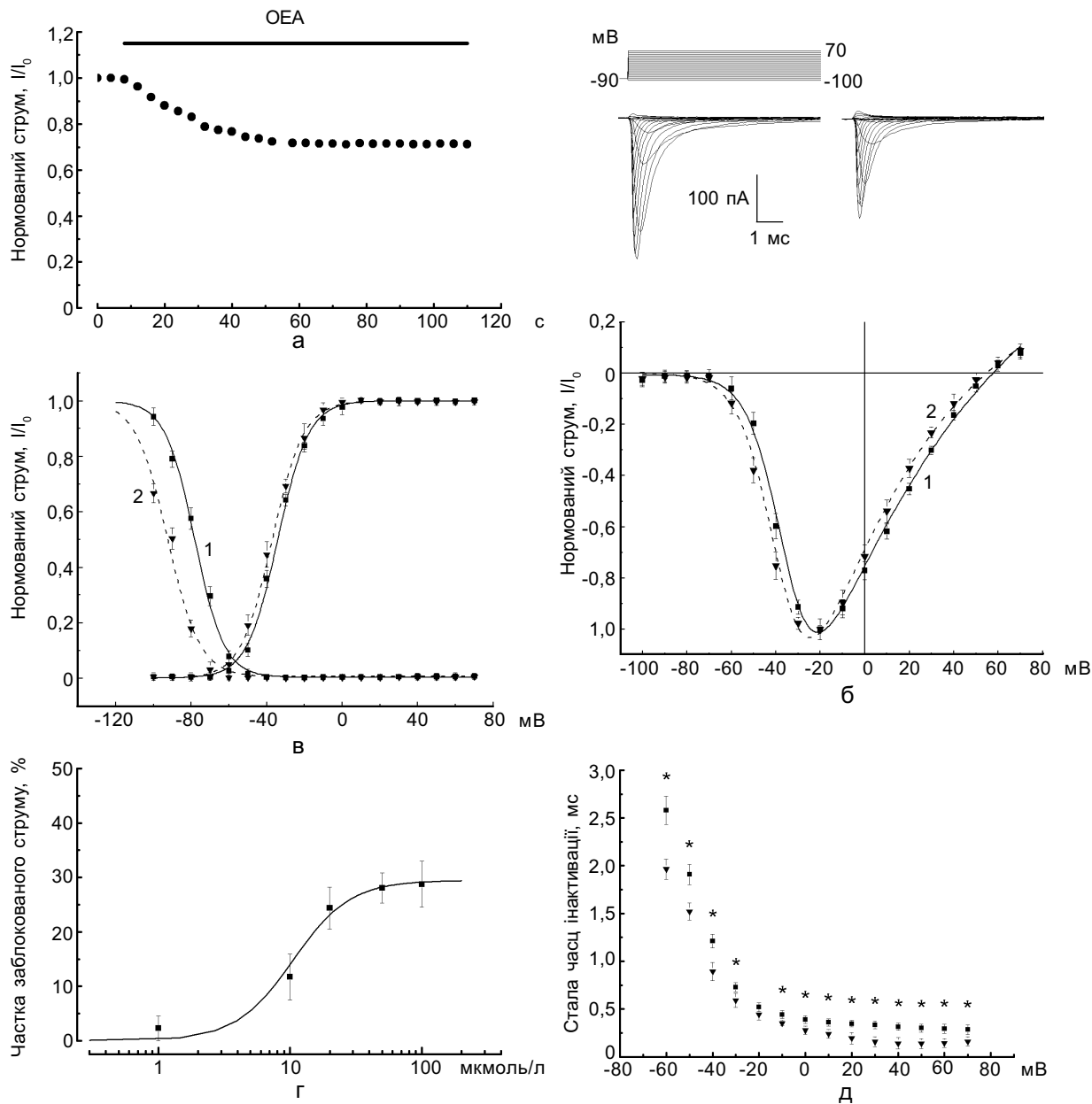


Рис. 2. Вплив N-олеїлетаноламіну (OEA) на струм через натрієві канали кардіоміоцитів: а – зміна амплітуди натрієвого струму (I_{Na}) в відповідь на тестовий імпульс потенціалу -20 мВ внаслідок прикладання 100 мкмоль/л OEA, б – вольт-амперні залежності за контрольних умов (1; $n=10$) та за наявності 100 мкмоль/л OEA (2; $n=6$); амплітуди струмів були нормовані на максимальне значення в кожному випадку; суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних точок добутком функцій Больцмана та Годмана–Ходжкіна–Каца; зверху показані типові записи струмів та протокол стимуляції до (зліва) та після прикладання 100 мкмоль/л OEA, в – криві стаціонарної активації та інактивації натрієвих струмів за контрольних умов (1; $n=10$) та за наявності 100 мкмоль/л OEA (2; $n=6$); суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних точок функцією Больцмана, г – дозозалежність блокуючої дії OEA на I_{Na} при потенціалі -20 мВ, суцільна лінія є апроксимацією експериментальних точок функцією Хіла ($n=6$), позначення символів ті самі, що і на б, д – зміна часу інактивації натрієвого струму під дією OEA ($n=6$), позначення символів ті самі, що і на б. * $P < 0,05$

Порівняння нормованих записів контрольних I_{Na} з I_{Na} за наявності 100 мкмоль/л NSE або ОАЕ при $V_m = -20$ мВ (див. рис. 1, д і 2, д) виявило також помітне прискорення кінетики інактивації струмів під дією NAE без суттєвого впливу на кінетику активації. Апроксимація фази спаду струмів експоненційною функцією дала змогу встановити, що при $V_m = -20$ мВ постійна часу інактивації τ_i зменшується з контрольного значення $0,52 \pm 0,05$ до $0,46$ мс $\pm 0,05$ мс за наявності NSE і до $0,44 \pm 0,06$ за наявності ОЕА. Достовірне прискорення інактивації I_{Na} спостерігалось і при інших потенціалах в діапазоні -60 – $+40$ мВ.

ОБГОВОРЕННЯ

Як показують наші результати, NSE та ОАЕ здатні зменшувати I_{Na} кардіоміоцитів, що значною мірою пояснює описаний нами раніше ефект зниження цими речовинами амплітуди та швидкості наростання серцевого ПД [22]. В основі зменшення лежать три дії NSE та ОАЕ на серцеві ПЗНК: 1) їх безпосереднє неповне блокування, 2) гіперполяризаційний зсув їх стаціонарної інактивації, результатом чого є часткова інактивація каналів при потенціалі спокою та 3) деяке прискорення кінетики інактивації. Всі три дії, особливо величина безпосереднього блоку, є помітно більш вираженими для одноненасиченого ОЕА порівняно з насиченим NSE. Збільшення функціонального впливу NAE на канали-мішені зі збільшенням ступеня їх ненасиченості було показано раніше [16].

ПЗНК плазматичної мембрани непейсмейкерних кардіоміоцитів майже виключно представлені їх тетродоксинрезистентною $Na_v1,5$ -ізоформою (ген *SCN5A*). Тому зміну біофізичних властивостей натрієвих струмів, описаних у нашій роботі, можна віднести до впливу NSE саме на $Na_v1,5$ -канали.

NSE і ОЕА дещо гіперполяризують

потенціалзалежність стаціонарної активації натрієвих каналів. Цей ефект не опосередкований зміною поверхневого заряду, оскільки експериментальні умови передбачають вбудовування ліпиду в зовнішню частину ліпідного бішару. Поява додаткового незначного позитивного примембранного заряду означала би зміщення потенціалзалежності в бік додатних потенціалів. Хоч імовірним є і механізм накопичення NAE з внутрішнього боку мембрани внаслідок неспецифічного чи з участю специфічних фліпаз переходу із зовнішнього боку [23]. Подібне зміщення активаційної кривої спостерігалось при дії синтетичного аналога анандаміду WIN55,212-2 на натрієві канали нейронів тригемінальних гангліїв [10], але не в разі блокування анандамідом тетродоксинрезистентних натрієвих каналів (найімовірніше $Na_v1,8$) нейронів задньокорінцевих гангліїв щурів [13]. Наші досліди не виявили достовірної зміни в часі активації струму під впливом NSE і ОЕА, можливо, через недостатню швидкість оцифровування сигналу. В згаданій роботі з блокування анандамідом ПЗНК нейронів задньокорінцевих гангліїв щурів [13], проте, було виявлено зменшення часу їх активації за подібних експериментальних умов.

Обидва представники NAE модулювали інактиваційні властивості натрієвих каналів, зміщуючи криву стаціонарної інактивації в бік негативних потенціалів і прискорюючи час спаду струму. Подібні ефекти спостерігалися в роботах з безпосереднього блокування анандамідом натрієвих і низькопорогових кальцієвих каналів [5, 13]. Втрата ефекту внаслідок блокування транспортуючих систем для анандаміду змусила зробити висновок, що він безпосередньо модулює кальцієві канали переважно з внутрішнього боку плазматичної мембрани [4]. Існування як порівняно специфічних для окремих представників NAE (анандаміду і N-пальмітоїлетаноламіну), так і неспецифічних транспортерів

указує на можливість подібної поведінки і для інших представників NAE, зокрема NSE і ОЕА, хоча встановлення цього факту вимагає прямих експериментів.

Інгібування натрієвого струму, як правило, відбувалося менше ніж через 4 с після прикладання обох NAE та розвивалося поступово, а їх стаціонарний ефект спостерігався приблизно через 1 хв. Наші експерименти поки не дають змоги встановити можливий механізм блокування – безпосереднє зв'язування з білковим комплексом натрієвого каналу, через G-білокспряжені мембранні рецептори, або внаслідок вбудування NAE в мембрану та пов'язану з цим зміну її в'язкості, поверхневого натягу та локальної мікрокривизни. Зміщення потенціалзалежностей активації та інактивації в бік від'ємних потенціалів може пояснюватися впливом досліджуваних ліпідів на рух сенсорів потенціалу ПЗНК, яке також може зумовлюватися кожним з цих механізмів.

Відомо, що блокування NAE кальцієвих каналів Т-типу залежить від ненасиченості та є найбільшим для арахідоноїлетаноламіну (20:4) і докозагексаноїлетаноламіну (22:6). Крім того, було показано, що структурний аналог ОЕА олеамід безпосередньо інгібує ПЗНК клітин нейробластоми N1E115, викликаючи подібні зміни потенціалзалежності інактивації та синаптосомах мозку мишей [12]. Ці факти свідчать на користь безпосереднього зв'язування як механізму дії ОЕА на натрієві канали.

Видається ймовірним, що блокування NSE і ОЕА натрієвих каналів у серці, є лише одним з багатьох впливів, які чинять ці ліпіди на серцевий м'яз і знижують збудливість і негативний інотропний ефект [9]. Саме блокування NSE і ОЕА натрієвих каналів викликає зменшення амплітуди та початкової швидкості наростання ПД передсердних, шлуночкових ендо- та епікардіальних клітин у культурі неонатальних кардіоцитів [22].

О.И. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛ- И N-ОЛЕОИЛЭТАНОЛАМИНА НА ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ КАРДИОМИОЦИТОВ

К группе N-ацилэтанолamines (NAE) относятся липиды, способные влиять на функционирование ионных каналов плазматической мембраны клеток без участия канabinоидных рецепторов. Тем не менее действие разных представителей NAE на потенциалзависимые натриевые каналы (ПЗНК) в сердечной ткани прямо не показано. В данной работе мы исследовали модуляцию насыщенным N-стеарилэтанолamineм (NSE) и одноненасыщенным N-олеилэтанолamineм (OEA) биофизических свойств ПЗНК плазматической мембраны неонатальных кардиомиоцитов. NSE в диапазоне концентраций 1–200 мкмоль/л существенно не влиял на амплитуду входящего натриевого тока (I_{Na}), но смещал кривые его стационарной активации и инактивации на 2,4 и 10,6 мВ соответственно (при 100 мкмоль/л) в сторону гиперполяризации. Кинетика активации тока под действием NSE не изменялась, а инактивация в диапазоне потенциалов -60 – -30 мВ ускорялась приблизительно в 1,2 раза. В отличие от NSE, OEA дозозависимо блокировал I_{Na} с $K_D = 11,4 \pm 1,6$ мкмоль/л и величиной максимального блока $30 \% \pm 3 \%$, а также вызывал больший по сравнению с NSE гиперполяризационный сдвиг кривых стационарной активации и инактивации тока (-6,4 мВ и -14,0 мВ соответственно при 100 мкмоль/л OEA). OEA практически не изменял кинетику активации I_{Na} , но сильнее, чем NSE, ускорял кинетику его инактивации. Таким образом, оба представителя NAE влияют на потенциалзависимость активации, инактивации и кинетику I_{Na} . В то же время эти действия более выражены для одноненасыщенного OEA, который к тому же еще и частично подавлял ток. Описанные эффекты NSE и OEA на натриевые каналы могут частично обуславливать снижение возбудимости кардиомиоцитов под действием этих липидов в норме и патологии.

Ключевые слова: неонатальные кардиомиоциты, N-ацилэтанолamines, потенциалзависимые натриевые каналы, инактивация.

O.I. Voitychuk, V.S. Asmolkova, N.M. Gula, M.Oz, Y.M. Shuba

THE EFFECTS OF N-STEAROYL- AND N-OLEOYLETHANOLAMINE ON CARDIAC VOLTAGE-DEPENDENT SODIUM CHANNELS

The group of N-acylethanolamines (NAE) includes lipids that are capable of modulating plasma membrane ion channels without involvement of cannabinoid receptors. However, the action of various members of NAE on voltage-gated Na^+ channels

(VGSC) in cardiac tissue is still not fully elucidated. Here using patch-clamp technique we have studied the modulation of biophysical properties of VGSC of neonatal cardiomyocytes by saturated N-stearoyl ethanolamine (NSE) and monounsaturated N-oleoyl ethanolamine (OEA). NSE in 1-200 μM concentration range did not significantly alter the amplitude of inward Na^+ current (I_{Na}), but 100 μM NSE shifted its steady-state activation and inactivation curves in hyperpolarization direction by 2.4 mV and 10.6 mV, respectively. Activation kinetics of the current was not changed by NSE, but its inactivation was accelerated by about 1.2-fold in the -60 – -30 mV range of membrane potentials. Unlike NSE, OEA dose-dependently inhibited I_{Na} with $K_D = 11.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$ and maximal block at saturating concentration of $30 \pm 3 \%$. It also stronger than NSE shifted current's steady-state activation and inactivation curves (-6.4 mV and -14.0 mV, respectively, at 100 μM) in hyperpolarization direction. The effect of OEA on I_{Na} activation kinetics was negligible, but it more pronouncedly than NSE accelerated inactivation of the current. Thus, both members of NAE influence the voltage-dependence of activation, inactivation and kinetics of I_{Na} . These effects were more prominent for monounsaturated OEA, which also partially blocked I_{Na} . The discovered effects of NSE and OEA on VGSCs may in part be responsible for the decrease of cardiomyocytes' excitability by these lipids under normal as well as pathologic conditions.

Keywords: neonatal cardiomyocytes, N-acyl ethanolamines, voltage-dependent sodium channels, inactivation.

International center for molecular physiology of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv;

Palladin Institute of biochemistry of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv;

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, UAE University, Al Ain, UAE

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alexander S.P., Kendall D.A. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism // *Brit. J. Pharmacol.* – 2007. – **152**, № 5. – P. 602–623.
- Bachur N.R., Masek K., Melmon K.L., Udenfriend S. Fatty Acid Amides of Ethanolamine in Mammalian Tissues // *J. Biol. Chem.* – 1965. – **240**, № 3. – P. 1019–1024.
- Bradshaw H.B., Walker J.M. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators // *Brit. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**, № 4. – P. 459–465.
- Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Nargeot J., Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide // *EMBO J.* – 2001. – **20**, № 24. – P. 7033–7040.
- Chemin J., Nargeot J., Lory P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, № 4. – P. 2314–2323.
- Chen C., Bazan N.G. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection // *Prostaglandins and Other Lipid Mediat.* – 2005. – **77**, № 1–4. – P. 65–76.
- Di Marzo V., Melck D., De Petrocellis L., Bisogno T. Cannabimimetic fatty acid derivatives in cancer and inflammation // *Ibid.* – 2000. – **61**, № 1–2. – P. 43–61.
- Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling // *Physiol Rev.* – 2003. – **83**, № 3. – P. 1017–1066.
- Frol'kis V.V., Artamonov M.V., Zhukov O.D., Klimashevs'kii V.M., Marhitych V.M., Hula N.M. [Influence of saturated long-chain N-acyl ethanolamines on lipid composition and heart contractility of isolated rat heart under ischemia-reperfusion] // *Ukr Biokhim Zh.* – 2000. – **72**, № 1. – P. 56–63.
- Fu H., Xiao J.M., Cao X.H., Ming Z.Y., Liu L.J. Effects of WIN55,212-2 on voltage-gated sodium channels in trigeminal ganglion neurons of rats // *Neurol Res.* – 2008. – **30**, № 1. – P. 85–91.
- Gulaya N.M., Melnik A.A., Balkov D.I., Volkov G.L., Vysotskiy M.V., Vaskovsky V.E. The effect of long-chain N-acyl ethanolamines on some membrane-associated functions of neuroblastoma C1300 N18 cells // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 1993. – **1152**, № 2. – P. 280–288.
- Hiley C.R., Hoi P.M. Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? // *Cardiovasc Drug Rev.* – 2007. – **25**, № 1. – P. 46–60.
- Kim H.I., Kim T.H., Shin Y.K., Lee C.S., Park M., Song J.H. Anandamide suppression of Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons // *Brain Res.* – 2005. – **1062**, № 1–2. – P. 39–47.
- Leaf A., Xiao Y.F., Kang J.X., Billman G.E. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids // *Pharmacol. Therap.* – 2003. – **98**, № 3. – P. 355–377.
- Nicholson R.A., Liao C., Zheng J., David L.S., Coyne L., Errington A.C., Singh G., Lees G. Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain // *Brain Res.* – 2003. – **978**, № 1–2. – P. 194–204.
- Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels // *Curr Pharm. and Des.* – 2006. – **12**, № 2. – P. 227–239.
- Park K.A., Vasko M.R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons // *Trends Pharmacol Sci.* – 2005. – **26**, № 11. – P. 571–577.
- Rogers T.B., Gaa S.T., Allen I.S. Identification and characterization of functional angiotensin II receptors on cultured heart myocytes // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 1986. – **236**, № 2. – P. 438–444.
- Schmid H.H., Schmid P.C., Berdyshev E.V. Cell signaling by endocannabinoids and their congeners: questions of selectivity and other challenges // *Chem. Phys. Lipids.* – 2002. – **121**, № 1–2. – P. 111–134.
- Schuel H., Burkman L.J. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of

- neurons and sperm // Biol. Reprod. – 2005. – **73**, № 6. – P. 1078–1086.
21. Veldhuis W.B., van der Stelt M., Wadman M.W., van Zadelhoff G., Maccarrone M., Fezza F., Veldink G.A., Vliegenthart J.F., Bar P.R., Nicolay K., Di Marzo V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases // J. Neurosci. – 2003. – **23**, № 10. – P. 4127–4133.
22. Voitychuk O.I., Asmolkova V.S., Hula N.M., Sotkis H.V., Oz M., Shuba Ia M. Regulation of the excitability of neonatal cardiomyocytes by N-stearoyl- and N-oleoyl-ethanolamines // Fiziol. Zh. – 2009. – **55**, № 3. – P. 55–66.
23. Wang J., Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2009. – **89**, № 3–4. – P. 112–119.

*Міжнарод. центр молекул. фізіології НАН України, Київ;
Ин-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
Ун-т Об'єднаних Арабських Еміратів*

*Матеріал надійшов
до редакції 11.01.2010*

А. М. Тальнов

Кореляція змін частоти гіпокампального θ -ритму з сигнальним значенням звукових стимулів, прихованими періодами та тривалістю умовно-рефлекторних пересувань у щурів

На щурах, які вільно пересувалися, в умовах водної депривації дослідили зміни гіпокампального θ -ритму під час вироблення умовного рефлексу (одержання питного підкріплення після пред'явлення позитивного умовного звукового стимулу). Було показано, що правильна поведінкова реакція (відвідування поїлки) у відповідь на позитивний умовний стимул в умовах диференціювання двох звукових стимулів супроводжувалася підвищенням частоти θ -ритму. Хоча підвищення частоти спостерігалось тільки у відповідь на позитивний умовний стимул, воно було тісно пов'язане з процесом диференціювання – підвищення частоти θ -ритму ставало достовірним, після того як тварини впродовж тренування починали відрізняти умовний позитивний стимул від негативного. Детальний аналіз показав, що виявлене підвищення частоти θ -ритму складалося з двох послідовних хвиль. Перша з них в часі виникнення була пов'язана з моментом пред'явлення умовного позитивного стимулу, а друга – з часом виникнення та тривалістю пересування до поїлки. При цьому частота була достовірно вищою при виконанні правильних поведінкових відповідей у порівнянні з помилковими. Отже, частота θ -ритму підвищувалася при аналізі сенсорної інформації, коли треба було виділити сигнал, який спонукав тварину йти до підкріплення та вийти зі стану внутрішнього гальмування. З іншого боку, частота підвищувалася при організації цілеспрямованих рухів.

Ключові слова: гіпокамп, θ -ритм, умовні рефлекси.

ВСТУП

Основною особливістю гіпокампальної електроенцефалограми (ЕЕГ) є наявність у її складі коливань з частотою 6–9 Гц, відомих як θ -ритм. Цей ритм у тварин, які вільно пересувалися, мав тенденцію змінюватися залежно від динамічного стану тварин [6, 8, 29]. Велика кількість досліджень продемонструвала, що показники θ -ритму змінювалися залежно від характеристик таких довільних рухів, як пересування, орієнтовно – дослідницька поведінка, стрибки тощо [2, 4, 7, 16, 17, 20, 28]. Також θ -ритм стабільно виникав в умовах локомотивної тварин [24].

Разом з тим існує досить багато досліджень, в яких показано, що θ -ритм не пов'язаний виключно з моторною функцією, а має функціональне відношення і до обробки сенсорної інформації та її сигнального значення [1, 3, 9, 13, 22]. На початку дослідження цих функцій θ -ритму їх протиставляли одна одній, але на сьогодні, скоріш за все, визнається їх сумісне існування. Проте є поодинокі праці [7, 32], в яких паралельно досліджувались зміни θ -ритму відносно сенсорної та моторної функції при навчанні та реалізації цільного поведінкового акту.

Мета цієї роботи – дослідження змін частоти гіпокампального θ -ритму в часі від

подачі умовного стимулу до переміщення тварини до поїлки для підкріплення. Тварина повинна була навчитися відрізнити два звукові стимули (позитивний і негативний) в умовах нечастого застосування позитивного стимула на тлі частого застосування негативного стимула, 20 та 80 % відповідно. Порівнювались зміни θ -ритму в часі в 100 перших реалізаціях після початку навчання та в 100 фінальних реалізаціях. В цих серіях порівнювались зміни θ -ритму у відповідях на позитивний і негативний стимули.

МЕТОДИКА

Експерименти було виконано відповідно до Європейської директиви ради громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Щурів лінії Long Evans утримували в умовах добового циклу світло/темрява у співвідношенні 12/12 з вільним доступом до їжі. Кількість питної води не обмежувалась до початку навчання, потім щури отримували воду як підкріплення під час експериментальної сесії та протягом 15 хв після кожної сесії.

10 самців щурів масою 300–400 г анестезували еквітезіном (3 мл/кг внутрішньоочередивно) та поміщали в стереотаксичний апарат. Два ніхромових дроти у лаковій ізоляції діаметром 80 мкм кожна, імплантували перпендикулярно до кліткових шарів у гіпокамп (4,2 мм назад від брегми, 2 мм латерально від середньої лінії, 2,5 та 3 мм в глибину від брегми). Два стимулювальних електроди (ніхромові дроти 80 мкм у лаковій ізоляції) імплантували в кутовий пучок (8 мм назад від брегми, 5,7 мм латерально від середньої лінії, 5 мм в глибину від брегми) для стимуляції волокон перфорантного шляху. Маленькі гвинти з нержавіючої сталі фіксували у кістці черепа, один над оксипітальною корою (V2ML), яка у щурів лежить над дорсальним гіпокампом (5 мм назад від брегми, 3 мм латерально від середньої лінії) та інший над нюховою цибулиною (8 мм уперед від брегми, 3 мм латерально від середньої

лінії). Ще два гвинта розташовували над мозочком як земляний і референтний електроди. Після завершення дослідів тварин анестезували, пропускали через глибинні електроди постійний електричний струм (+20 мА упродовж 20 с) та робили транскардіальну послідовну перфузію фізіологічного розчину, розчину червоної кров'яної солі та 10%-го розчину формаліну. Головний мозок препарували та робили фронтальні зрізи (40 мкм), які фарбували крезил-віолетом. Положення електродів установлювали за допомогою світлового мікроскопа.

Через тиждень після операції тварин піддавали водній депривації протягом 23 год, після чого вони зберігали більше, ніж 90 % початкової маси. На тлі депривації тварини навчались підходити до поїлки та отримувати воду після нанесення звукового тону (8 кГц) – позитивний кондиціонувальний стимул ($КС^+$) та ігнорувати поїлку після нанесення тону (4 кГц) – негативний кондиціонувальний стимул ($КС^-$). Тривалість кожного тону становила 50 мс, інтенсивність 84 дБ, тони наростали до максимуму та спадали до нуля за 5 мс. Тони подавали у псевдовипадковому порядку з таким розрахунком, що зі 100 пред'явлень $КС^+$ з'явиться 20–25 разів (20–25 %), а $КС^-$ – 75–80 разів (75–80 %). Після пред'явлення $КС^+$ тварини мали нагоду підійти до поїлки та отримати кілька крапель води, отримати воду можна було тільки в перші 6 с після $КС^+$. Світловий промінь переривався, коли щури встромляли ніс у поїлку, це переривання передавалося у комп'ютер, який запускав подачу води та подальші пред'явлення кондиціонувальних стимулів. Рухи тварин виявляли за допомогою маленького магнітоіндуктивного пристрою, який кріпився в оксипітальній частині черепа. Електричні сигнали, що генерував цей пристрій, записували на жорсткий диск комп'ютера та використовували для вимірів прихованого періоду рухів. Після кожної експериментальної сесії

тварини отримували вільний доступ до води упродовж 15 хв.

Під час експериментальної сесії у щурів, які вільно рухалися, реєстрували відрізки ЕЕГ тривалістю 6 с включно з 1,5-секундним періодом перед початком кондиціонуючого стимулу. Записи ЕЕГ провадили в полосі пропускання підсилювача 0,1 Гц–1 кГц, відцифровували з розрізненням 2 кГц. Записані відрізки ЕЕГ сортували відповідно до виду КС та поведінкової відповіді на них та зберігали на жорсткому диску для подальшого аналізу.

Записи ЕЕГ в кожній пробі (пред'явлення відповідного КС) оцінювали візуально і тільки вільні від артефактів проби та проби без ознак сну та дрімоти прибрали для аналізу. ЕЕГ-записи від епідурального електрода над оксипітальною корою (V2ML), яка локалізована над дорсальним гіпокампом, аналізували за їхньою ритмічною якістю. Для цього розраховували показник ритмічності (θ -показник), як результат відношення потужності ЕЕГ, яка була відфільтрована в полосі 5–12 Гц, до потужності нефільтрованої ЕЕГ. Програмно створена хвиля, яка містила коливання з частотами 5–12 Гц, давала θ -показник 1,0. Псевдовипадковий аналоговий шум давав показник $<0,05$. Записи ЕЕГ з θ -показниками $>0,35$ рахувались як θ -ритмічні та $<0,2$ як неритмічні. Для оцінки змін частоти лімбажного θ -ритму в часі використовували безперервне хвильове перетворення Морлета [12, 29]. Вейвлет-аналіз є різновидом спектрального аналізу, в якому роль простих коливань відіграють особливі функції. Базисна функція вейвлет – це деяке «коротке» коливання, поняття частоти з класичного спектрального аналізу замінено масштабом. Для перекриття «короткими хвилями» всієї часової осі, запроваджено зсув функцій в часі. Таким чином, базис вейвлетів – це функції типу $\psi((t-b)/a)$, де b – зсув, a – масштаб. Для здійснення вейвлет-аналізу використовували пакет програм “Matlab”. Результати вейвлет-аналізу були викорис-

тані для побудови графіків залежності частоти θ -ритму в часі – 1,5 с до та 4,5 с після нанесення КС⁺ або КС⁻. Для цього кожні 2,5 мс на всьому відрізку ЕЕГ, який піддавали аналізу, визначали значення частоти, яка мала в цей момент максимальну потужність, і відклали це значення на осі ординат відповідно до часової осі (вісь абсцис). В результаті цих дій отримували графік зміни частоти максимальної потужності в часі в поодинокій спробі. В свою чергу графіки змін частоти в часі в поодиноких пробах усереднювали по 30, 50 або 100 проб.

Для статистичного аналізу вираховували медіани, середні та стандартні похибки. Достовірність різниці між групами вираховували методом Крускал-Валісса та застосуванням лінійного сумарного тесту Манна-Уїтні, попарні множинні порівняння робили за методом Дюнна. Для кореляційного аналізу використовували непараметричний лінійний тест Спірмана. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми “SigmaPlot” та програми для “NCSS 2000”.

РЕЗУЛЬТАТИ

На 7 тваринах були досліджені зміни частоти θ -ритму (5–12 Гц) в часі, до і після надбання двома кондиціонувальними стимулами (звукові тони 8 і 4 кГц) умовно позитивного (КС⁺) та умовно негативного (КС⁻) значень відповідно. На рис. 1, I, показані графіки зміни частоти θ -ритму протягом 0,75 с до та 2 с після нанесення КС⁺ у правильних (цілеспрямований рух до поїлки) та помилкових (відсутність цілеспрямованого руху до поїлки) спробах. Видно, що на початку навчання у нетренованих тварин, після нанесення КС⁺ частота θ -ритму дещо знижувалась як у правильних, так і в помилкових спробах (див. рис. 1, I, a). В 100 останніх експериментальних спробах у тренованих тварин у правильних спробах після нанесення КС⁺ частота

θ -ритму помітно підвищувалася з 7,25 Гц до 8,00 Гц, а в помилкових спробах знижувалася. Слід зазначити, що при цьому фонові частота θ -ритму (до нанесення $КС^+$) в помилкових спробах була помітно вищою за фонову частоту в спробах з правильними поведінковими відповідями (див. рис. 1, I, б). На рис. 1, II, показані графіки зміни частоти θ -ритму протягом 0,75 с до та 2 с після нанесення $КС^-$ у правильних і помилкових спробах. Перебіг частоти θ -ритму після нанесення $КС^-$ у правильних і помилкових спробах істотно не відрізнявся, як у 100 спробах на початку тренування, так і в 100 фінальних спробах. Можна відмітити невелике підвищення частоти θ -ритму у випадках, коли тварини помилково ходили до поїлки після нанесення негативного умовного стимулу $КС^-$. Коли тварини не ходили до поїлки після нанесення $КС^-$ частота трохи зменшувалась (див. рис. 1, II, б). Таким чином, суттєве підвищення частоти θ -ритму (рис. 1, I, б) спостерігалось тільки у відповідь на позитивний умовний стимул, лише у добре тренуваних тварин у разі правильних поведінкових відповідей.

Ми провели аналіз залежності ступеня підвищення частоти θ -ритму в реалізаціях з вірними правильними на $КС^+$ від ступеня тренуваності тварин (рис. 2, а). За ступінь тренуваності було взято кількість спроб, в яких тварини отримали підкріплення. Виявили, що частота θ -ритму після нанесення $КС^+$ ставала достовірно ($P < 0,01$) вищою від фонові частоти після 125 правильних спроб і продовжувала підвищуватися аж до 400-ї спроби, після чого виходила на плато. Такий самий аналіз змін частоти θ -ритму після нанесення $КС^-$ в помилкових спробах, тобто в спробах, де тварина після нанесення $КС^-$ відвідувала поїлку, не показав достовірного підвищення частоти, залежного від ступеня тренування. На рис. 2, в наведені криві навчання для $КС^+$ та $КС^-$, які показали, що після 125-ї правильної спроби кількість правильних поведінкових відповідей на $КС^-$ збільшувалася аж до 400-ї спроби. Не важко помітити, що момент, коли частота θ -ритму після пред'явлення $КС^+$ підвищувалася достовірно, під час навчання збігався з моментом, коли тварини починали ігнорувати поїлку у відповідь на $КС^-$. У свою чергу зростання частоти у

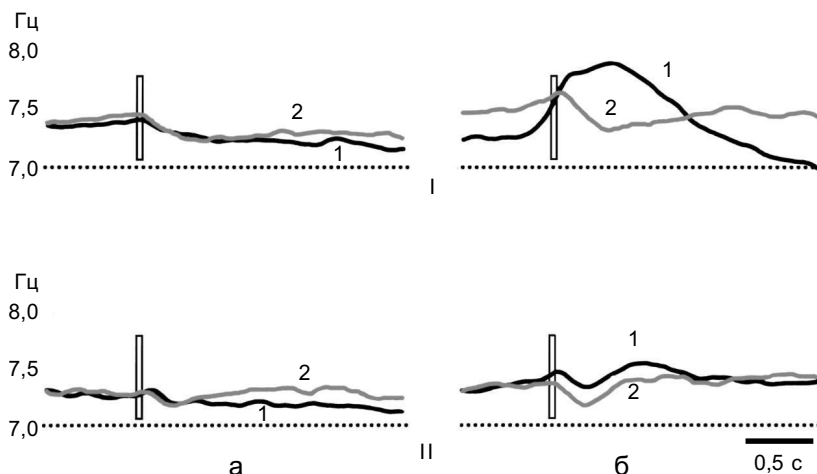


Рис. 1 Підвищення частоти гіпокампального θ -ритму у відповідь на позитивний кондиціонувальний стимул при умові виникнення адекватної поведінкової реакції. I, II – зміни частоти θ -ритму в часі до та після пред'явлення тваринам позитивного та негативного умовних стимулів відповідно; пунктирні горизонтальні лінії – частота електроенцефалограми (ЕЕГ) у 7 Гц; а – результати усереднення 700 спроб 7-ми тварин на початку тренування; б – результати усереднення 700 спроб 7-ми тварин в кінці тренування; 1 – зміни частоти ЕЕГ при відвідуванні поїлки; 2 – зміни частоти при ігноруванні обох стимулів (відсутність візитів до поїлки)

відповідь на $КС^+$ під час тренування продовжувалося доти, доки тварини не досягали максимального ігнорування поїлки у відповідь на $КС^-$ (75–80 % від кількості пред'явлених $КС^-$). В період тренувань на тлі збільшення частоти θ -ритму у відповідь на $КС^+$ у правильних поведінкових відповідях зменшувалась кількість міжсигнальних підходів до поїлки (див. рис. 2, г).

Подальший аналіз показав, що підвищення частоти θ -ритму, яке ми спостерігали, не було однорідним. При усередненні перебігу частоти θ -ритму у часі в спробах, розділених за прихованими періодами рухових реакцій, починаючи з групи спроб з прихованим періодом рухових реакцій 400 мс, на графіках з'являлися два піки підвищення частоти (рис. 3,а). Перший пік виникав тільки у правильних відповідях на $КС^+$ (тварина відвідувала поїлку), у помил-

кових відповідях на $КС^-$, де тварина також відвідувала поїлку, перший пік був відсутній. Це добре видно на рис. 3, а та на графіках порівняння пікової частоти першого підвищення θ -ритму при правильних відповідях на $КС^+$ з частотами, взятими в тих самих часових інтервалах (кореспондовані інтервали) при помилкових відповідях на $КС^-$ та з фоновими частотами перед $КС^+$ та $КС^-$ для випадків з різними прихованими періодами рухових реакцій (див. рис. 3,б). Рівень частоти θ -ритму в першому піку підвищення після нанесення $КС^+$ був достовірно вищим ($P < 0,001$) від рівня фонові частоти в тих самих спробах та рівня частоти в кореспондованих інтервалах після нанесення $КС^-$. Водночас не спостерігалося достовірної різниці між рівнем частоти θ -ритму в кореспондованих інтервалах після нанесення $КС^-$ і рівнем фонові частоти в тих самих спробах.

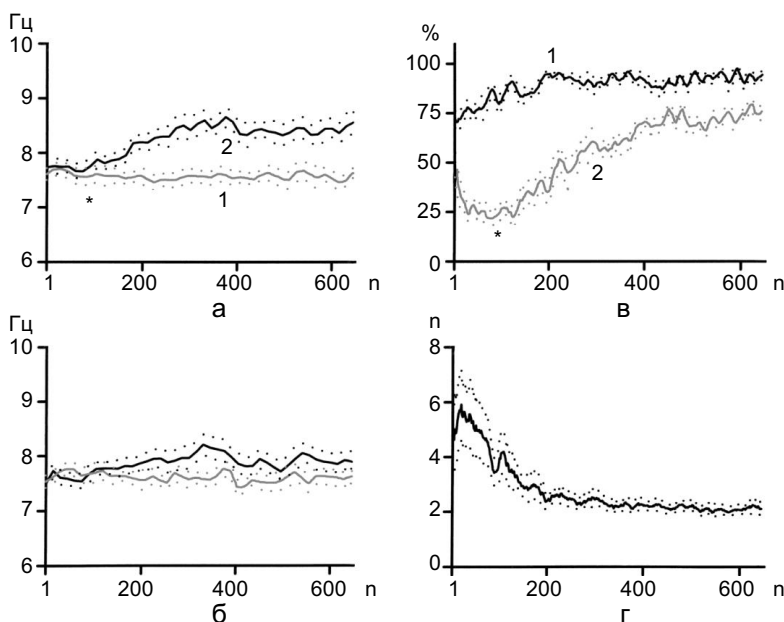


Рис. 2 Підвищення частоти гіпокампального θ -ритму під час вироблення умовного рефлексу та його диференціювання: а – залежність θ -частоти від кількості підкріплень у правильних відповідях на позитивний умовний стимул; 1 – частота до пред'явлення позитивного умовного стимулу, 2 – після; крапки показують стандартну похибку для кожної кривої. * $P < 0,01$; за віссю ординат відкладена частота в Гц, за віссю абсцис – кількість послідовних спроб; б – залежність θ -частоти від кількості спроб у помилкових відповідях на негативний умовний стимул; в – криві навчання, 1 – умовний рефлекс, 2 – його диференціювання; за віссю ординат відсоток правильних відповідей; * – момент коли кількість відповідей на негативний стимул почала стійко підвищуватись; г – залежність середньої кількості міжсигнальних підходів до поїлки в одній спробі від кількості проведених спроб

Другий пік підвищення частоти θ -ритму в правильних відповідях на KC^+ був достовірно більший від фонові частоти та від

другого піку підвищення частоти в помилкових відповідях на KC^- ($P < 0,001$). В свою чергу другий пік підвищення частоти

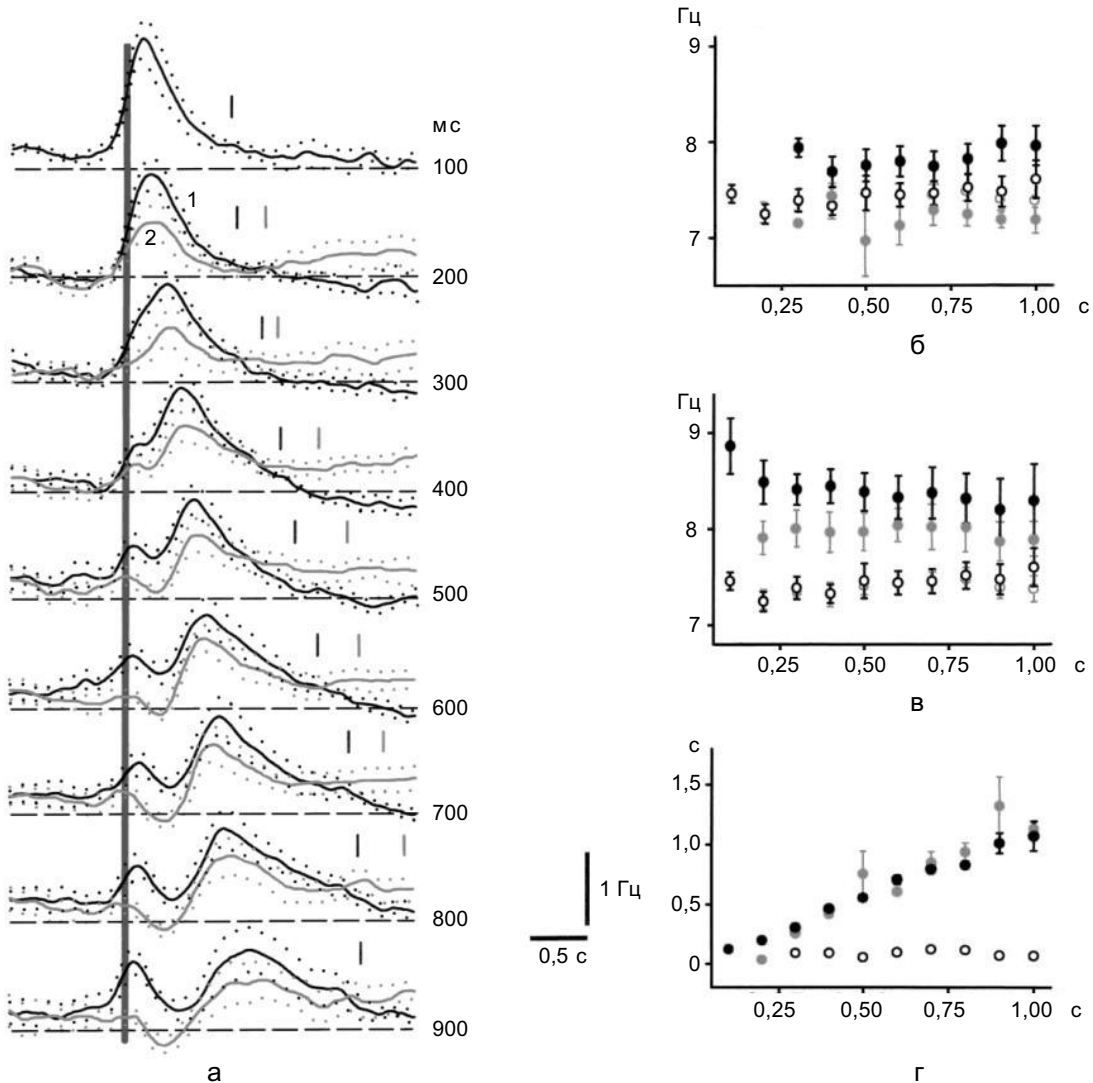


Рис. 3 Виявлення двох хвиль підвищення θ -частоти у правильних відповідях на позитивний кондиціонувальний стимул: а – усередненні графіки змін θ -частоти в часі ($n = 250$); цифри праворуч від графіків вказують прихований період рухових реакцій в поодиноких спробах; 1 – зміна частоти при правильних відповідях на позитивний умовний стимул, 2 – при помилкових відповідях на негативний умовний стимул, велика вертикальна лінія показує початок та тривалість умовних стимулів, горизонтальна пунктирна лінія – рівень частоти ЕЕГ у 7 Гц; короткі вертикальні лінії зліва направо позначають момент досягнення поїлки у відповідь на позитивні та негативні умовні стимули відповідно, б – значення пікової частоти першої хвилі підвищення θ -ритму при правильних відповідях на кондиціонувальний стимул – KC^+ (чорні заштриховані кружки) та при помилкових відповідях на KC^- (сірі заштриховані кружки); чорні та сірі кільця значення фонових частот до нанесення KC^+ та KC^- відповідно; за віссю ординат відкладена частота θ -ритму в Гц, за віссю абсцис – приховані періоди рухових реакцій в секундах, в – те саме, що і на „б” для другої хвилі підвищення θ -ритму, г – залежність часу виникнення піків першого та другого підвищення θ -ритму (вісь ординат) від прихованих періодів рухових реакцій (вісь абсцис); чорні кільця позначають час виникнення першого піку; чорні та сірі заштриховані кружки – час виникнення другого піку при правильній та помилковій відповіді на KC^+ та KC^- відповідно

θ -ритму в помилкових відповідях на $KС^-$ був достовірно більшим ($P < 0,001$) від фонові частоти в тих самих спробах (див. рис. 3,в). При цьому прихований період другого піку підвищення частоти як у правильних відповідях на $KС^+$, так і в помилкових на $KС^-$ мав позитивну кореляцію з прихованим періодом рухової реакції до поїлки, $R=0,998$, $P < 0,001$ та $R=0,979$, $P < 0,001$ відповідно (див. рис. 3,г). Водночас прихований період першого піку не залежав від прихованих періодів рухових реакцій (див. рис. 3,г). Слід відзначити, що два піки підвищення θ -частоти виникали у більшості досліджених тварин, але не у всіх. У одній з семи тварин

виникав тільки другий пік підвищення частоти, пов'язаний з руховою реакцією.

Окрім позитивної кореляції часу виникнення другого піку підвищення частоти θ -ритму з прихованими періодами рухових реакцій, було виявлено зв'язок між тривалістю рухів (час переміщення до поїлки) та тривалістю підвищення частоти в другому піці (рис. 4,а). При цьому виявилось, що у тварин, у яких виникали обидва піки підвищення частоти, час руху до поїлки був значно меншим в порівнянні з тваринами, які демонстрували тільки другий пік (див. рис. 4,б). Але в усіх випадках спостерігалася позитивна кореляція ($R=0,999$,

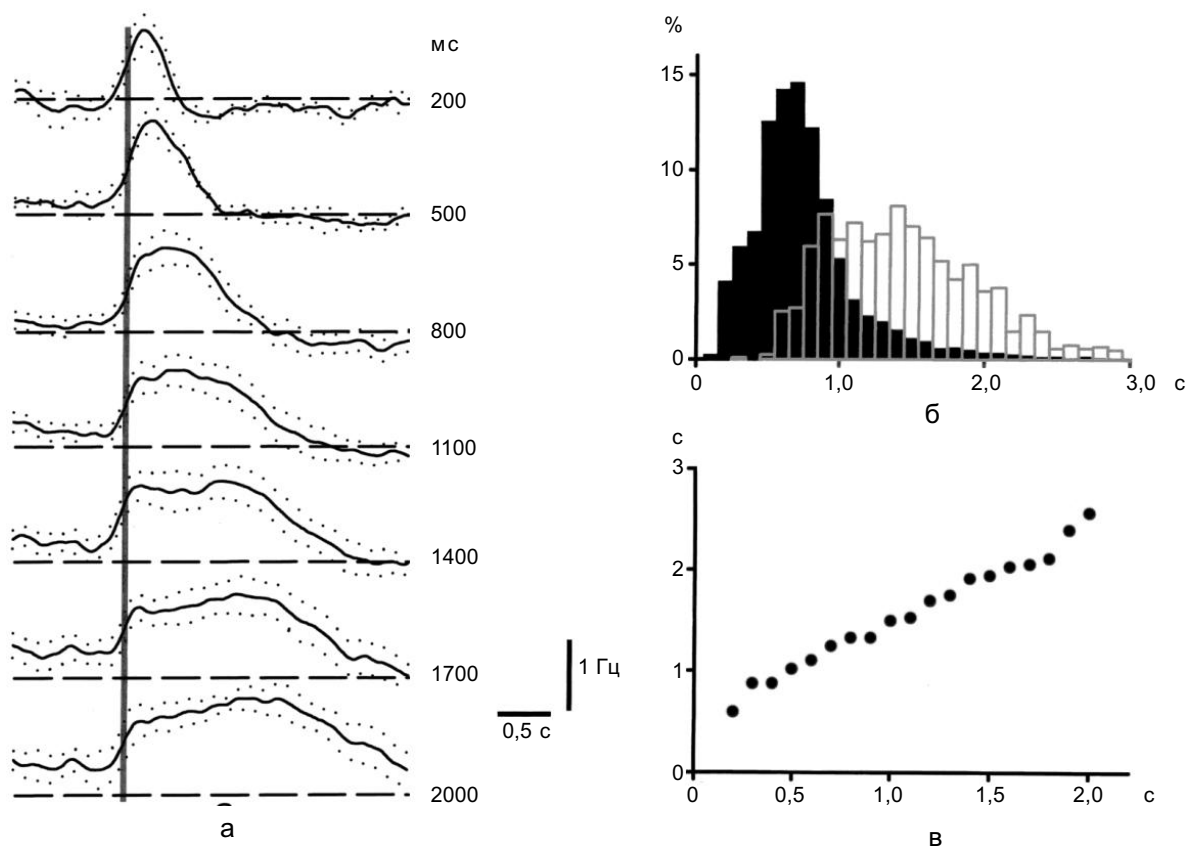


Рис. 4. Зв'язок тривалості другої хвилі підвищення θ -частоти з тривалістю руху до поїлки: а – усередненні графіки змін θ -частоти в часі ($n = 250$) синхронізовані по початку руху до поїлки (вертикальна лінія), цифри праворуч від графіків означають тривалість рухів в поодиноких спробах; горизонтальна пунктирна лінія – рівень θ -частоти у 7 Гц, б – гістограми розподілу тривалості рухів при виникненні обох хвиль підвищення θ -частоти (чорні заповнені стовпчики) та при відсутності раннього підвищення θ -частоти (сірі незаповнені стовпчики); за віссю абсцис відкладена тривалість руху (1 бін дорівнює 100 мс), за віссю ординат – кількість рухів відповідної тривалості в відсотках від загальної кількості рухів, в – кореляція тривалості підвищення θ -частоти з тривалістю переміщення до поїлки, за віссю абсцис відкладено тривалість руху, за віссю ординат – тривалість підвищення θ -частоти

$P < 0,001$) тривалості підвищення θ -частоти в другому піці з тривалістю переміщення до поїлки (див. рис. 4,в).

ОБГОВОРЕННЯ

Одержані нами результати показали, що в умовах, коли тварини повинні для одержання підкріплення розрізняти сенсорні сигнали та пов'язувати з ними свою подальшу рухову поведінку, виникало два типи підвищення частоти θ -ритму. Перший пік підвищення частот був зв'язаний з сенсорним сигналом (позитивний умовний стимул), а другий із руховою реакцією. Ці факти збігаються з літературними даними, які показали зміни θ -ритму у зв'язку як з сенсорними, так і з моторними процесами [1, 2, 3, 4, 7, 9].

Сучасні трактування функцій θ -ритму попри багато протиріч збігаються на тому, що однією з них є кодування та декодування аферентних сигналів в часі при їх запам'ятовуванні та відтворенні відповідно [18, 27, 30]. Одержані нами результати вказують на те, що роль гіпокампальної системи при відтворенні запам'ятовуваних сигналів досить специфічна. Підвищення частоти θ -ритму у відповідь на позитивний умовний стимул спостерігалось тільки після початку виникнення стану внутрішнього гальмування. Проте вже до початку вироблення внутрішнього гальмування кількість вірних поведінкових відповідей на позитивний умовний стимул сягала 80 % та більше. Тобто, тварини пам'ятали, що цей стимул пов'язаний з підкріпленням, але підвищення частоти θ -ритму не спостерігалось. Характерно, що в цей час тварини не відрізняли позитивний стимул від негативного, який не підкріплювався, і у відповідь на який вони ходили до поїлки в тих самих 80 % випадків. Більш ранні гіпотези стосовно функцій гіпокампа [10, 11, 23] припускали, що частина механізму пам'яті, яка пов'язана з гіпокампальною

(лімбічною) системою використовується для відрізняння аферентних потоків з метою виділення з них підкріплюваних стимулів та гальмування інших. Досліджена залежність підвищення θ -частоти від часу навчання показала, що момент (після 125 правильних спроб), коли різниця між частотами до пред'явлення позитивного умовного стимулу та після ставала достовірною ($P < 0,01$), збігався з моментом, коли тварини починали ігнорувати поїлку (початок внутрішнього гальмування) у відповідь на негативний умовний стимул. Після чого зростання частоти продовжувалося доти (400-та правильна спроба), доки тварини не починали ігнорувати поїлку (75 % випадків від кількості пред'явлених негативних стимулів), і тільки після цього частота θ -ритму виходила на плато. Таким чином, підвищення частоти θ -ритму у відповідь на позитивний умовний стимул було пов'язане насамперед з розвитком внутрішнього гальмування.

Відповідно до припущення Граштияна та Лішака [12, 19], в момент появи θ -ритму гіпокамп припиняє свій гальмівний вплив на загальну активуючу систему мозку і виникає стан подібний до "arousal". В наших експериментах диференціювання вироблялося за умов, коли позитивний і негативний стимули подавались у випадковому порядку в пропорції 20 та 80 % відповідно. Це означає, що приблизно 80 % часу експерименту, після випрацювання диференціювання тварини знаходились у стані внутрішнього гальмування, тобто вони не бігали до поїлки у відповідь на негативні умовні стимули. Можна припустити, що саме підвищення частоти θ -ритму після нанесення позитивного умовного стимулу виводило тварин зі стану внутрішнього гальмування. Про це свідчить той факт, що більшість тварин ходила до поїлки (правильні поведінкові відповіді, 80–90 % від кількості пред'явлених КС⁺) тільки у разі, коли після позитивного умов-

ного стимулу спостерігалось підвищення частоти θ -ритму. Якщо підвищення не було, тварини не відволікалися від своєї звичайної поведінки і не ходили до поїлки (помилкові відповіді, 10–20 % від кількості пред'явлених КС⁻).

Раніш у таких самих експериментальних умовах було показано, що при подачі нечастих позитивних стимулів поведінка тварин була правильною тільки після того, як через 100 мс після позитивного умовного стимулу нейрони гіпокампа в dentate gyrus активувалися з боку енторинальної кори. Ці синаптичні входи вимикалися, коли число позитивних стимулів зрівнювалось або було більшим, ніж число негативних, тобто позитивні стимули починали надходити досить часто і знову вмикалися, коли позитивні стимули почали надходити рідко. Отже, енторинальні збуджувальні входи до гіпокампа вимикають внутрішнє гальмування та спонукають тварину підійти до підкріплення [26]. Правдоподібним буде припущення, що підвищення частоти θ -ритму у відповідь на позитивний умовний стимул, яке спостерігали в нашому дослідженні, відбувалося внаслідок активації цих самих аферентних входів з боку енторинальної кори, пам'ятаючи про те, що входи до гіпокампа з боку енторинальної кори відіграють значну роль у механізмі генерації гіпокампального θ -ритму [15].

Як уже відмічалось, дуже багато робіт вказують на зв'язок показників θ -ритму з руховою діяльністю тварин, яку умовно можна характеризувати як довільну, на відміну від автоматичної рухової діяльності, такої, як грумінг, чесання тощо [5, 6, 8, 29]. І досі функція θ -ритму, який пов'язаний з довільними рухами, залишається невідомою. Найімовірнішим припущенням нині є думка, що θ -ритм відіграє важливу роль у навігації тварин, кодуючи та декодуючи просторову інформацію виділенням у гіпокампі груп послідовно активованих

“place”-нейронів [14, 21, 25]. Одержані нами результати чітко вказують на те, що друге за часом підвищення частоти θ -ритму пов'язане з руховою реакцією тварин. Час виникнення підвищення частоти та його тривалість добре корелює як з прихованим періодом руху, так і з його тривалістю відповідно. При цьому частота ритму достовірно підвищувалася відносно фоновій як при рухах до поїлки після позитивного умовного стимулу, так і при помилкових рухах у відповідь на негативний умовний стимул. Все це узгоджується з гіпотезами, які пов'язують зміни θ -ритму з переміщеннями в просторі, а також кодуванням і декодуванням інформації для здійснення правильного переміщення, в нашому дослідженні переміщення до поїлки. Проте і в цьому разі ми виявили, що зміни частоти θ -ритму були зв'язані не тільки з питанням, куди переміщується тварина, а також з питанням, навіщо вона переміщується. Про це свідчить факт достовірно вищої частоти θ -ритму при переміщенні тварин до поїлки після КС⁺, порівняно з переміщенням після КС⁻. Ми припускаємо, що в першому випадку тварина знала, що іде пити, а в другому вона йшла перевірити, чи не змінився зв'язок між стимулами та підкріпленням. Останнє припущення витікає з факту неможливості виробити 100%-го гальмування, скільки б довго ви його не виробляли. Завжди залишалися 10–20 % відвідувань поїлки у відповідь на негативний умовний стимул, як ми вважаємо, для контролю можливої зміни ситуації. Відмінності показників θ -ритму, які виникали залежно від того, рухалися тварини до підкріплення чи ні, описано також Wallenstein та співавт. [32].

Таким чином, частота θ -ритму збільшувалася як при аналізі сенсорної інформації, так і при організації цілеспрямованих рухів. В першому випадку це було пов'язано з виділенням сигналу про можливе підкріплення та виходом зі стану внут-

рішнього гальмування, а в другому – з організацією рухів, які вели до підкріплення.

А.М. Тальнов

КОРРЕЛЯЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ЧАСТОТЫ ГИПОКАМПАЛЬНОГО θ -РИТМА С СИГНАЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ ЗВУКОВЫХ СТИМУЛОВ, СКРЫТЫМИ ПЕРИОДАМИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНЫХ ПЕРЕДВИЖЕНИЙ У КРЫС

На свободно передвигающихся крысах, в условиях водной депривации исследовали изменения гиппокампального θ -ритма во время выработки условного рефлекса (получение питьевого подкрепления после предъявления положительного условного звукового стимула). Было показано, что правильная поведенческая реакция (посещение поилки) в ответ на положительный условный стимул в условиях дифференцирования двух звуковых стимулов сопровождалась повышением частоты θ -ритма. Хотя повышение частоты наблюдалось только в ответ на условный положительный стимул, оно было тесно связано с дифференцированием – повышение частоты θ -ритма становилось достоверным, после того как животные, в период обучения, начинали различать условный положительный и условный отрицательный стимулы. Детальный анализ показал, что обнаруженное повышение частоты θ -ритма состояло из двух последовательных волн. Первая по времени возникновения была связана с моментом предъявления условного положительного стимула, а вторая – со временем возникновения и длительностью перемещения к поилке, как после нанесения условного положительного стимула (правильные поведенческие ответы), так и после условного отрицательного стимула (ошибочные ответы). При этом частота была достоверно выше во время правильных поведенческих ответов, по сравнению с ошибочными. Делается вывод, что частота θ -ритма увеличивалась при анализе сенсорной информации, когда нужно было выделить сигнал, ведущий к подкреплению, и выйти из состояния внутреннего торможения. С другой стороны, частота увеличивалась при организации целенаправленных движений.

Ключевые слова: гиппокамп, θ -ритм, условный рефлекс.

A. M. Talnov

CORRELATIONS OF HIPPOCAMPAL THETA FREQUENCY WITH CONDITIONED STIMULI, MOTOR LATENCY AND MOVING TIME IN RATS

The hippocampal theta rhythm was studied during an adaptive behaviour elaboration (a receiving of drinking reward in response on a specific audio stimulus) in freely moving water deprived rats. It was revealed that a right behavioral response (a drinking tank visit) in conditions of discrimination of two

sound stimuli emerged only in case of the theta rhythm frequency increase in response on the positive conditional stimulus. Although this increase occurred only in response to positive signal it was also linked with the differentiation process – the theta rhythm frequency increase became significant when animals started to recognize positive and negative conditional stimuli. The detailed analysis revealed the detected theta rhythm frequency increase consisted of two waves. One of them was connected with the positive conditional stimulus presentation moment. The other one was connected with the time of appearance and duration of movement to drinking tank after positive conditional stimulus presentation (right behavioral answers) as well as after negative conditional stimulus (wrong answers). At the same time the frequency was significantly higher during right behavioral answers comparing with wrong ones. It is concluded that the theta rhythm frequency increased during the sensory information analysis when it was needed to choose a signal leading to reinforcement and to exit from the state of the internal inhibition. On the other hand the frequency increased during the purposive movements.

Key words: hippocamp, θ -rhythm, conditioned reflex.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Меликов Э.М. Функциональная дифференциация и-ритма гиппокампа у кошек // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1985. – **35**, № 3. – С. 457–464.
2. Павлова И.В., Ванециан Г.Л. Активность нейронов неокортекса и гиппокампа кроликов при ориентировочно-исследовательском поведении и замирании // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2006. – **92**, № 11. – С. 1273–1284.
3. Преображенская Л.А. Гиппокампальный и-ритм и двигательная активность // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1974. – **24**, № 1. – С. 227–235.
4. Федотова И.П. Высоочастотная компонента гиппокампальной тета-активности // Там же. – 2003. – **53**, № 1. – С. 70–80.
5. Bland B.H. The physiology and pharmacology of the hippocampal formation theta rhythms // Prog. Neurobiol. – 1986. – **26**. – P. 1–54.
6. Bland B.H., Colom L.V. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex // Prog. Neurobiol. – 1993. – **41**. – P. 157–208.
7. Bland B.H., Jackson J., Derrie-Gillespie D. et al. Amplitude, frequency, and phase analysis of hippocampal theta during sensorimotor processing in a jump avoidance task // Hippocampus. – 2006. – **16**, № 8. – P. 673–681.
8. Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus // Neuron. – 2002. – **33**. – P. 1–16.
9. Buzsaki G., Haubenreiser J., Grastybn E. et al. Hippocampal slow wave activity during appetitive and aversive conditioning in the cat // Electroencephalogr.

- Clin. Neurophysiol. – 1981. – **51**, №3. – P.276–290.
10. Deadwyler S., West M., Lynch G. Activity of dentate granule cells during learning: differentiation of perforant path input // Brain Res. – 1979. – **169**. – P. 29–43.
 11. Douglas R.J. The hippocampus and behavior // Psychol. Bull. – 1967. – **67**, № 6. – P. 416–422.
 12. Goupillaud P., Grossmann A., Morlet J. Cycle-Octave and Related Transforms in Seismic Signal Analysis // Geoexploration. – 1984–1985. – **23**. – P. 85–102.
 13. Grastyan E., Lissóck K., Madarósz J., Danhoffer H. Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes // EEG and Clin. Neurophysiol. – 1959. – **11**, №3. – P.409–430.
 14. Jeewajee A., Lever C., Burton S. et al. Environmental novelty is signaled by reduction of the hippocampal theta frequency // Hippocampus. – 2008. – **18**, № 4. – P. 340–348.
 15. Huxter J., Burgess N., O'Keefe J. Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells // Nature. – 2003. – **425**. – P. 828–832.
 16. Kocsis B., Bragin A., Buzsáki G. Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis // J. Neurosci. – 1999. – **19**. – P. 6200–6212.
 17. Leung L.S. Pharmacology of theta phase shift in the hippocampal CA1 region of freely moving rats // Electroencephalogr. Clin. Neurol. – 1984. – **58**. – P.457–466.
 18. Leung L.W. Model of gradual phase shift of theta rhythm in the rat // J. Neurophysiol. – 1984. – **52**. – P. 1051–1065.
 19. Lisman J.E., Idiart M.A. Storage of 7 ± 2 short-term memories in oscillatory subcycles // Science. – 1995. – **267**. – P. 1512–1515.
 20. Lissak K., Grastyan E., Csanaky A. et al. A study of hippocampal function in the waking and sleeping animal with chronically implanted electrodes // Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. – 1957. – **6**. – P. 451–459.
 21. Oddie S.D., Bland B.H. Hippocampal formation theta activity and movement selection // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1998. – **22**, №2. – P. 221–231.
 22. O'Keefe J., Recce M.L. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm // Hippocampus – 1993. – **3**. – P. 317–330.
 23. Olvera-Cortés E., Guevara M.A., González-Burgos I. Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity // Brain Res. Bull. – 2004. – **62**, №5. – P.379–384.
 24. Pribram K.H. The limbic system, efferent control of neural inhibition and behavior // Progr. Brain Res. – 1967. – **27**. – P. 318–336.
 25. Shin J., Talnov A. A single trial analysis of hippocampal theta frequency during nonsteady wheel running in rats // Brain Res. – 2001. – **897**, № 1–2. – P.217–221.
 26. Skaggs W.E., McNaughton B.L., Wilson M.A., Barnes CA. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences // Hippocampus. – 1996. – **6**. – P. 149–172.
 27. Talnov A. N., Quiñones Quiroga R., Meier M. et al. Entorhinal inputs to dentate gyrus are activated mainly by conditioned events with long time intervals // Ibid. – 2003. – **13**, №6. – P. 755–765.
 28. Tesche C.D., Karhu J. Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, №2. – P.919–924.
 29. Torrence C., Compo G.P. A practical guide to wavelet analysis // Bull. Amer. Meteorol. Soc. – 1998. – **79**. – P. 61–78.
 30. Vanderwolf C.H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat // Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. – 1969. – P. 407–418.
 31. Vertes R.P., Hoover W.B., Viana Di Prisco G. Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance // Behav. Cogn. Neurosci. Rev. – 2004. – **3**. – P. 173–200.
 32. Wallenstein G.V., Hasselmo M.E. GABAergic modulation of hippocampal population activity: sequence learning, place field development, and the phase precession effect // J. Neurophysiol. – 1997. – **78**. – P. 393–408.
 33. Wilson M.A., McNaughton B.L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space // Science. – 1993. – **261**, №5124. – P. 1055–1058.
 34. Wyble B.P., Hyman J.M., Rossi CA., Hasselmo M.E. Analysis of theta power in hippocampal EEG during bar pressing and running behavior in rats during distinct behavioral contexts // Hippocampus. – 2004. – **14**, №5. – P.662–674.

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

Матеріал надійшов до редакції 24.06.2009

I.V. Melnick

Electrically silent neurons in substantia gelatinosa of the rat spinal cord

Substantia gelatinosa (SG) neurons are usually categorized on three main types: tonic, adapting and delayed firing (DFNs), based on characteristic firing response evoked by sustained stimulation. Here, the existence of electrically silent neurons (ESNs, 9.3 %) is reported by using patch-clamp recording and confocal microscopy in spinal cord slices from 3-5 weeks-old rats. Those neurons does not generate spikes at their resting membrane potential (~ -69 mV) but only at preliminary depolarization to > -60 mV. In the latter case, spikes appeared starting from the end of stimulation, which is characteristic feature of DFNs. With the exception of APs block, all other passive and active electrophysiological properties of ESNs and DFNs were similar. Their main morphological properties (vertical orientation of dendritic tree and axonal trajectory) were close too. A distinctive feature of ESNs was larger amplitude of outward A-type K^+ current (K_A). The results suggest that the latter might cause a block of APs in ESNs, while these cells likely are a functional (i.e., non-firing) subtype of DFNs. The role of DFNs in descending control of pain transmission via modulation of its K_A is hypothesized.

Key words: spinal cord, substantia gelatinosa, firing pattern, action potentials, A-type current, pain.

INTRODUCTION

Substantia gelatinosa (SG) or lamina II of the spinal cord plays an important role in the processing of nociceptive and thermoreceptive information. SG cells receive monosynaptic input from afferent fibers and relay it further to projection neurons located in laminae I and IV-V. Therefore, SG cells operate as interneurons in sensory dorsal horn networks. Their structural and physiological characteristics are highly heterogeneous, however. Morphologically, there have been described a variety of neuronal cell types [4, 5, 7, 12–14, 20, 21]. According to physiological classification, three major groups have been shown: neurons with tonic, adapting and delayed firing (DFNs) [1, 5, 11–14, 18, 19, 22]. The latter has distinct electrophysiological and morphological properties. Among the first are a high threshold of action potentials (APs) in

response to stimulation, appearance of APs starting from the end of stimulus (i.e., with delay) and possession of high amplitude sub-threshold K^+ current of A-type (K_A), which activates before inward Na^+ current and thus is believed to be a cause of APs delay [5, 10, 13, 17, 18]. Morphologically, DFNs have vertical orientation of their dendritic and axonal trees [13]. Here, I report the existence of electrically silent neurons (ESNs), which do not respond by APs to stimulation at their resting membrane potential (RMP). Despite this distinctive feature, all other physiological and morphological properties of ESNs are similar with those of DFNs, except of the larger amplitude of K_A in silent neurons. The results suggest that the larger K_A might cause not only a delay but also a full block of APs in ESNs, while the latter likely is a functional subgroup of DFNs in substantia gelatinosa. It is proposed that DFNs might have a role in

descending control of pain transmission via modulation of its K_A .

METHODS

Patch-clamp recordings were performed on 300- μ m parasagittal and coronal slices prepared from the lumbar enlargement of the spinal cord of 3-5 week-old Sprague-Dawley rats. The animals were anesthetized by N-pentobarbital (30 mg/kg ip). Slices were incubated in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) for >30 min at 32-33°C before experiments (carried at similar temperature). Lamina II was identified as a translucent band in the dorsal horn. The neurons were visualized by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) optics of a Zeiss FS2 microscope (Carl Zeiss, Germany). ACSF contained (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.3; NaH₂PO₄, 1.4; NaHCO₃, 26; glucose, 10 (pH 7.4 when bubbled with 95% O₂ - 5% CO₂). Pipettes had resistances of 5-7 MW when filled with an internal solution containing (in mM): K-gluconate, 125; KCl, 4; MgATP, 5; NaGTP, 0.3; EGTA, 5; HEPES, 5; neurobiotin, 0.2 % (pH adjusted to 7.25 with KOH, osmolarity adjusted to 295 mOsm). Pipette tips were filled separately, with internal solution without neurobiotin. The MultiClamp 700B amplifier was used for recordings. Signals were filtered at 3 kHz and digitized at 10 kHz using a computer interface (Digidata 1322) and pCLAMP 9.2 software (Axon Instruments, Burlingame, CA). Recordings were not corrected for the liquid junction potential. Series resistance was <25 MW and was not compensated. Firing of APs was evoked by 500 ms depolarizing current steps of varying intensities (range 10-650 pA). Passive electrical properties of cells were measured as described earlier [14]. Following recordings, slices were fixed in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C for 48 h. After washing overnight in 20 % sucrose solution, unsectioned slices were incubated with neutravidin-conjugated Alexa

594 (1:300) for 1 h, washed with PBS and mounted in Prolong® anti-fading medium (Molecular Probes). Images (1-2 μ m interval) were taken and processed with a Zeiss LSM510 confocal microscope. Data are presented as mean \pm S.E.M. They were statistically analyzed by Student t-test, and probability level $P < 0.05$ was taken as significant.

RESULTS

The recordings were obtained from 108 neurons, which were categorized based on their typical firing response (i.e., firing pattern) evoked by sustained depolarization of increasing amplitude [14]. A small proportion of nerve cells (9.3 %) at their natural RMP did not respond by APs to stimulation of any intensity (Fig. 1, Aa); such cells were called “electrically silent neurons” (ESNs). This non-responsiveness did not result from the cell’ damage or some other technical reasons, judging on their negative RMP (-69 ± 1.4 mV) and high values of input resistance (701 ± 122 MW). The overall shape of depolarizing membrane response in ESNs (notably, a notch on depolarizing phase and its gradually increasing amplitude to the end of stimulation) was similar to that of subthreshold responses in DFNs (Fig. 1, traces 2-3 in panel Aa vs. trace 1 in panel Ba). With sufficient membrane depolarization to > -60 mV, ESNs were able to fire usual APs with a delay starting from the end of depolarization (Fig. 1, Ab), which was again similar to the behavior of DFNs (Fig. 1, Ba, traces 2-3). The delay in DFNs decreased with membrane depolarization (Fig. 1, traces 2^s in panels Ba vs. Bb). This voltage sensitivity was quantified for both DFNs and ESNs (Fig. 1, C). From the graph, it was evident that, qualitatively, the delay behaved similarly in both cell types, in ESNs however the voltage dependence was shifted to more positive potentials. All other passive electrical properties of two cell types were close too (RMP and input resistance of DFNs, -68 ± 1.2 mV and 675 MW respectively, were not different

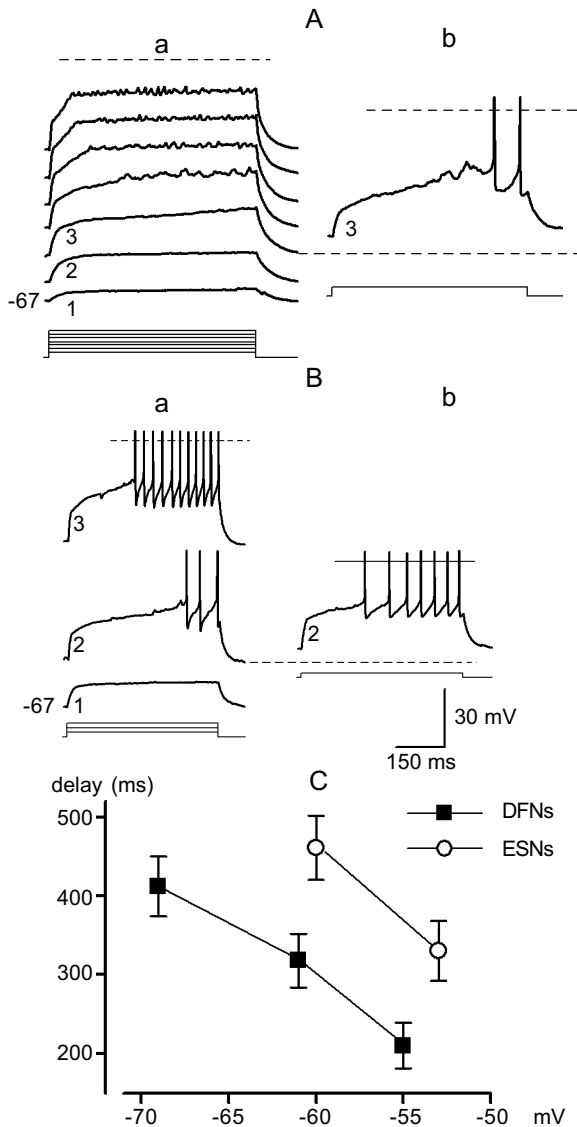


Fig. 1. Firing behavior of electrically silent (ESNs) and delayed firing neurons (DFNs). (A-B) Voltage responses of ESN (Aa) and DFN (Ba) to depolarizing currents of increasing intensity (protocol is shown below traces). ESN did not generate action potentials (APs) to stimulations. Upper dashed line in all panels show 0 mV level for the last (upper) trace. RMP is indicated near the first response. (Ab), stimulation of previously depolarized ESN by ~ 9 mV evoked APs. The intensity of stimulation is the one used for trace 3^a from the panel a, RMP is the same for traces 3^a in both panels (indicated by dotted line). (Bb), depolarization of DFN shorten the delay in APs. The intensity of stimulation is the one used for trace 2^a from the panel a, RMP is the same for traces 2^a in both panels (indicated by dotted line). (C) Voltage dependence of the delay before first AP in DFN and ESNs ($n = 5$ in both groups). The curve for ESN is shifted in depolarized direction

from the values for ESNs mentioned above, $P > 0.5$, unpaired t-test).

The prominent feature of DFNs is the expression of high-amplitude K_A [7, 13, 18]. The properties of ESNs and DFNs were compared in this respect. Figure 2 (A and B) shows ionic currents evoked by voltage steps to between -55 and -35 mV delivered after a hyperpolarizing pre-pulse to -120 mV to remove inactivation. Both ESNs (A) and DFNs (B) had fast K_A activated at subthreshold voltages, i.e. before Na^+ current. Initial I-V curves are demonstrated on panel C, dotted and solid lines schematically show activation of Na^+ spike. Such presentation of only initial I-V curves was chosen to minimize the voltage error inevitable in recording of high-amplitude currents. As evident from the panel C, the K_A current was significantly larger in ESNs.

Morphology of neurobiotin-filled and reconstructed in parasagittal slices ESNs was studied using confocal microscopy and compared with that of DFNs [13]. The orientations of dendritic tree and axon trajectory are considered as the most important morphological criteria, which indicates directionality of information processing in the spinal dorsal horn [4, 5, 20]. Individual ESN could have quite variable appearance, e.g., shape and size of the soma, number and width of primary dendrites, their branching pattern, etc. However the overall orientation of their dendritic trees was predominantly vertical (6 out of 9 cells), as in DFNs (Fig. 3). Similarly, their axons went to lamina I and in 3 cases both to lamina I and III.

DISCUSSION

SG neurons are known for the large variability of their properties. Here I report the existence of previously unrecognized cell group in SG with remarkable electrical behavior, the neurons of which were unable to generate APs at RMP (ESNs). With membrane depolarization to > -60 mV, ESNs did generate APs. This suggests, first, that some ionic current is ac-

tive at RMP and effectively blocks APs, and second, preliminary membrane depolarization inactivates the current and unblocks the APs. Such voltage dependence of firing is known specifically for DFNs and is attributable to powerful K_A , which activates at subthreshold potentials and causes the delay in APs generation [7, 10, 13, 18]. In agreement, ESNs possessed even larger K_A than DFNs suggesting that it might cause not only the delay but also a block of APs generation. K_A is known to inactivate strongly at negative subthreshold potentials [10] and it matches well with our experiments, where ESNs started generating spikes after preliminary depolarization. How-

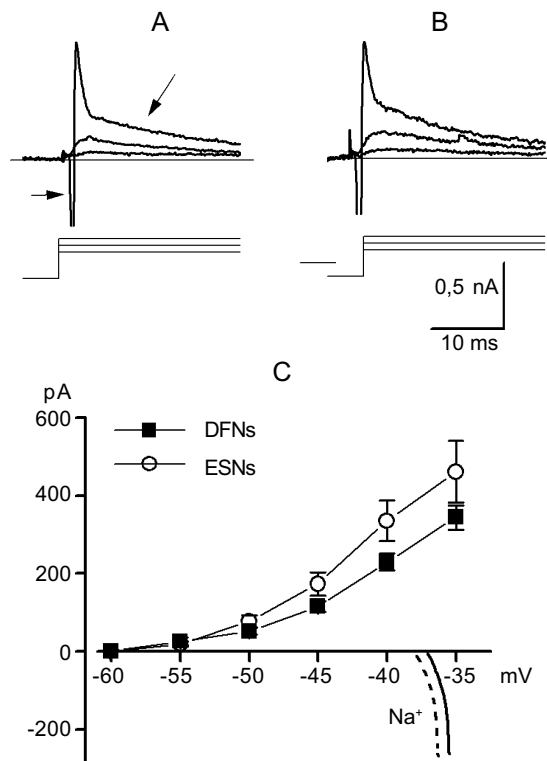


Fig. 2. Voltage-clamp recordings of subthreshold currents in delayed firing (DFNs, A) and electrically silent (ESNs, B) neurons. Voltage protocol is the same and shown below traces. Both cell types possessed outward A-type K^+ current (K_A) activating before inward Na^+ current (arrow). (C) Initial I-V curve of K_A in DFNs (filled) and ESNs (open symbols). Activation of Na^+ current is shown schematically for both groups by dashed and solid lines, respectively. ESNs had larger K_A ($P < 0.03$, unpaired t-test, $n = 6$)

ever, to prove definitely the causative relation between the expression of K_A and block of APs, further experiments with selective pharmacological suppression of the current

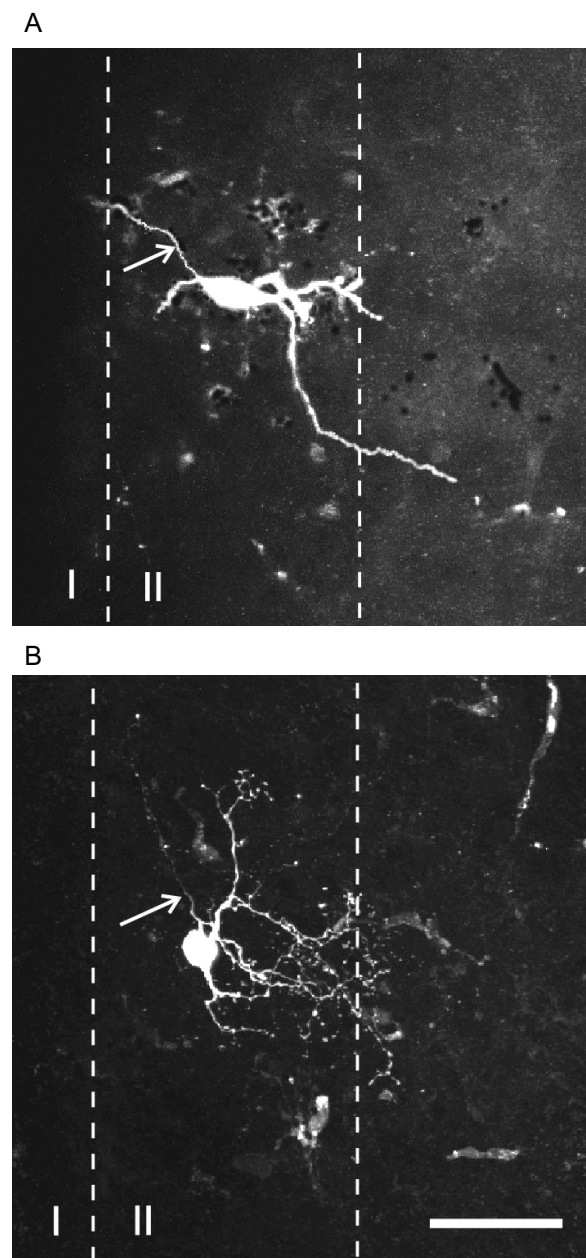


Fig. 3. Morphologic appearance of electrically silent (ESN, A) and delayed firing neuron (DFN, B) in parasagittal slices. Confocal images of cells are presented as summed Z-projections. Dashed lines indicate borders between laminae (numbered). Arrows point to axon-like processes. Calibration bar, 50 μ m

are needed. All other tested electrophysiological and morphological properties of ESNs and DFNs were similar suggesting that they might be the same physiological type of neurons in dorsal horn networks; ESN might represent then a non-firing state, i.e. a silent mode, of DFNs due to up-regulation of K_A . If it is the case, the functional impact of ESNs on sensory processing can be much larger than if to judge based on their rare abundance; really, DFNs and ESNs together constitute about one third of SG neurons. Vertical orientation of their dendritic and axonal trees suggests that those neurons perform interlaminar integration by acquiring synaptic input from several spinal layers and transmitting it to projection cells, the axons of which form spinothalamic tract [17]. Their physiological features fit well with this idea. Really, the delay and high rheobase of APs in DFNs indicates that significant summation of afferent impulses (i.e., in frequency and amplitude) must happen before neuronal activation. The appearance and role of ESNs then can be hypothesized within following physiological scenario. Numerous descending fibre systems have been described in the dorsal spinal cord, which are supposed to be involved in antinociception, i.e. in regulation of pain neurotransmission [15]. These fibers might release various neuromodulators from their terminals (e.g., oxytocin, serotonin, noradrenalin, dopamine) [2, 3, 6, 9, 16], which might up-regulate the K_A in DFNs and thus “turn” them off; the latter would efficiently modulate sensory processing. In principle, the properties of the channels mediating K_A can be changed by phosphorylation via various protein kinases [8, 10]. Those kinases, in turn, can be activated in situ by different mechanisms, e.g., via β -adrenergic receptors, as was shown in hippocampal neurons [8]. To give more physiological weight to this hypothesis, the properties of K_A in DFNs of SG and its modulation by relevant neurotransmitters both in vitro and in situ have yet to be demonstrated.

CONCLUSIONS

1. Electrically silent neurons (ESNs) are found in rat Substantia Gelatinosa. They do not generate action potentials (APs) in response to stimulations at their resting membrane potential, but only with preliminary depolarization.

2. All electrophysiological and morphological properties of ESNs, except of APs block, are similar to those of delayed firing neurons (DFNs).

3. ESNs possessed significantly larger A-type K^+ current than DFNs, which is presumably a cause for APs block.

І.В. Мельник

ЕЛЕКТРИЧНО НЕЗБУДЛИВІ НЕЙРОНИ В ЖЕЛАТИНОЗНІЙ СУБСТАНЦІЇ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ

За типом генерації потенціалів дії (ПД) нейрони желатинозної субстанції спинного мозку звичайно підрозділяють на тонічні, з адаптацією та нейрони затриманої генерації (НЗГ). В експериментах на зрізах спинного мозку 3–5-тижневих щурів за допомогою методів patch-clamp-реєстрації та конфокальної мікроскопії була виявлена група електрично незбудливих нейронів (ЕНН, 9,3 %), які не генерували ПД у відповідь на стимуляцію при їх власному мембранному потенціалі (близько -69 мВ). ПД могли активуватися лише при деполяризації мембрани до -60 мВ, при цьому вони з'являлися, починаючи з кінця стимуляції – характерна риса для НЗГ. Були схожими також майже всі інші електрофізіологічні та морфологічні властивості ЕНН і НЗГ. На відміну від останніх, ЕНН мали більшу амплітуду калієвого струму А-типу (K_A), що, вірогідно, і блокувало ПД. Таким чином, припускається, що ЕНН і НЗГ належать до єдиної функціональної популяції нейронів желатинозної субстанції. Збільшення K_A у частини таких нейронів, наприклад під дією деяких нейромедіаторів чи модуляторів, призводить до їх електричного блоку, що може відігравати значну роль у контролі проведення больової інформації. Ключові слова: спинний мозок, желатинозна субстанція, біль, потенціали дії, тип генерації, струм А-типу.

И.В. Мельник

ЭЛЕКТРИЧЕСКИ НЕВОЗБУДИМЫЕ НЕЙРОНЫ ЖЕЛАТИНОЗНОЙ СУБСТАНЦИИ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

По способу генерации потенциалов действия (ПД) нейроны желатинозной субстанции спинного мозга обычно подразделяют на тонические, адаптирующие и задержанной генерации (НЗГ). В экспериментах на срезах спинного мозга

3–5-недельных крыс при помощи методов patch-clamp-регистрации и конфокальной микроскопии была обнаружена группа электрически молчащих нейронов (ЭНН, 9,3%), которые не генерировали ПД в ответ на стимуляцию при их естественном мембранном потенциале (примерно -69 мВ). ПД могли активироваться лишь при предварительной деполяризации мембраны до -60 мВ, при этом они появлялись с задержкой – характерная черта НЗГ. Были сходными также почти все другие электрофизиологические и морфологические свойства ЭНН и НЗГ. В отличие от последних, ЭНН имели большую амплитуду калиевого тока А-типа (K_A), что, вероятно, и блокировало ПД. Таким образом предполагается, что ЭНН и НЗГ принадлежат к единой физиологической популяции нейронов желатинозной субстанции. Увеличение K_A у части таких нейронов, например под действием некоторых медиаторов или модуляторов, приводит к их электрическому блоку, что может иметь важную роль в контроле проведения болевой информации.

Ключевые слова: спинной мозг, желатинозная субстанция, боль, потенциалы действия, тип генерации, ток А-типа.

REFERENCES

1. Мельник И.В. Физиологические типы нейронов желатинозной субстанции спинного мозга крысы // *Нейрофизиология*. – 2008. – **40**. – С. 191–198.
2. Оксамитный В.Н., Тамарова З.А. Деполяризующее действие дофамина на терминалы первичных афферентных волокон изолированного сегмента спинного мозга крысят // *Там же*. – 1987. – **19**. – Р. 741–748.
3. Тамарова З.А. Влияние вазопрессина и окситоцина на потенциалы дорсального корешка изолированного перфузируемого спинного мозга крысят // *Там же*. – 1988. – **20**. – Р. 757–763.
4. Gobel S. Golgi studies of the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus // *J. Comp. Neurol.* – 1975. – **162**. – Р. 397–416.
5. Grudt T.J., Perl E.R. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn // *J. Physiol.* – 2002. – **540**. – Р. 189–207.
6. Hasegawa Y., Ono H. Descending noradrenergic neurones tonically suppress spinal presynaptic inhibition in rats // *Neuroreport*. – 1995. – **7**. – Р. 262–266.
7. Heinke B., Ruscheweyh R., Forsthuber L., Wunderbaldinger G., Sandkuhler J. Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice // *J. Physiol.* – 2004. – **560**. – Р. 249–266.
8. Hoffman D.A., Johnston D. Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**. – Р. 3521–3528.
9. Holden J.E., Farah E.N., Jeong Y. Stimulation of the lateral hypothalamus produces antinociception mediated by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT3 receptors in the rat spinal cord dorsal horn // *Neurosci.* – 2005. – **135**. – Р. 1255–1268.
10. Jerng H.H., Pfaffinger P.J., Covarubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2004. – **27**. – Р. 343–369.
11. Lopez-Garcia J.A., King A.E. Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input // *Eur. J. Neurosci.* – 1994. – **6**. – Р. 998–1007.
12. Melnick I.V. Morphophysiological properties of islet cells in substantia gelatinosa of the rat spinal cord // *Neurosci. Lett.* – 2008. – **446**. – Р. 65–69.
13. Melnick I.V. Morphophysiological properties of delayed firing neurons in substantia gelatinosa of the rat spinal cord // *Фізіол. журн.* – 2009. – **55**, № 2. – Р. 44–49.
14. Melnick I.V., Santos S.F., Szocol K., Szucs P., Safronov B.V. Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat // *J. Neurophysiol.* – 2004. – **91**. – Р. 646–655.
15. Millan M.J. Descending control of pain // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – **66**. – Р. 355–474.
16. Miranda-Cardenas Y., Rojas-Piloni G., Martinez-Lorenzana G., Rodriguez-Jimenez J., Lopez-Hidalgo M., Freund-Mercier M.J., Condes-Lara M. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist // *Pain*. – 2006. – **122**. – Р. 182–189.
17. Ruscheweyh R., Ikeda H., Heinke B., Sandkuhler J. Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro // *J. Physiol.* – 2004. – **555**. – Р. 527–543.
18. Santos S., Melnick I.V., Safronov B.V. Selective postsynaptic inhibition of tonic-firing neurons in substantia gelatinosa by μ -opioid agonist // *Anesthesiology*. – 2004. – **101**. – Р. 1177–1183.
19. Thomson A.M., West D.C., Headley P.M. Membrane characteristics and synaptic responsiveness of superficial dorsal horn neurons in a slice preparation of adult rat spinal cord // *Eur. J. Neurosci.* – 1989. – **1**. – Р. 479–488.
20. Todd A.J., Lewis S.G. The morphology of Golgi-stained neurons in lamina II of the rat spinal cord // *J. Anat.* – 1986. – **149**. – Р. 113–119.
21. Yasaka T., Kato G., Furue H., Rashid M.H., Sonohata M., Tamae A., Murata Y., Masuko S., Yoshimura M. Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro // *J. Physiol.* – 2007. – **581**. – Р. 603–618.
22. Yoshimura M., Jessell T.M. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro // *J. Neurophysiol.* – 1989. – **62**. – Р. 109–118.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: igorm@biph.kiev.ua

Received 18.01.2010

Т.В. Берегова, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко

Вміст цинку та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі

Вміст цинку та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та клітинах Панета щурів підвищувався при одноразовому фізичному навантаженні та іммобілізації. Багаторазове фізичне навантаження та іммобілізація викликали, навпаки, зменшення концентрації цих компонентів у клітинах. Позитивна кореляція змін у двох видах клітин вказує на можливий функціональний зв'язок між ними.

Ключові слова: гранулоцити крові, іммобілізація, клітини Панета, секреторний матеріал, фізичне навантаження, цинк.

ВСТУП

Цинк відіграє дуже важливу роль в організмі: він необхідний для активності більшої частини металоензимів, підтримує інтегральну структуру та функцію біомембран [7–12]. Цитохімічно визначений цинк може бути показником функціонального стану клітин [1, 2]. Наявність цього металу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт ставить питання про можливість функціонального взаємозв'язку цих клітин. На користь такого положення говорять літературні дані про утворення та секрецію клітинами Панета та гранулоцитами крові (нейтрофілами) антимікробних пептидів (дефенсинів) [5, 6]. Заслуговують також на увагу повідомлення про вплив стресових факторів на згадані клітини [9].

Мета цієї роботи – вивчення функціональних зв'язків між клітинами Панета та гранулоцитами крові, порівняльні дослідження впливу стресових факторів на вміст цинку та секреторного матеріалу в цих клітинах.

МЕТОДИКА

Досліди було проведено на 74 білих безпородних щурах віком 0,5–1 рік, масою 220–315 г. Гострий стрес викликали одноразовим фізичним навантаженням (ОФН) або іммобілізацією (ОІ), хронічний — багаторазовим фізичним навантаженням (БФН) або іммобілізацією (БІ). При ОФН щурів поміщали в акваріум з температурою води 32 °С, де вони плавали протягом 2 год. У випадках з ОІ тварин прив'язували до станку за допомогою м'яких пов'язок на 6 год. При БФН та БІ такі процедури повторювали щоденно протягом 10 діб. Адреналін вводили підшкірно у дозі 0,05 мг/кг, преднізолон — внутрішньом'язово у дозі 5–10 мг/кг. В окремих дослідах використовували щурів, яким видаляли надниркові залози (адреналектомія).

При проведенні досліджень на щурах керувалися положеннями Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Кров на дослідження брали у щурів з хвоста. Частину мазків фіксували у парах формаліну впродовж 5 хв і забарвлювали дитизоном або метиловим фіолетовим-

флоксинам (МФФ).

Частину мазків одночасно фіксували та обробляли 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном (8-ТСХ) — селективним реагентом на цинк.

Робочий розчин дитизону готували п'ятиразовим розбавленням дистильованою водою його основного розчину. Для приготування останнього в колбочку з притертою пробкою наливали 45 мл дистильованої води, 0,9 мл 25%-го розчину гідроокису амонію, 600 мг дитизону. Суміш перемішували на водяній бані (70 °С) протягом 10 хв, пропускали крізь беззольний фільтр. Тривалість забарвлення мазків — 3 год, потім їх промивали дистильованою водою та заливали у гліцерин-желатин. Мазки розглядали під світловим мікроскопом.

Для проведення цитохімічної реакції 8-ТСХ застосовували 0,01%-й ацетоновий розчин барвника. Тривалість забарвлення 5 хв. Потім мазки промивали дистильованою водою (рН 8,0–8,5), заливали у гліцерин та досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа (світлофільтри ФС-1, ЖС-18).

Секреторний матеріал у гранулоцитах крові визначали забарвленням МФФ. Мазки, фіксовані у парах формаліну, забарвлювали протягом 1 хв 1%-м розчином метилового фіолетового, потім повторно фіксували (30 хв) у парах формаліну, забарвлювали 0,5%-м розчином флоксину (5 хв), промивали дистильованою водою, заливали у гліцерин-желатин і досліджували під світловим мікроскопом.

Для отримання цитохімічних реакцій на цинк у тонкій кишці (клубова), яку фіксували у холодному (4 °С) ацетоні впродовж 12 год, потім послідовно проводили через два ксилоли (по 15 хв у кожному), суміш 50%-го парафіну та 50%-го ксилолу (30 хв при 40 °С), два рідких парафіни (по 1,5 год у кожному при 56 °С) і заливали у парафін.

Зрізи завтовшки 5–10 мкм депарафінували обробкою в двох ксилолах і спиртах

(по 3 хв у кожному), потім забарвлювали робочим розчином дитизону (3 год), розглядали під світловим мікроскопом, або обробляли розчином 8-ТСХ і досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

Для визначення секреторного матеріалу в клітинах Панета використовували забарвлення зрізів гематоксилін-флоксинам. Шматочки клубової кишки фіксували протягом доби нейтральним формаліном, потім проводили через спирти зростаючої міцності (70, 80, 90, 96, 100°) — по 4 год у кожному. Далі проводили, як указано вище, через ксилоли, суміш ксилолу з парафіном, два рідкі парафіни.

Депарафіновані зрізи забарвлювали протягом 5 хв у 1%-му розчині гематоксиліну, промивали дистильованою водою, забарвлювали впродовж 5 хв у 0,5%-му розчині флоксину, витримували 2 хв у 5%-му розчині фосфорно-вольфрамової кислоти, промивали проточною водою впродовж 5 хв до відновлення яскраво червоного забарвлення клітин Панета. Забарвлені зрізи заливали у гліцерин-желатин і розглядали під світловим мікроскопом.

Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за трибальною системою, запропонованою Соколовським [3], а також Хейхоу і Квагліно [4].

Математичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Statistica 6,0. Для оцінки нормального розподілення результатів був застосований критерій Колмогорова-Смірнова, а для порівняння критерій t Стьюдента. Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) підраховували для оцінки ступеня зв'язку між отриманими результатами.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На препаратах, забарвлених дитизоном, у цитоплазмі клітин Панета та гранулоцитах крові визначали гранули червоного кольору. При проведенні цитохімічної реакції 8-ТСХ у цих клітинах визначали гранули, які

люмінесціювали жовто-зеленим світлом. Обидва типи гранул являють собою гранули цинку. Показано, що інтенсивність цитохімічних реакцій дитизону та 8-ТСХ у клітинах підвищена при гострому стресі, введенні адреналіну та преднізолону. Реакція була послаблена при хронічному стресі та після адrenaлектомії.

Як видно з табл. 1, у контрольних (інтактних) щурів інтенсивність реакції дитизону становила 2,1 ум. од. \pm 0,16 ум. од. у клітинах Панета та 1,2 ум. од. \pm 0,10 ум. од. у гранулоцитах крові. Вміст цинку був підвищений при ОФН у клітинах Панета на 23 % (P<0,05) і на 42 % (P<0,001) у гранулоцитах крові, а при ОІ на 29 % (P<0,01) і на 33 % (P<0,05) відповідно. Після ін'єкцій адреналіну він підвищувався на 23 % (P<0,05) та 58 % (P<0,001), та преднізолону – 23 % (P<0,05) та 50 % (P<0,001) відповідно. Отже, гострий стрес, введення адреналіну та преднізолону викликали підвищення концентрації цинку в обох типах клітин.

Як видно з табл. 2 БФН викликала зниження концентрації цинку на 52 % (P<0,001) у клітинах Панета та на 42 % (P<0,001) у гранулоцитах, а БІ – на 48 %

(P<0,001) та 50 % (P<0,001) відповідно. Після адrenaлектомії цей показник знизився на 52 % (P<0,001) та 50 % (P<0,001) відповідно. Отже, хронічний стрес та адrenaлектомія викликали зменшення вмісту цинку в обох видах клітин.

На препаратах, забарвлених МФФ, у цитоплазмі базофілів визначали сині, нейтрофілів – фіолетові, еозинофілів – червоні гранули. При забарвленні гематоксилін-флоксином у цитоплазмі клітин Панета спостерігалися червоні гранули.

У контрольних (інтактних) щурів вміст секреторного матеріалу в клітинах Панета був 1,7 ум.од. \pm 0,14 ум. од., у гранулоцитах крові (нейтрофілах) – 1,0 ум. од. \pm 0,08 ум. од. (табл. 3). При ОФН у клітинах Панета цей показник був збільшений на 35 % (P<0,01), в нейтрофілах крові на 30 % (P<0,01), при ОІ – на 29 % (P<0,05) та 40 % (P<0,001), після введення адреналіну – на 35 % (P<0,01) та 30 % (P<0,01), преднізолону – 29 % (P<0,05) та 30 % (P<0,01) відповідно. Таким чином, гострий стрес, введення адреналіну та преднізолону викликали підвищення вмісту секреторного матеріалу в обох видах клітин.

Таблиця 1. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета та гранулоцитах крові щурів при гострому стресі та введенні адреналіну і преднізолону ($\bar{X} \pm m$)

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	2,1 \pm 0,16	1,2 \pm 0,10	0,57*
Одноразове фізичне навантаження (n=15)	2,6 \pm 0,18*	1,7 \pm 0,14***	0,56*
Одноразова іммобілізація (n=16)	2,7 \pm 0,16**	1,6 \pm 0,13*	0,54*
Введення адреналіну (n=14)	2,6 \pm 0,17*	1,9 \pm 1,14***	0,61**
Введення преднізолону (n=13)	2,6 \pm 0,16*	1,8 \pm 1,15***	0,58*

Примітка. Тут і в табл. 2–4 * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Таблиця 2. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону в клітинах Панета та гранулоцитах крові щурів при хронічному стресі та адrenaлектомії ($\bar{X} \pm m$)

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	2,1 \pm 0,16	1,2 \pm 0,10	0,57*
Багаторазове фізичне навантаження (n=14)	1,0 \pm 0,09*	0,7 \pm 0,04***	0,65**
Багаторазова іммобілізація (n=17)	1,1 \pm 0,08**	0,6 \pm 0,05*	0,58*
Адrenaлектомія (n=12)	1,0 \pm 0,09*	0,6 \pm 0,04**	0,62**

Таблиця 3. Інтенсивність цитохімічної реакції гематоксилін-флоксину в клітинах Панета та метилового фіолетового-флоксину в гранулоцитах крові (нейтрофілах) щурів при гострому стресі та введенні адреналіну і преднізолону ($\bar{X} \pm m$)

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	1,7±0,14	1,0±0,08	0,62**
Одноразове фізичне навантаження (n=15)	2,3±0,17**	1,3±0,09**	0,55*
Одноразова іммобілізація (n=16)	2,2±0,15**	1,4±0,10***	0,57*
Введення адреналіну (n=14)	2,3±0,18*	1,3±0,11**	0,55*
Введення преднізолону (n=13)	2,2±0,16*	1,3±1,08**	0,57*

Таблиця 4. Інтенсивність цитохімічної реакції гематоксилін-флоксину в клітинах Панета та метилового фіолетового-флоксину в гранулоцитах крові (нейтрофілах) щурів при хронічному стресі та адреналектомії ($\bar{X} \pm m$)

Показник	Інтенсивність реакції, ум. од.		r
	Клітини Панета	Гранулоцити крові	
Контроль (n=16)	1,7±0,14	1,0±0,08	0,56*
Багаторазове фізичне навантаження (n=14)	0,9±0,08***	0,6±0,04***	0,64**
Багаторазова іммобілізація (n=17)	1,0±0,07***	0,7±0,05**	0,63**
Адреналектомія (n=12)	0,8±0,07***	0,4±0,03***	0,60**

БФН викликало зниження вмісту секреторного матеріалу в клітинах Панета на 47% ($P<0,001$), нейтрофілах крові – на 40% ($P<0,001$), БІ – на 41% ($P<0,001$) та 30% ($P<0,01$), адреналектомія – 53% ($P<0,001$) та 60% ($P<0,001$) відповідно (табл. 4). Отже, хронічний стрес та адреналектомія спричинювали зниження вмісту секреторного матеріалу в обох видах клітин.

Таким чином, позитивна кореляція у клітинах Панета та гранулоцитах крові дає змогу припустити функціональний зв'язок між ними. Пригнічення їх секреторної активності супроводжується накопиченням цинку та секреторного матеріалу. Навпаки, підвищення секреторної активності клітин викликає зменшення концентрації в них цинку та секрету. Підвищення вмісту двох компонентів у клітинах при гострому стресі пояснюється підсиленням інкреторної функції наднирникових залоз. Послаблення цієї функції призводить до дефіциту цинку та секреторного матеріалу в клітинах.

ВИСНОВКИ

1. Вміст цинку та секреторного матеріалу

в клітинах Панета та гранулоцитах крові підвищується при гострому стресі, введенні адреналіну та преднізолону.

2. При хронічному стресі та адреналектомії зменшується концентрація цинку та секреторного матеріалу в досліджуваних клітинах.

3. На функціональний зв'язок клітин Панета та гранулоцитів крові вказує позитивна кореляція змін в них вмісту цинку та секреторного матеріалу.

Т.В. Береговая, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко

СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА И СЕКРЕТОРНОГО МАТЕРИАЛА В ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ И БАЗАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ КИШЕЧНЫХ КРИПТ ПРИ СТРЕССЕ

Содержание цинка и секреторного материала в гранулоцитах крови и клетках Панета крыс возрастало при однократной физической нагрузке и иммобилизации. Многократная физическая нагрузка и иммобилизация вызывали, наоборот, уменьшение концентрации этих компонентов в клетках. Позитивная корреляция изменений в двух видах клеток указывает на возможную функциональную связь между ними.

Ключевые слова: гранулоциты крови, иммобилизация, клетки Панета, секреторный материал, физическая нагрузка, цинк.

**T.V. Beregova, Y.V. Eshchenko, V.D. Bovt,
V.A. Eshchenko**

**ZINC AND THE SECRETORY MATERIAL
CONTENT IN BLOOD GRANULOCYTES AND
IN BASAL PARTS OF INTESTINE CRYPTS
DURING STRESS**

Zinc and the secretory material content in blood granulocytes and the Paneth cells of the rats increased by single physical load and immobilization. On the contrary, multiple physical loads and immobilization decreased the concentration of these components in the cells. Positive correlation of changes in both cell types pointed for possible functional connection between them.

Key words: blood granulocytes, immobilization, Paneth cells, secretory material, physical load, zinc.

Kyiv National Shevchenko University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Берегова Т.В., Єщенко Ю.В. Зміни вмісту цинку в клітинах при різному функціональному стані інсулярного апарату підшлункової залози // Вісн. ЗДУ. – 2003. – №1. – С. 11–15.

2. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка // Цитология. – 1978. – **20**, №8. – С. 297–933.

3. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. – Л.: Медицина, 1971. – 172 с.

4. Хэйхоу Ф., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.

5. Ayabe T., Satchell D.P., Pesendorfer P., Tanabe H., Wilson C.L. Hagen S.J., Quellette A.J. Activation of Paneth cell δ -defensins in mouse small intestine // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №7. – P. 5219–5228.

6. Quellette A.J., Selstead M.E. Paneth cell defensins // FASEB J. – 1996. – **10**. – P. 1280–1289.

7. Prasad A.S. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health // Nutrition. – 2001. – **17**. – P. 685–687.

8. Rink L., Gabriel P. Zinc and the immune system // Proc. Nutr. Soc. – 2000. – **59**. – P. 541–552.

9. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins // Biomed. Pharmacother. – 2003. – **57**. – P. 399–411.

10. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev. – 1993. – **73**. – P. 79–118.

11. Wellinghausen N., Kirchner H., Rink L. The immunobiology of zinc // Immunol. Today. – 1997. – **18**. – P. 519–521.

12. Soderholm J.D., Perdue M.H. Stress and the gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function // Amer. J. Gastrointestinal Liver Physiol. – 2001. – **280**. – P. G7–G13.

*Київ. нац. ун-т імені Тараса Шевченка
E-mail: tberegova@univ.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 21.01.2010*

Н.Є. Лаповець

Цитокиновий спектр сироватки крові при запальних процесах у черевній порожнині

Досліджували вміст цитокінів інтерлейкінів (ІЛ): ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-10 та фактора некрозу пухлини (ФНП- α) у хворих на флегмонозний апендицит і абдомінальний туберкульоз. Встановлено, що вміст цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ФНП- α більш виражено зростає у хворих на гострий запальний процес (флегмонозний апендицит). Вміст ІЛ-2, ІЛ-10 більш істотно підвищується у хворих на хронічний запальний процес (абдомінальний туберкульоз). Таке співвідношення вмісту цитокінів може бути маркером для диференційної діагностики гострих і хронічних запальних процесів в черевній порожнині.

Ключові слова: цитокіни, гострі запальні процеси, абдомінальний туберкульоз, імунодіагностика.

ВСТУП

Проблема туберкульозу, його ранньої та диференційованої діагностики – одна з найактуальніших у світі. Всесвітня організація охорони здоров'я оголосила туберкульоз глобальною проблемою суспільства в Європейському регіоні. Важливим аспектом проблеми є туберкульоз органів черевної порожнини. Часто абдомінальний туберкульоз виявляється під час ургентних операційних втручань у пацієнтів, оперованих з підозрінням на наявність гострої хірургічної патології органів черевної порожнини (ОЧП). Складність вчасної діагностики абдомінального туберкульозу полягає у великій різноманітності симптомів [3]. Морфологічні особливості захворювання полягають у переважанні серед тканинних реакцій ексудативних і некротичних, неповноцінності репаративних процесів, як правило, на тлі вторинного імунодефіциту, що призводить до прогресування специфічного процесу та водночас до виникнення диференційно-діагностичних труднощів [9]. Такі неспецифічні симптоми захворювання роблять етіологічну діагнос-

тику туберкульозу органів черевної порожнини одним з найважчих завдань фтизіатрії. Мінімум лабораторних досліджень для пацієнтів з ургентною абдомінальною патологією (загальні аналізи крові та сечі), потребує розширення меж лабораторного діагностичного пошуку.

Імунодіагностика абдомінального туберкульозу заслуговує на особливу увагу в сучасній медицині. Одним із досягнень у цій галузі є можливість визначення показників цитокинового профілю у складних клінічних ситуаціях. Туберкульозний процес належить до хронічного запалення. Для покращення диференціації типу запального процесу, необхідним є вивчення механізмів взаємодії цитокінів [5]. Характерною особливістю цитокінів є їх функціональна плейотропія. Проте для кожного цитокіну можна виділити основні і другорядні ефекти, які прямо не впливають на клінічний перебіг і завершення патологічного процесу. Протягом останніх років вивчення впливу цитокінів перебуває у центрі уваги фундаментальної та клінічної імунології [1, 2]. Вміст цитокінів у сироватці крові віддзеркалює функціональний стан імунної

системи. Особливе місце в родині цитокинів належить інтерлейкінам (ІЛ), а саме ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-10 та фактора некрозу пухлини (ФНП- α).

Метою нашої роботи було визначення цитокинового спектра сироватки крові хворих на запальні процеси органів черевної порожнини для поліпшення диференціації гострого та хронічного запалення.

МЕТОДИКА

Вивчали вміст ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-10 та ФНП- α у сироватці крові людей (віком від 18 до 55 років) з запальними процесами органів черевної порожнини різної етіології. Було обстежено кров двох груп хворих: до І групи ввійшли хворі на флегмонозний апендицит (40 осіб), ІІ групу – на абдомінальний туберкульоз з різними вогнищами локалізації процесу (30 осіб). Контролем була сироватка крові практично здорових людей (20 осіб). У роботі використовували реагенти для імуноферментного визначення концентрації ІЛ у сироватці крові людини фірми “Diaclone” (Франція).

Статистичне опрацювання результатів дослідження виконано із застосуванням методів параметричної (варіаційної) статистики. Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм *t* Стьюдента. Для статистичної обробки матеріалу використовували комп'ютерний пакет програм Statistica 2006.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняльний аналіз вмісту досліджуваних

цитокинів в обох групах хворих виявив значні відмінності. Найвищу концентрацію ІЛ ми виявили у хворих на флегмонозний апендицит (І група), у хворих на абдомінальний туберкульоз (ІІ група) цей показник був дещо нижчим від значень у здорових осіб (таблиця).

Найбільш високим виявився вміст ІЛ-1 β в обох групах хворих. ІЛ-1 β відіграє роль у функціонуванні фактично кожної системи організму людини. Як відомо, основне біологічне значення цього ІЛ є медіаторним, що забезпечує взаємодію різних захисних протизапальних механізмів на рівні цілісного організму [4]. Він продукується у вогнищі запалення і викликає цілий комплекс змін, впливаючи на різні типи клітин як місцево, так і системно. Місцева дія ІЛ-1 β скерована на активацію Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, НК-клітин і лейкоцитів, стимуляцію функцій сполучної тканини і ендотелію. Продукція ІЛ-1 β підвищується у хворих на вірусні, бактерійні, грибкові і паразитарні інфекції, а також при стресі [6].

Таким чином, отримані нами результати показують, що при гострому запальному процесі (флегмонозний апендицит) вміст ІЛ-1 β є значно вищим, ніж при хронічному запаленні (абдомінальний туберкульоз).

Концентрація ІЛ-1 β або ІЛ-6 часто корелює з важкістю запального процесу [7]. Продукція ІЛ-6 індукується під дією бактерій, вірусів і їх продуктів у макрофагах, лімфоцитах, фібробластах, кератиноцитах і клітинах ендотелію судин. На відміну від ІЛ-1 β , ІЛ-6 не призводить до синтезу важливих медіаторів запалення [10]. Він індукує синтез гострофазних

Вміст (пг/мл) цитокинів при різних типах запального процесу в черевній порожнині

Діагноз	ІЛ-1 β	ІЛ-6	ФНП- α	ІЛ-2	ІЛ-10
Практично здорові особи	4,86 \pm 0,9	5,87 \pm 0,49	4,97 \pm 0,18	0,01 \pm 0,005	1,56 \pm 0,14
Абдомінальний туберкульоз	27,42 \pm 1,8*	7,69 \pm 0,65	17,57 \pm 0,95*	1,16 \pm 0,1*	8,85 \pm 0,76*
Флегмонозний апендицит	106,01 \pm 9,5***	52,12 \pm 3,03***	19,62 \pm 1,0*	0,3 \pm 0,01***	4,4 \pm 0,35***

* $P < 0,05$ вірогідність відмінності порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ – в порівнянні зі значеннями у хворих на абдомінальний туберкульоз.

білків, які мають протизапальні властивості. ІЛ-6 – це потужний чинник для нормального розвитку і функціонування В- і Т-лімфоцитів [7], а також для протиінфекційного захисту, він впливає на зв'язок між клітинами у вогнищі запалення і з іншими тканинами для досягнення найбільш адекватної реакції і елімінації агента, який викликав порушення гомеостазу. Відмічається суттєва кореляція між активністю ІЛ-6 і рівнями гострофазних білків при запальних станах різної етіології [8].

Вміст ІЛ-6 при флегмонозному апендициті був суттєво підвищеним, водночас у хворих на абдомінальний туберкульоз він змінювався незначно відносно показників у здорових осіб. Оскільки ІЛ-6 проявляє властивості цитокину, здатного стимулювати розвиток імунної відповіді, а також запальну реакцію, то з отриманих нами результатів видно, що при гострому запальному процесі цей показник зростає, а при хронічному запаленні – знижується (див таблицю).

ФНП- α відіграє ключову роль в імунній і запальній реакціях організму. Основними його продуцентами є моноцити і лімфоцити. Від індуктора залежить, який медіатор будуть виробляти клітини. Більшість проявів туберкульозної інфекції, таких, як схуднення, підвищення температури тіла, гранульоми, пов'язані з порушенням згортання крові, некротичними змінами у тканинах, можуть бути атрибутами активованих макрофагів, які продукують значні кількості ФНП- α , який в свою чергу є ефекторною ланкою в цих процесах [4, 11]. Циркуляція ФНП- α при туберкульозі збільшується, що, на нашу думку, теж пов'язано з активацією макрофагів, які і продукують значну його кількість. Нашими дослідженнями показано, що вміст ФНП- α значно збільшується при флегмонозному апендициті, при абдомінальному туберкульозі він дещо знижується, але залишається достовірно вищим від норми. Таке співвідношення вмісту цього інтерлейкіну в обсте-

жених групах хворих пояснюється тим, що ФНП- α відноситься до прозапальних цитокинів і значне збільшення його продукції при гострому запальному процесі є закономірним.

ІЛ-2 продукується Т-хелперами 1-го типу. Індукує проліферацію Т-клітин, дозрівання Т-цитотоксичних, проліферацію та дозрівання В-лімфоцитів, посилює функцію НК-клітин, моноцитів, стимулює продукцію γ -інтерферону, ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8. Цей цитокін має виключно важливе значення в реалізації механізмів імунної відповіді. Встановлено, що ІЛ-2 та γ -інтерферону формують ефекторні імунологічні механізми, спрямовані на запобігання проліферації. В результаті нашого дослідження з'ясовано, що вміст ІЛ-2 при флегмонозному апендициті є в 4 рази нижчим, ніж при абдомінальному туберкульозі, що є свідченням активації цитотоксичної активності лімфоцитів при хронічному запальному процесі.

ІЛ-10 продукується Т-хелперами 2-го типу, а також інгібує клітинну імунну відповідь при цьому стимулюючи гуморальну імунну відповідь. В обстежених нами групах хворих вміст ІЛ-10 удвічі більший при абдомінальному туберкульозі порівняно зі значеннями при флегмонозному апендициті. На нашу думку, таке співвідношення вмісту ІЛ-10 є свідченням хронізації запального процесу в 2-й групі обстежених.

Таким чином, зміни вмісту цитокинів ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП- α є важливими показниками при диференційній діагностиці гострих і хронічних запальних процесів у черевній порожнині.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на флегмонозний апендицит вміст цитокинів ІЛ-1 β , ІЛ-6, ФНП- α є значно вищим, ніж у хворих на абдомінальний туберкульоз.

2. У хворих на абдомінальний туберку-

льоз вміст цитокинів ІЛ-2, ІЛ-10 є достовірно вищим, ніж у хворих на флегмонозний апендицит.

3. Визначення вмісту цитокинів може бути маркером для диференційної діагностики типу запального процесу в черевній порожнині.

4. Дослідження цитокинового профілю у хворих є перспективним заходом для з'ясування патогенезу запальних процесів у черевній порожнині.

Н.Е. Лаповец

ЦИТОКИНОВЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Определяли содержание цитокинов интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, фактора некроза опухоли α у больных с флегмонозным аппендицитом и абдоминальным туберкулезом. Установлено, что содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α более выражено возрастает у больных с острым воспалительным процессом (флегмонозный аппендицит). Концентрация ИЛ-2, ИЛ-10 более выражено возрастает при хронических воспалительных процессах (абдоминальный туберкулез). Такое соотношение содержания цитокинов может служить маркером для дифференциальной диагностики острых и хронических воспалительных процессов в брюшной полости.

Ключевые слова: цитокины, острые воспалительные процессы, абдоминальный туберкулез, иммунодиагностика.

N.E. Lapovets

CYTOKINES SPECTRUM OF BLOOD SERUM DURING INFLAMMATORY PROCESSES IN ABDOMINAL CAVITY

The levels of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2, IL-10) in patients with phlegmonous appendicitis and abdominal tuberculosis were studied. It is established that the level of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α considerably increases in patients with acute inflammatory process (phlegmonous appendicitis) and the level of interleukines IL-2, IL-10 considerably increases in patients with chronic inflammatory process (abdominal tu-

berculoses). Such parity of the cytokines levels can serve as a marker for differential diagnostics of acute and chronic inflammatory processes in abdominal cavity.

Key words: cytokines, acute inflammatory process, abdominal tuberculosis, immuno-diagnostics.

Danylo Halycky National Medical University, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гумен А.В., Шанин С.Н., Козинец И.А. Цитотоксическая активность натуральных киллерных клеток селезенки крыс при стрессе и ее коррекция короткими иммуномодулирующими пептидами // Цитокины и воспаление. – 2006. – 5, №2. – С.37–41.
2. Жидовинов А.А., Журнаджьянц В.А., Жидовинов Г.И. Значение лабораторных маркеров эндотоксикоза и цитокинового профиля в диагностике и эффективности лечения осложненных форм острого холецистита // Там само. – С.27–33.
3. Зинчук А.Н., Герасун В.А., Шевченко Л.Ю. Случай абдоминального туберкулеза: сложности диагностики // Проблемы туберкулеза. – 2002. – №8. – С.56–57.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. – СПб: Гиппократ, 1992. – 256 с.
5. Мартинюк І.І., Дашо Ю.А., Кіселик І.О. Абдоминальний туберкульоз: можливості діагностики // Практ. медицина. – 2003. – IX, № 5. – С.130–132.
6. Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease // Blood. – 1996. – 6. – P. 2095–2147.
7. Fantuzzi G., Faggioni R., Sironi M. Defective inflammatory response and cytokine synthesis in IL-1 β deficient mice // Cytokine. – 1995. – 7. – P.608–615.
8. Hirano T., Matsuda T., Turner M. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis // Eur. J. Immunol. – 1988. – 18. – P.1797–1801.
9. Influence of Mycobacterium tuberculosis on differential activation of helper T-cells / J. Talreja, A. Bhatnagar, S. Jindal // Clinic. and Exp. Immunol. – 2003. – 131, Issue 2. – P.292–298.
10. Kudo C., Araki A., Matsushima K. Inhibition of IL-8-induced W3/25+ (CD4+) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats by selective depletion of in vivo neutrophils with a monoclonal antibody // J. Immunol. – 1991. – P.147:2196–2201.
11. Rook G., Taverne J., Leveton C. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis // Immunology. – 1987. – 62, № 2. – P. 229–234.

Л.Д. Попова, І.М. Васильєва

Дослідження вмісту тестостерону та тиреоїдних гормонів у плазмі крові щурів із субмісивним та агресивним типами поведінки

Досліджено вміст тестостерону та тиреоїдних гормонів у плазмі крові самців щурів із агресивним та субмісивним типами поведінки. Виявлено підвищення вмісту тестостерону в агресивних та зменшення в субмісивних щурів порівняно з урівноваженими. Змін вмісту тироксину не спостерігалось. Вміст трийодтироніну в субмісивних тварин був зменшеним.

Ключові слова: тестостерон, тироксин, трийодтиронін, агресивна поведінка, субмісивна поведінка.

ВСТУП

У наш час велика кількість людей підлягає дії хронічного психоемоційного стресу. Особливо негативні його наслідки на тлі переходу від віртуальних до реальних контактів. Хронічні соціальні конфлікти супроводжуються розвитком або депресії, або агресії.

Дослідження генетично детермінованих особливостей нейрогуморального статусу у тварин, схильних до агресивного або субмісивного типу поведінки, а також визначення периферичних маркерів цих особливостей має велике значення для попередження розвитку таких станів у людей.

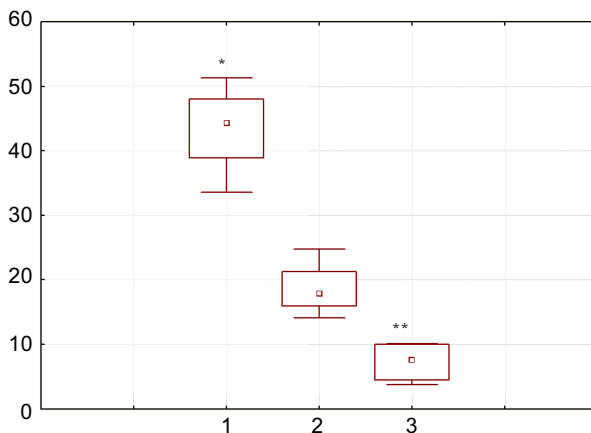
Тестостерон та тиреоїдні гормони у цьому відношенні привертають особливу увагу. Відомо, що агресивність більш характерна для самців, ніж для самиць. Тестостерон впливає на сексуальну та агресивну поведінку самців, перетворюючись у мозку на естрадіол [3]. Тиреоїдні гормони посилюють синтез адренорецепторів [4] і, зважаючи на існування норадренергічної теорії депресії [9], можуть залучатися до формування альтернативних типів поведінки.

© Л.Д. Попова, І.М. Васильєва

Метою нашої роботи було дослідження вмісту тестостерону та тиреоїдних гормонів у плазмі крові щурів із субмісивним та агресивним типом поведінки.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 18 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 240–270 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Для розподілу тварин на групи з альтернативними типами поведінки було використано модель емоційного стресу "Сенсорний контакт" [6, 7]. Згідно з цією моделлю, щури протягом 5 діб знаходилися в умовах індивідуального утримання для попередження ефекту групової взаємодії. Потім їх утримували 2 доби в експериментальних клітках, розділених навпіл прозорою перегородкою з отворами, що забезпечувало умови сенсорного контакту. Тестування типу поведінки починали через 2 доби після адаптації тварин до нових умов утримання та сенсорного знайомства. На період тестування перегородку забирали на 10 хв. Тестування проводили протягом 10 діб у другій половині дня (14.00–16.00). Відповідно до результатів тестування,



Вміст тестостерону (нмоль/л) у плазмі крові щурів з агресивним (1), урівноваженим (2) та субмісивним (3) типом поведінки (Me [25%; 75%] мінімальне та максимальне значення).

* $P < 0,05$ порівняно зі щурами з урівноваженим типом поведінки; ** $P < 0,05$ порівняно зі щурами з агресивним типом поведінки

тварин було розподілено на 3 групи: агресивні, урівноважені та субмісивні. Через 20 год після останнього тестування щурів декапітували під слабким ефірним наркозом.

Вміст тестостерону, тироксину (T_4) та трийодтироніну (T_3) досліджували імуноферментним методом за допомогою наборів «Алкор Біо» (Санкт-Петербург, Росія).

Статистичний аналіз отриманих результатів було проведено за допомогою пакета прикладних програм Statistica, MS Excel з використанням критерію U Манна–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з отриманими результатами, тварини з альтернативними типами поведінки істотно відрізнялися за вмістом тестостерону в плазмі крові (рисунок). У тварин з агресивним типом поведінки його вміст у 5 разів вищий порівняно зі щурами із субмісивним типом поведінки. Урівноважені тварини за цим показником посідали проміжне місце між агресивними та субмі-

сивними групами, і вміст тестостерону в плазмі крові у них був у 2,4 раза нижчим, ніж у агресивних й у 2,1 раза вищим порівняно із субмісивними щурами. Різниця в усіх наведених випадках статистично вірогідна ($P < 0,05$).

Як відомо, вплив тестостерону на головний мозок (зокрема, формування статевої поведінки) самців реалізується не самим тестостероном, а естрадіолом, який утворюється безпосередньо в нейронах головного мозку [3,8]. Регуляція експресії ароматази (ключового ферменту, що перетворює андрогени на естрогени) має важливе значення в модуляції статевої та агресивної поведінки самців [8].

При дослідженні тиреоїдних гормонів було виявлено, що в усіх досліджуваних тварин вміст у плазмі крові T_4 був однаковим (табл. 1).

Проте вміст T_3 у субмісивних тварин був статистично вірогідно нижчим порівняно з агресивними та урівноваженими тваринами (табл. 2). Близько 2/3 цирку-

Таблиця 1. Вміст тироксину (нмоль/л) у плазмі крові щурів із альтернативними типами поведінки

Тварини	Медіана	Квартилі, 25%; 75%
Урівноважені (n = 7)	114,7	91; 115,4
Агресивні (n = 6)	106,1	100,1; 119,8
Субмісивні (n = 5)	105,4	96,1; 109,4

Таблиця 2. Вміст трийодтироніну (нмоль/л) у плазмі крові щурів із альтернативними типами поведінки

Тварини	Медіана	Квартилі, 25%; 75%
Урівноважені (n = 7)	0,34	1,4; 2,1
Агресивні (n = 7)	0,23	1,5; 1,9
Субмісивні (n = 5)	0,05*	1,2; 1,3

* P<0,05 порівняно з агресивними тваринами.

люючого T_3 утворюється за допомогою дейодування T_4 у тканинах-мішенях, включаючи мозок [1, 2]. Дейодування T_4 у ЦНС каталізується 5'-дейодиназою 2-го типу, яка у нормі забезпечує утворення 80 % усього T_3 [1]. Вважають, що при депресії зниження активності 5'-дейодинази 2-го типу призводить до зменшення утворення T_3 , який має потужну антидепресивну дію [10]. Ця гіпотеза підтверджується даними про підвищення вмісту T_4 та rT_3 при одночасному зниженні вмісту T_3 у спинномозковій рідині при депресії [5]. Можливо саме цей процес порушений із субмісивним типом поведінки.

Зменшення вмісту T_3 , що є метаболічно активним гормоном щитоподібної залози, порушує синтез і кругообіг серотоніну, норадреналіну, дофаміну, γ -аміномасляної кислоти та інших нейромедіаторів в головному мозку [1].

Зважаючи на те, що тиреоїдні гормони підвищують щільність β -, α_1 - та α_2 -адренорецепторів у корі головного мозку [4], наслідком зниження вмісту T_3 у субмісивних тварин буде зменшення відповіді клітин на вплив катехоламінів.

Таким чином, зміни вмісту тестостерону спостерігаються у тварин як з агресивним, так і субмісивним типом поведінки. Динаміка вмісту T_3 спостерігається тільки у субмісивних тварин.

Л.Д. Попова, І.М. Васильєва

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА И ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С АГРЕССИВНЫМ И СУБМИССИВНЫМ ТИПАМИ ПОВЕДЕНИЯ

Исследовано содержание тестостерона и тиреоидных

гормонов в плазме крови самцов крыс с агрессивным и субмиссивным типами поведения. Обнаружено повышение содержания тестостерона у агрессивных и уменьшение у субмиссивных крыс по сравнению с уравновешенными. Содержание тироксина не изменялось, а трийодтиронина у субмиссивных животных было понижено.

Ключевые слова: тестостерон, тироксин, трийодтиронин, агрессивное поведение, субмиссивное поведение.

L.D. Popova, I.M. Vasyl'eva

TESTOSTERONE AND THYROID HORMONES LEVELS IN RATS WITH SUBMISSIVE AND AGGRESSIVE BEHAVIOR TYPES

The levels of testosterone and thyroid hormones have been investigated in male rats with aggressive and submissive behaviors. An increase of testosterone in aggressive rats and the decrease of that in submissive ones were found when compared with the steady males. No change in the thyroxin level was detected. The level of T_3 was not changed in males with aggressive behavior, but it was decreased in submissive rats.

Key words: testosterone, thyroxin, triiodothyronine, aggressive behavior, submissive behavior.

Kharkiv National Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сапронов Н.С., Маслова О.О. Нейрофизиологические эффекты тиреоидных гормонов // Психофармакология и биол. наркология // – 2007. – 7, №2. – С.1533-1541.
2. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Леонов В.В., Мясоедов В.В. Клиническая биохимия. – Харьков: Факт, 2005. – 456 с.
3. Goncalves D., Saraiva J., Teles M., Gjncalves D., Saraiva Y., Teles M, Teodosio R., Canario A.V., Oliveira R.F. Brain aromatase mRNA expression in two populations of peacock blenny *Salaria pavo* with divergent mating systems // Horm. Behav. – 2010. – 57, №2. – P. 155–161.
4. Henley W.N., Koehnle T.J. Thyroid hormones and depression. An examination of basic hormonal actions in the mature mammalian brain // Synapse. – 1997. – 27. – P. 36–44.
5. Kirkegaard C., Faber J. Free thyroxine and 3,3', 5' – triiodothyronine levels in cerebrospinal fluid of pa-

- tients with endogens depression // Acta Endocrinol. (Copenh.) – 1991. – **124**, №2. – P. 166–172.
6. Kudryavtseva N.N. The sensory contact model for the study of aggressive and submissive behaviors male mice // Aggres. Behav. – 1991. – **17**, №5. – P.285–291.
7. Kudryavtseva N.N., Sitnikov A.P. Influence of genotype oh the formation of aggressive and submissive behavior in mice // Neurosci. Behav. Physiol. – 1988. – **1**, №1. – P. 1838–1843.
8. Taziaux M., Keller M, Bakker J., Balthazart J. Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentration // J. Neurosci. – 2007. – **27**, №24. – P. 6563–6572.
9. Stone E.A. Brain noradrenergic mechanisms in models of depression. – In: Hormones and Depression / Ed. U. Halbreich. – New York.: Raven press, 1987. – P. 263–277.
10. Yen P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action // Physiol. Rev. – 2001. – **81**, №3. – P. 1097–1142.

Харків. нац.-мед. ун-т МОЗ України
E-mail: meduniver@kumu.kharkov.ua

Матеріал надійшов до редакції 24.03.2010

С.М. Воронич, Б.М. Павликівська, Н.М. Воронич-Семченко

Фізіологічні аспекти аналізу показників варіабельності серцевого ритму підлітків із латентним гіпотиреозом

Досліджені показники варіабельності серцевого ритму (ВСР) у підлітків із латентним гіпотиреозом і здорових однолітків, їх взаємозв'язок із показниками тиреоїдної системи (гормональним статусом, розмірами щитоподібної залози, медіаною йодурії). Установлено, що при обмеженні йодного забезпечення виникає вегетативна дистонія із ослабленням активності симпатичного відділу автономної нервової системи, що супроводжується звуженням діапазону адаптаційних можливостей організму, виснаженням регуляторних впливів порівняно зі здоровими дітьми. Аналіз показників ВСР після корекції йодидом-100 констатував зменшення впливу парасимпатичного відділу автономної нервової системи на регуляцію серцевого ритму і стабілізацію симпатичного компонента. Установлений кореляційний зв'язок між вмістом у сироватці крові тиреоїдних гормонів (загального трийодтироніну – T_3 і вільного тироксину – FT_4) і показниками ВСР. Така тенденція підкреслює есенціальну роль T_3 і FT_4 для забезпечення функціональної здатності автономної нервової системи у підлітків. Обгрунтовані патофізіологічні патерни вегетативного профілю ВСР при латентному гіпотиреозі.

Ключові слова: варіабельність серцевого ритму, латентний гіпотиреоз, тиреоїдний статус.

ВСТУП

Одним із пріоритетних медико-соціальних напрямків охорони здоров'я є подолання йододефіциту, який супроводжується широким діапазоном проявів. Зокрема, дефіцит йоду негативно впливає на фізичний, статевий ріст і розвиток, вісцеральні функції організму, формування інтелектуальної та когнітивної сфери дітей шкільного віку. Механізми такого впливу йоду зумовлені порушеннями ендокринної здатності щитоподібної залози [4, 5, 11, 13]. Доведено, що тиреоїдні гормони мають есенціальне значення для дозрівання та функціонування нервової системи [15–17]. Загалом зміни у роботі внутрішніх органів і систем при гіпотиреозі можуть бути пов'язані зі структурно-функціональними розладами автономної нервової системи (АНС). Відомо, що зниження вмісту трийод-

тироніну (T_3) та тироксину (T_4) у сироватці крові супроводжується пригніченням симпатичного відділу АНС і реципрокною активацією її парасимпатичного відділу (насамперед блукаючого нерва) [12, 14]. Тому вартим уваги напрямком експериментальної та клінічної медицини є з'ясування граничних вісцеральних змін при субклінічних формах гіпофункції щитоподібної залози та можливостей корекції, особливо за умов обмеженого йодного забезпечення. Такі ранні порушення можуть проявлятися вегетативною дисфункцією. Одним із найбільш науково обгрунтованих та інформативних методів кількісної оцінки показників вегетативної активності є комп'ютерна кардіоінтервалографія. В її основі лежить математичний аналіз (часовий, спектральний, геометричний) варіабельності серцевого ритму (ВСР) [1, 8–10]. Під ВСР розуміють ступінь коливань

тривалості інтервалів між синусовими комплексами на ЕКГ. Згідно з теорією Баєвського [2], структура серцевого ритму дає змогу оцінити стан АНС (вегетативний баланс), ступінь адаптаційної резистентності організму, можливості адаптаційних резервів.

Метою нашого дослідження було вивчення показників ВСР та їх взаємозв'язку з тиреоїдним статусом підлітків із латентним гіпотиреозом до та після лікування йодидом-100.

МЕТОДИКА

Обстежено 25 дітей (13 дівчат і 12 хлопців) віком від 14 до 17 років із латентним гіпотиреозом (основна група) та 65 здорових школярів (35 дівчат і 30 хлопців) такого самого віку (контрольна група).

Для визначення функціонального стану щитоподібної залози у сироватці крові імуноферментним методом визначали вміст тиреоїдних гормонів: загальний T_3 , загальний T_4 , вільний T_4 (FT_4), тиреотропний гормон (ТТГ) аденогіпофіза [7]. Отримані результати порівнювали із фізіологічною нормою показників із урахуванням віку дитини стосовно регіональних стандартів [4]. Для аналізу балансу в системі тиреоїдних гормонів обчислювали інтегральний тиреоїдний індекс (ІТІ), індекс периферичної інверсії (T_3/T_4) та $ТТГ/T_4$. Для з'ясування йодного забезпечення організму дітей визначали рівень екскреції йоду з сечею у разових порціях сечі згідно з реакцією Sandell-Kolthoff за методикою Dunn і співавт. і знаходили медіану йодурії [18]. Морфометричну оцінку стану щитоподібної залози здійснювали ультрасонографічним методом. Обстеження проводили за допомогою ультразвукового скануючого приладу „ULTIMA PRD-30” лінійним датчиком 7,5 МГц діаметром 40 мм. Об'єм щитоподібної залози розраховували за класичною формулою [20]. Результати

еховолемії оцінювали за нормативами тиреоїдного об'єму (97 перцентиль), що диференційовані за статтю та площею поверхні тіла [4].

ВСР вивчали, використовуючи апарат „Електрокард”, який входить до автоматизованого діагностичного комплексу, виготовленого науково-виробничим об'єднанням „Метекол” (Україна). Запис ЕКГ проводили протягом 5 хв відповідно до рекомендацій А.М. Вейна: зранку, натще, лежачи та стоячи після 15-хвилинного відпочинку в горизонтальному положенні. Результати ЕКГ в автоматичному режимі аналізували з використанням програми для визначення частотних і спектральних показників серцевого ритму, згідно з рекомендаціями Європейського товариства кардіологів та Північноамериканського товариства електрокардіостимуляції та електрофізіології [19]. Основними показниками, які найбільшою мірою відображають фізіологічні аспекти вегетативної дисфункції, є мода (M_o), амплітуда моди ($A M_o$), варіаційний розмах (ΔX), індекс напруження (ІН). M_o представляє фактичне значення тривалості інтервалу R-R, що зустрічається найчастіше і визначає гуморальний шлях регуляції серцевого ритму; $A M_o$ – кількість інтервалів R-R, рівних M_o (у відсотках до загального числа зареєстрованих серцевих циклів), відображає активність симпатичного відділу АНС; ΔX – різниця між максимальним та мінімальним значенням тривалості зареєстрованих інтервалів R-R, відображає активність парасимпатичного відділу АНС; ІН узагальнюючий показник, обчислюється за формулою $ІН = A M_o / 2 M_o \cdot \Delta X$, у цілому характеризує ступінь напруження регуляторних механізмів організму, роль центральної регуляції кровообігу. Вихідний вегетативний тонус оцінювали за ІН таким чином: стан регуляторних систем АНС вважали збалансованим (ейтонія) при ІН, рівному 30–90 ум. од.; надмірну активацію

парасимпатичної нервової системи (ваготонію) характеризував ІН, менший за 30 ум. од.; збільшений понад 160 ум. од. ІН акцентував на перевагу симпатичної нервової системи (симпатикотонію). Як ваготонія, так і симпатикотонія свідчать про перенапруження регуляторних систем організму. Розраховували також наступні спектральні показники ВСР: LF – потужність спектра на частоті 0,05–0,15 Гц і $LF_{n.u.}$ – частка низькочастотних хвиль у нормалізованих одиницях, яку визначали діленням енергетичного спектра цих компонентів на значення загального енергетичного спектра, прийнятого за 100 %, із якого вилучили хвилі дуже низької частоти ($LF_{n.u.} = LF / (Total - VLF) \cdot 100 \%$; де VLF – потужність спектра на частоті менше 0,05 Гц); HF – потужність спектра на частоті 0,15–0,4 Гц і $HF_{n.u.}$ – частка високочастотних хвиль у нормалізованих одиницях ($HF_{n.u.} = HF / (Total - VLF) \cdot 100 \%$); LF/HF – співвідношення низько- та високочастотних компонентів. При цьому HF і $HF_{n.u.}$ використовуються як маркери парасимпатичних (вагальних) механізмів регуляції, а LF і $LF_{n.u.}$ – демонструють переважно симпатичні вазомоторні механізми саморегуляції, LF/HF є показником балансу між окремими відділами АНС. Для дітей фізіологічною нормою є VLF:LF:HF=30:31:39 (%) [1, 6, 9, 10]. Спектральний аналіз проводили методом швидкого перетворення Фур'є.

Корекцію латентного гіпотиреозу проводили йодидом калію впродовж 3 міс. Для цього всі діти основної групи один раз на день (після сніданку) вживали по 1 таблетці йодиду-100 («Nucomed Merck KGaA», Німеччина), яка містить по 130,8 мкг йодиду калію, що відповідає 100 мкг йоду.

Дослідження проведені в послідовних репрезентативних групах спостережень. Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel та Statistica із використанням методів варіаційної статистики, кореляції,

регресії. Визначали середньоарифметичне значення (M), стандартну похибку (m), критерій Стьюдента (t), коефіцієнт вірогідності (P), коефіцієнт кореляції (r), коефіцієнт регресії (R). Значення $P < 0,05$ вважали вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті обстеження до контрольної групи були віднесені діти, у яких не виявлено ніяких структурно-функціональних відхилень щитоподібної залози: встановлено достатній вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові та збережений баланс у їх системі; медіана йодурії цієї групи школярів знаходилась у межах фізіологічної норми; загальний об'єм залози у всіх здорових школярів відповідав її нормативним розмірам відповідно до статі та площі поверхні тіла.

До основної групи ввійшли підлітки, у яких на основі показників тиреоїдного статусу діагностовано зниження функціональної здатності щитоподібної залози. Зокрема, вміст гормонів T_3 , T_4 , FT_4 у сироватці крові таких дітей та індекс ІТІ знаходились у межах фізіологічної норми відповідно до віку [4]. Водночас вміст ТТГ перевищував 5 мкМО/мл, а індекс периферичної інверсії був більшим за 0,025, що характеризує розвиток латентного гіпотиреозу у цих школярів [15]. Аналізуючи вміст йоду в сечі, було з'ясовано, що у 9,52 % дітей основної групи цей показник знаходився в межах 50–99 мкг/л, а у інших дітей коливався від 100 до 120 мкг/л, що акцентує на їх пограничному забезпеченні йодом [11, 15]. За допомогою УЗД встановлено збільшення розмірів (загального об'єму) щитоподібної залози у 62,5 % школярів із латентним гіпотиреозом порівняно із належними варіантами норм 97 перцентилі, що диференційовані за статтю та площею поверхні тіла [4]. У підлітків основної групи (табл. 1) встановлено, що

вміст T_3 був на 40,89 % ($P<0,05$), T_4 – на 25,56 % ($P<0,05$), а FT_4 – на 40,74 % ($P<0,05$) менший, ніж у здорових ровесників, а ТТГ більший за контрольні значення на 45,78 % ($P<0,05$). У школярів із латентним гіпотиреозом індекси T_3/T_4 та ТТГ/ T_4 перевищили аналогічні показники контрольної групи на 16,00 % ($P<0,05$) та у 2,49 раза ($P<0,01$) відповідно. Такі зміни спостерігали на тлі вираженого зниження (на 63,06 %, $P<0,05$) щодо контролю ІТІ. Медіана йодурії основної групи була менша майже вдвічі ($P<0,05$) порівняно з аналогічним контрольним показником. Загальний об'єм щитоподібної залози у підлітків із латентним гіпотиреозом за результатами ультрасонографії на 49,73 % ($P<0,05$) перевищував відповідний показник контролю.

Як видно з табл. 2, здорові діти характеризувалися відносно високою ВСР. У положенні лежачи школярі контрольної групи мали збалансований вплив симпатичного та парасимпатичного відділів АНС. Напруженість механізмів вегетативної регуляції у дітей цієї групи була низька, на що вказує значення ІН ($82,44 \pm 9,28$ відповідає ейтонії). Після виконання активної ортостатичної проби здорові діти демонстрували помірне наростання симпа-

тичних впливів і напруження механізмів вегетативного регулювання. У положенні стоячи спостерігали вірогідне зменшення Mo (на 17,39 %, $P<0,001$), збільшення ΔX (на 61,11 %, $P<0,05$), ІН (на 69,48 %, $P<0,05$).

У дітей основної групи у положенні лежачи окремі вивчені показники ВСР вірогідно не відрізнялися від аналогічних у контрольній групі. Водночас (див. табл. 2) значення Mo було вищим на 4,19 % ($P<0,05$), AMo – меншим на 13,98 % ($P<0,05$), HF – більшим у 1,6 рази ($P<0,05$) та $HF_{n.u.}$ – більшим на 28,25 % ($P<0,05$). Щодо співвідношення впливів симпатичного та парасимпатичного відділів АНС у регуляції серцевого ритму у положенні лежачи можна спостерігати тенденцію до посилення парасимпатичних впливів у підлітків із латентним гіпотиреозом. Такі висновки ґрунтуються на відносно низькому значенні AMo , збільшеній потужності хвиль високо-частотної частини спектра (HF), а також вірогідному зменшенні (на 43,0 %, $P<0,05$) співвідношення потужності хвиль низької та високої частоти (LF/HF) у порівнянні з контрольною групою.

При переході у положення стоячи вірогідно змінювалися майже всі показники ВСР, які вивчали (див. табл. 2). Така їх

Таблиця 1. Показники тиреоїдної системи дітей з латентним гіпотиреозом до та після корекції йодидом-100 ($M \pm m$)

Показники	Контрольна група (n = 25)	Основна група (n=65)	
		до корекції йодидом-100	після корекції йодидом-100
Трийодтиронін (T_3), нмоль/л	2,69±0,28	1,59±0,25*	2,44±0,78
Тироксин (T_4), нмоль/л	92,33±6,45	68,73±6,37*	78,39±3,44 $P<0,05$
Вільний T_4 (FT_4), пмоль/л	18,95±1,43	11,23±1,02*	15,70±1,04 $P_1<0,05$
Тиреотропний гормон (ТТГ), мкМО/мл	3,69±0,74	5,35±0,20*	4,31±0,33 $P_1<0,05$
Індекс периферичної інверсії (T_3/T_4)	0,025±0,003	0,029±0,004*	0,026±0,003
ТТГ/ T_4	0,035 ± 0,009	0,087±0,018*	0,053±0,003* $P_1<0,05$
Інтегральний тиреоїдний індекс (ІТІ)	24,39±0,17	9,01±0,29*	16,75±0,08* $P_1<0,05$
Медіана йодурії, мкг/л	219,74±12,65	112,47±10,05*	165,23±9,41* $P_1<0,001$
Загальний об'єм щитоподібної залози, мл	7,34±0,89	10,99±0,45*	8,82±0,71 $P_1<0,05$

Примітка: Тут і в таблиці 2 * $P<0,05$ порівняно з аналогічними показниками контролю; P_1 – вірогідна різниця порівняно з аналогічними показниками до корекції йодидом-100.

динаміка вказує на різний ступінь реакції при зміні положення тіла дітей із латентним гіпотиреозом порівняно зі здоровими однолітками. Виражена ВСР у положенні стоячи у школярів основної групи дає підстави зробити висновок про те, що вони характеризувалися меншим діапазоном адаптаційних можливостей організму порівняно з дітьми контрольної групи. На порушення вегетативної регуляції у підлітків із йододефіцитом також вказували зміни спектральних показників кардіоінтервалограми. Так, після переходу у положення стоячи $LF_{n.u.}$ збільшився у 2 рази ($P<0,05$), $HF_{n.u.}$ зменшився на 59,95 % ($P<0,05$), однак вказані зміни ВСР свідчать про функціональні розлади, а не про органічну патологію. У цьому разі наростання показника $LF_{n.u.}$, надмірне зростання (майже у 5 разів) співвідношення LF/HF

може підтверджувати посилення впливів симпатичної нервової системи і характеризувати помірне виснаження регуляторних впливів. І хоча існують протиріччя стосовно LF -компонента, адже De Voer і співавт. за механізмом віднесли його до барорефлексу [6], LF залишається маркером симпатичного збудження [9, 10]. Слід зазначити, що окремі показники (Mo , ΔX , LF та HF) за умов реєстрації ЕКГ у положенні стоячи у підлітків основної групи вірогідно відрізнялися від контролю. Зокрема, Mo зменшилася на 12,87 % ($P<0,05$), ΔX – у 2,3 рази ($P<0,05$), LF – у 1,45 рази ($P<0,05$), HF – на 36,83 % ($P<0,05$). Виявлена тенденція змін маркерів симпатичних і парасимпатичних впливів ВСР у цілому характеризує лабільність вегетативного профілю у дітей основної групи. Фундаментальним положенням нервової регуляції серцевого ритму

Таблиця 2. Показники варіабельності серцевого ритму дітей з латентним гіпотиреозом до та після корекції йодидом-100 ($M \pm m$)

Показник	Контрольна група (n = 25)		Основна група (n=65)			
			До корекції йодидом-100		Після корекції йодидом-100	
	лежачи	стоячи	лежачи	стоячи	лежачи	стоячи
Мода (Mo), с	0,788±0,008	0,651±0,011 $P<0,01$	0,821±0,012*	0,574±0,011* $P_2<0,001$	0,805±0,007	0,623±0,011 $P_1<0,01$ $P_2<0,001$
Амплітуда моди (AMo), %	37,05±2,26	42,12±1,58	31,87±1,14*	46,45±2,73 $P_2<0,001$	38,47±3,29	43,36±2,81
Варіаційний розмах (ΔX), с	0,36±0,03	0,58±0,09 $P<0,01$	0,42±0,17	0,25±0,02*	0,37±0,017	0,56±0,09 $P_1<0,01$
Індекс напруження (IN), ум.од.	82,44±9,28	139,72±17,56 $P<0,05$	72,15±8,34	175,35±21,47 $P_2<0,01$	80,01±9,45	152,34±31,86 $P_2<0,05$
0,04–0,15 Гц LF , мс ²	2057,27±181,3	2657,41±324,7	1958,12±247,24	1836,75±199,7* $P_2<0,01$	2056,25±156,3	2687,45±286,9 $P_1<0,05$
0,04–0,15 Гц $LF_{n.u.}$, %	52,64±5,82	61,06±8,98	37,53±5,35	76,41±9,78 $P_2<0,01$	48,42±3,98	57,13±9,54
0,15–0,4 Гц HF , мс ²	1768,37±264,30	1715,28±398,2	2778,64±326,2*	654,08±220,15* $P_2<0,001$	1997,58±402,8 $P<0,01$	1878,6±279,5 $P_1<0,05$
0,15–0,4 Гц $HF_{n.u.}$, %	42,69±4,47	35,57±9,58	54,75±9,58*	22,47±5,57 $P_2<0,01$	46,85±8,47	39,52±9,25
Співвідношення LF/HF	1,23±0,21	1,72±0,41	0,69±0,13*	3,40±0,87 $P_2<0,01$	1,03±0,11 $P<0,01$	1,44±0,29 $P_1<0,05$

Примітка: P_2 – вірогідна різниця порівняно з аналогічними показниками у положенні лежачи.

є концепція балансу між симпатичним і парасимпатичним компонентами, наявність реципрокної взаємодії окремих відділів АНС. Тому можна припустити, що навіть за умов доклінічних форм гіпотиреозу зазнають вірогідних змін фізіологічні механізми впливу АНС на пейсмейкер серцевого ритму – синусовий вузол.

Після курсу лікування йодидом-100 у школярів із латентним гіпотиреозом виявлено тенденцію до зростання вмісту T_3 , а також T_4 на 14,05 % ($P < 0,05$) і на 39,80 % ($P < 0,05$) вмісту FT_4 у сироватці крові. Такі зміни концентрації тиреоїдних гормонів зареєстровано на тлі зниження на 19,99 % ($P < 0,05$) вмісту ТТГ у сироватці крові всіх дітей після фармакологічної корекції. За таких умов намітилася тенденція до зниження індексу периферичної інверсії. Індекс $ТТГ/T_4$ після терапії йодидом-100 зменшився на 39,08 %, ($P < 0,05$), ІТІ збільшився на 85,90 % ($P < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками до лікування. При цьому майже всі показники гормонального спектра (вміст T_3 , T_4 , FT_4 , ТТГ, індекси $ТТГ/T_4$, ІТІ) у дітей після корекції не виходили за межі фізіологічної норми. При порівняльному аналізі тиреоїдного профілю у школярів основної та контрольної

груп з'ясовано, що всі тиреоїдні гормони та T_3/T_4 у підлітків після корекції сягнули рівня аналогічних показників у здорових дітей, крім індексів ІТІ (був нижчий за контроль на 31,32 %, $P < 0,05$) та $ТТГ/T_4$ (перевищував контроль на 51,43 %, $P < 0,05$). Аналізуючи вміст йоду в сечі (див. табл. 1), встановлено, що у дітей із латентним гіпотиреозом на тлі лікування на 46,91 % ($P < 0,001$) збільшилася медіана йодурії, але ще зберігалася вірогідна розбіжність (на 24,81 %, $P < 0,05$) рівня екскреції йоду із сечею порівняно з контрольними значеннями. Водночас у більшості дітей основної групи після корекції медіана йодурії знаходилася у межах від 100 до 200 мкг/л. Такі результати свідчать про оптимальне забезпечення йодом цих дітей основної групи. Аналізуючи показники ультрасонографії, виявлено зменшення розмірів щитоподібної залози у всіх дітей, які приймали йодид-100, на 19,75 % ($P < 0,05$) у порівнянні з результатами до лікування. Загальний об'єм щитоподібної залози усіх дітей після корекції відповідав нормативним розмірам (не перевищував 97 перцентилі із врахуванням площі поверхні тіла, статі) та вірогідно не відрізнявся від аналогічних контрольних значень.

Таблиця 3. Коефіцієнти кореляції (r) між показниками варіабельності серцевого ритму та тиреоїдного статусу

Показники	Показники тиреоїдного статусу		
	Трийодтиронін (T_3), нмоль/л	Вільний тироксин (FT_4), пмоль/л	Тиреотропний гормон (ТТГ), мкМО/мл
Мода (Мо), с	-0,76	-0,69	0,53
Амплітуда моди (АМо), %	0,46	0,53	-0,63
Варіаційний розмах (ΔX), с	-0,70	-0,57	0,40
Індекс напруження (ІН), ум.од.	0,56	0,19	0,43
0,04–0,15 Гц LF, мс ²	0,57	0,53	-0,25
0,04–0,15 Гц LF _{н.п.} , %	0,38	0,29	-0,72
0,15–0,4 Гц HF, мс ²	-0,30	-0,28	0,25
0,15–0,4 Гц HF _{н.п.} , %	0,24	-	0,29
Співвідношення LF/ HF	0,34	0,37	-

Примітка. У таблиці представлені тільки вірогідні кореляційні взаємозв'язки ($P < 0,05$).

Аналіз показників кардіоінтервалографії дає змогу констатувати тенденцію до зменшення впливу парасимпатичного відділу АНС на регуляцію серцевого ритму у школярів із латентним гіпотиреозом на тлі фармакологічної корекції йодидом-100. Після курсу йодотерапії у дітей у положенні лежачи виявили тенденцію повернення всіх показників до контрольних значень, проте вірогідними ці зміни були тільки для HF (зменшився на 28,11 %, $P < 0,01$) та LF/HF (збільшився у 1,49 раза, $P < 0,01$). При зміні положення тіла (стоячи) виявили посилення симпатичного компонента (збільшення M_0 , ΔX , LF, HF). Зменшення співвідношення LF/HF свідчить про встановлення балансу між відділами АНС. При цьому майже всі показники (окрім LF/HF у положенні лежачи) вірогідно не відрізнялися від контролю. Загалом виявлено стабілізацію варіабельності та відновлення до контролю показників часового та спектрального профілю ВСР.

У результаті кореляційного аналізу встановлено вірогідний ($P < 0,05$) кореляційний зв'язок між вмістом тиреоїдних гормонів у сироватці крові та вивченими показниками ВСР (табл. 3). Наявність середньо- та високовірогідного зв'язку підтверджує есенціальну роль гормонів щитоподібної залози для забезпечення функціональної здатності АНС. Тому для характеристики вегетативного профілю при латентному гіпотиреозі доцільним є визначення A_{M_0} та $LF_{n.u.}$, як патерн симпатичної нервової системи, ΔX та $HF_{n.u.}$ – парасимпатичної нервової системи, LF/HF – для характеристики вегетативного балансу.

Таким чином, латентний гіпотиреоз у підлітків супроводжується змінами впливу відділів АНС на серце та звуженням діапазону адаптаційних можливостей організму, виснаженням регуляторних впливів у порівнянні зі здоровими однолітками. Аналіз показників кардіоритмограми у дітей основної групи характеризує помірне переважання парасим-

патичного тону у положенні лежачи та тону симпатичного відділу АНС при ортостатичній пробі. Зміни ВСР відображають вираженість вегетативного дисбалансу, дають змогу виявити ранні зміни з боку серцево-судинної системи на субклінічній стадії гіпотиреозу. Слід зазначити, що інтерпретацію результатів ВСР треба здійснювати з урахуванням віку обстежених.

На тлі монотерапії йодидом-100 одночасно зі стабілізацією тиреоїдного статусу (збільшення вмісту гормонів T_3 , T_4 , FT_4 та зниження ТТГ у сироватці крові, відновлення балансу в системі тиреоїдних гормонів, вірогідне зменшення розмірів щитоподібної залози та зростання медіани йодурії) спотерігали зміни показників ВСР. Результати кардіоінтервалограми після корекції дають можливість констатувати зменшення впливу парасимпатичного відділу нервової системи на регуляцію серцевого ритму та на відновлення симпатичного компонента. Такі результати обґрунтовують адекватність, ефективність і доцільність патогенетичної корекції навіть граничних змін показників ВСР за умов латентного гіпотиреозу.

**С.Н. Воронич, Б.М. Павликівська,
Н.Н. Воронич-Семченко**

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНАЛИЗА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ПОДРОСТКОВ С ЛАТЕНТНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ

Исследованы показатели вариабельности сердечного ритма (ВСР) у детей с латентным гипотиреозом и здоровых сверстников, их взаимосвязь с показателями тиреоидной системы (гормональным статусом, размерами щитовидной железы, медианой йодурии). Установлено, что при ограничении йодного обеспечения возникает вегетативная дистония с ослаблением активности симпатического отдела автономной нервной системы, что сопровождается сужением диапазона адаптационных возможностей организма, истощением регуляторных влияний сравнительно со здоровыми детьми. Анализ показателей ВСР после коррекции йодидом-100 константировал уменьшение влияния парасимпатического отдела автономной нервной

системы на регуляцію серцевого ритма і стабілізацію симпатического компонента. Установлена кореляційна зв'язь между содержанием тиреоидных гормонов (общего трийодтиронина – T_3 и свободного тироксина – FT_4) в сыворотке крови и показателями ВСР. Такая тенденция подчеркивает эссенциальную роль общего трийодтиронина – T_3 и свободного тироксина – FT_4 для обеспечения функциональной способности автономной нервной системы у подростков. Обоснованы патофизиологические паттерны вегетативного профиля ВСР при латентном гипотиреозе. Ключевые слова: варіабельність серцевого ритма, латентний гипотиреоз, тиреоидний статус.

**S.M. Voronych, B.M Pavlykivs'ka,
N.M. Voronych-Semchenko**

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF ANALYSIS OF THE INDEXES OF THE VARIABILITY OF CARDIAC RHYTHM IN ADOLESCENTS WITH LATENT HYPOTHYROIDISM

We studied the parameters of variability of cardiac rhythm in adolescents with the latent hypothyroidism and in healthy individuals and the interrelationship of these parameters with the indexes of the thyroid system (hormonal status, dimensions of thyroid, median of ioduria). It has been revealed that iodine deprivation leads to vegetative dystonia with the decreased activity of the sympathetic nervous system. This is accompanied by the narrowing of the range of adaptive capabilities of the organism, exhaustion of the regulatory influences in comparison with healthy children. The analysis of the indexes of the variability of cardiac rhythm after the correction by iodide-100 detected the decrease of the influence of the parasympathetic nervous system on cardiac rhythm regulation and stabilization of the sympathetic component. The correlation link between the content of thyroid hormones and the indexes of the variability of cardiac rhythm has been determined. Such tendency proves the essential role of T_3 and FT_4 for the maintaining of the functional capability of Autonomic Nervous system in adolescents. The pathophysiologic patterns of vegetative profile of the variability of cardiac rhythm in latent hypothyroidism have been substantiated. Key words: variability of cardiac rhythm, latent hypothyroidism, thyroid status.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine;

Policlinic №2 of Desnyansky district of Kyiv, Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова К.М., Конопльова Л.Ф., Решотько Д.О. Варіабельність серцевого ритму і її зв'язок з морфофункціональним станом правого шлуночка у хворих на хронічне легеневе серце внаслідок

хронічного обструктивного захворювання легень // Укр. пульмонолог. журн. – 2004. – №3. – С. 33–36.

2. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем: Метод. рекомендации // Вестн. аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65–87.

3. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини : Пер. з англ. Наук. ред. перекладу М. Гжегоцький, В. Шевчук, О.Заячківська. – Львів: БаК, 2002. – 784 с.

4. Зелінська Н.Б., Резнікова А.Л., Маменко М.С. Зоб у дітей: клініка, диференціальна діагностика, лікування // Соврем. педиатрия. – 2006. – № 1 (10). – С. 57–65.

5. Кравченко В.І., Ткачук Л.А., Турчин В.І. Особливості йодної забезпеченості населення України // Фізіол. журн. – 2006. – 52, № 2. – С.190–191.

6. Малиани А. Физиологическая интерпретация спектральных компонентов вариабельности сердечного ритма // Вестн. аритмологии. – 1998. – № 9. – С.47–57.

7. Методы изучения йододефицитных заболеваний и мониторинг их устранения. Руководство для менеджеров программ. 2-е изд. – М., 2003. – 430 с.

8. Ноздрачев А.Д., Щербатых Ю.В. Современные способы оцінки функционального состояния автономной (вегетативной) нервной системы // Физиология человека. – 2001. – № 27. – С. 95–101.

9. Михайлов В.М. Варіабельність ритма серця. Опыт практического применения. – Изд. 2-е перераб. и доп. – Иваново, 2002. – 289 с.

10. Михайлов В.М., Филькина О.М., Шанина Т.Г. Пределы физиологической нормы параметров вариабельности сердечного ритма здоровых подростков 14–16 лет в зависимости от пола и уровня тренированности // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2009. – № 3. – С. 67–73.

11. Паньків В.І. Йододефіцитні захворювання: Практичний посібник. – К., 2003. – 72 с.

12. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы // М.: Мир, 1989. – С. 274–314.

13. Тиреоидний статус и сердечно-сосудистая система // Рос. мед. вести. – 2000. – № 1. – С. 18–25.

14. Физиология человека: В 3-х томах. Т.2. Пер. с англ. / Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. – М.: Мир, 1996. – 313 с.

15. Шідловський В.О., Дейкало І.М., Шідловський О.В. Йододефіцитні захворювання: діагностика, лікування, профілактика. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – 84 с.

16. Bernal J., Nunez J. Thyroid hormones and brain development // Eur. J. Endocrinol. – 1995. – 133. – P. 390–398.

17. DeLong G.R., Robbins J., Condliffe P.O. Iodine and the brain. – New York, 1989. – 287 p.

18. Dunn J., Grutchfield H., Gutekunst R. Two simple methods for measuring iodine in urine // Thyroid. – 1993. –

- 3 – P.119–123.
19. The 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// Circulation. – 1996. – **93**. – P.1043–1065.
20. Zimmermann M.B., Hess S.Y., Molinari L. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a world health organization// Amer. J. Clin. Nutr. – 2004. – **79**, № 2. – P. 231–237.

*Івано-Франків. нац. мед. ун-т МОЗ України;
Поліклініка № 2 Деснян. району м. Києва МОЗ України
E-mail: voronich@meta.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 06.04.2010*

Ю.А. Коряк

Нервно-мышечные ответы трехглавой мышцы голени на продолжительное пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы у человека в условиях механической разгрузки

Целью исследования было оценить сократительные свойства мышечного аппарата у человека после 60-суточного пребывания на жестком постельном режиме в условиях антиортостатической (-6°) гипокинезии (АНОГ) с применением продолжительного пассивного растяжения мышц-разгибателей стопы. В исследовании участвовала группа ($n = 14$) клинически здоровых молодых мужчин-добровольцев, которые были разделены на две подгруппы. Обследуемые первой подгруппы ($n = 7$) на протяжении 60 сут находились на строгом постельном режиме, а второй ($n = 7$) во время АНОГ применяли продолжительное пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы. Пассивная «тренировка» выполнялась ежедневно на протяжении 60 сут АНОГ приблизительно по 4–5 ч в сутки. Пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы создавалось выносными амортизаторами профилактически-нагрузочного костюма «Пингвин». Усилие амортизаторов (угол коленного сустава 180°) составляло 1,5–2,5 кгс, что приводило к тыльному сгибанию стопы под углом 10° . Сократительные свойства мышц-разгибателей стопы (на примере трехглавой мышцы голени – ТМГ) оценивали по силе одиночного сокращения (P_{oc}), максимальной произвольной силе (МПС), максимальной силе (P_o ; частота 150 имп./с), по временным показателям развития одиночного сокращения, «взрывного» произвольного и электрически вызванного (частота 150 имп./с) сокращений. После АНОГ с применением пассивного растяжения изометрическая P_{oc} ТМГ уменьшилась на 17, МПС – на 43 и P_o – на 19,4 % и значительно увеличилось значение P_o (на 100 %). В группе без применения пассивного растяжения P_{oc} уменьшилась на 17,3 %; МПС – на 33,5 %, P_o – на 18,0 %, а значение P_o увеличилось на 61 %. Полученные результаты указывают, что продолжительное пассивное растяжение мышцы не обнаруживает профилактических облегчений сократительных свойств мышечного аппарата от негативных влияний механической разгрузки и вызывает некоторую модификацию поведения сократительного материала мышцы. В добавление, измененные сократительные свойства (материал), по-видимому, затрагивают проприоцептивные обратные связи и поэтому степень активации моторных единиц пропорциональна этой слабости.

Ключевые слова: трехглавая мышца голени, пассивное растяжение, механическая разгрузка.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что скелетные мышцы как животных, так и человека относительно быстро адаптируются к условиям существования и особенно это проявляется в условиях иммобилизации конечности, реальной или моделируемой невесомости. В ответ на

© Ю.А. Коряк

механическую разгрузку мышечного аппарата снижается тонус [3] и сила сокращения мышц [3, 38, 39], нарушается координация движений [50]. Наибольшему воздействию в результате механической разгрузки подвергаются антигравитационные мышцы-разгибатели бедра и стопы и более значительно — разгибатели стопы

[3], вероятно из-за большей их механической нагрузки в гравитационных условиях Земли.

Среди пусковых механизмов мышечных изменений, важная роль принадлежит модификации нервно-мышечной активности, поскольку структурная и функциональная целостность скелетной мышцы зависит от нормальной нервной функции [49]. Признано, что главным фактором, ответственным за изменение ряда физиологических функций, является внезапное устранение проприоцептивной информации от мышц и сухожилий в ответ на отсутствие весовой нагрузки [41]. В этой связи, чтобы устранить дефицит нагрузок и увеличить афферентную «посылку» от «рабочих» мышц, используют различные профилактические средства – от искусственно создаваемой опоры для стопы [53] до комплекса физических упражнений [8]. Однако ни одно из них полностью не предотвращает мышечных нарушений [5, 36]. Высказывалось предположение [3], что пассивное растяжение мышцы может быть одним из профилактических средств негативных влияний, оказываемых невесомостью. Мы постулируем, что продолжительное пассивное растяжение снижает сократительные свойства мышцы.

Действительно, как методологический подход, пассивное растяжение мышцы используется во многих исследованиях для изучения механизмов гипертрофии мышц [55] и показателей растяжения относительно развития гибкости [44], паттерн нейромышечных ответов [33], механического фактора, генерирующего силу [26], и, наконец, как фактор, способствующий повреждению мышцы [11, 43]. Однако, несмотря на такую широкую информацию, имеется лишь небольшое количество исследований относительно факторов, которые могут влиять на сократительные свойства мышцы (силу одиночного и тетанического сокращений).

Многие факторы оказывают непосредственное влияние на сократительные свойства мышцы в результате ее пассивного растяжения. Так, растяжение мышцы в течение 45 с уменьшает ее жесткость [46], а повторное растяжение увеличивает длину мышцы [45]. Снижение жесткости мышцы оказывает влияние на характеристики (амплитуду и форму) вызванного одиночного ее сокращения, поскольку требуется больше времени для растяжения «слабых», последовательно расположенных компонентов мышцы [18]. Увеличенная длина мышцы изменяет тонкий баланс ее внутренней организации и суставной кинематики, которые объединяются, чтобы продуцировать силу при данном суставном угле [42]. Изменение отношения длина–сила оказывает влияние на нервные паттерны активации из-за нарушений проприоцептивной обратной связи [15].

Пассивное растяжение скелетной мышцы как у животных [11, 43], так и у человека [13, 27] существенно снижает способность генерировать силу сокращения мышцы и уменьшает ее работоспособность. Пассивное растяжение продолжительностью 30 мин вызывает уменьшение максимальной тетанической силы сокращения мышцы на 13 % [27], на протяжении 2 ч – существенное снижение (на 61 %) силы одиночного сокращения [11]. Более того, продолжительное, в течение 1 ч, пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы у человека сопровождается снижением не только механических ответов (максимальной произвольной силы, силы и общей длительности одиночного сокращения) трехглавой мышцы голени (ТМГ) [14], но и электромиографической активности *m. gastrocnemius* и *m. soleus* [14, 43].

Цель настоящего исследования – оценить сократительные свойства отдельной скелетной мышцы в условиях *in situ* у человека после пребывания в условиях 60-суточной антиортостатической гипокинезии

(АНОГ), изучить изменения сократительных свойств мышц в результате продолжительного пассивного растяжения, а также проверить гипотезу положительного влияния продолжительного пассивного растяжения мышц-разгибателей стопы в условиях их механической разгрузки.

В качестве объекта изучения были выбраны показатели механических ответов ТМГ, являющейся постуральной антигравитационной мышцей [25].

МЕТОДИКА

В обследовании участвовала группа ($n = 14$) клинически здоровых молодых мужчин-добровольцев, которая была разделена на две подгруппы. Обследуемые I подгруппы ($n = 7$; возраст – $30,8 \text{ лет} \pm 3,1 \text{ лет}$, масса тела – $79,8 \text{ кг} \pm 7,7 \text{ кг}$, рост – $181,3 \text{ см} \pm 2,3 \text{ см}$) на протяжении всего эксперимента находились на строгом постельном режиме, а II подгруппы ($n = 7$; возраст – $30,4 \text{ лет} \pm 1,2 \text{ лет}$, масса тела – $70,9 \text{ кг} \pm 3,0 \text{ кг}$, рост – $177,4 \text{ см} \pm 2,0 \text{ см}$) во время экспозиции применяли продолжительное пассивное растяжение. По медицинским показателям обследуемые, согласно истории их болезни, ни один из них не имел нейромышечных или сосудистых заболеваний. Более того, отбор добровольцев базировался на показателях биохимического анализа крови, электрокардиограммы в покое и при выполнении велоэргометрического теста со ступенчато-возрастающей нагрузкой. Все обследуемые были некурящими, в хорошем физическом состоянии и не употребляли медикаментозных средств. Они были полностью информированы относительно процедур и возможных рисков, вызванных исследованием, и дали письменное согласие на участие в нем. Обследуемым разрешалось в любой момент по желанию отказаться от дальнейшего участия в эксперименте.

Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с Хельсин-

ской Декларацией, и программа исследований была одобрена комиссией по биоэтической этике при ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

В качестве воздействия, имитирующего влияние фактора невесомости, использовали модель постельной АНОГ. Длительность механической разгрузки мышечного аппарата составляла 60 сут. Обследуемые постоянно оставались в антиортостатическом положении, включая прием пищи и выделительные функции. Во время экспозиции на протяжении 24 ч они постоянно находились под контролем медицинского персонала и дополнительно проводили мониторинг их поведения.

Пассивное растяжение мышц-разгибателей стопы создавали выносными амортизаторами профилактически-нагрузочного костюма «Пингвин»¹ [1]. Усилие амортизаторов (угол коленного сустава 180° составляло $1,5\text{--}2,5 \text{ кГс}$, что приводило к максимальному тыльному сгибанию стопы под углом 10° . Время пребывания обследованных в таком положении, учитывая возможность изменения положения тела в течение дня, составляло приблизительно $4\text{--}5 \text{ ч/сут}$ от общего времени (10 ч) «ношения» профилактически нагрузочного костюма.

Методы и установка для измерения произвольной и электрически вызванной (непроизвольной) силы сокращения отдельной мышцы у человека в условиях *in situ* описаны ранее [5]. Обследуемый удобно располагался в специальном кресле при стандартной позиции – угол в голеностопном, коленном и тазобедренном суставах составлял 90° . Конечность жестко фиксировали, создавая таким образом изометрический режим сокращения мышцы. Динамометр, представляющий стальное кольцо с смонтированными в него тензодатчиками, плотно прижимали к ахиллову сухожилию мышцы. При сокращении мышцы происходила механическая деформация тензодатчиков динамометра, которые усилителем (тип «АНЧ-7м»; СССР) преобра-

¹ Исследование выполнено сотрудником ОАО НПП «Звезда» В.М. Синигиным.

зовывалась в электрические сигналы с последующей записью механограммы на светолучевом осциллографе (тип «К-115», СССР). Степень прижатия датчика составляла 5 кг и оставалась постоянной на протяжении исследования. До и после исследования динамометр калибровали, нагружая его различной массой.

Сократительные свойства ТМГ исследовали дважды – за 10–8 сут до начала эксперимента и на 2–3-и сутки после отмены постельного режима и оценивали их по механическим показателям произвольного и электрически вызванного сокращения (одиночного, парного и тетанического).

Перед выполнением произвольного (при волевом усилии самого обследуемого) сокращения каждого обследованного инструктировали как реагировать на звуковой сигнал «сократить максимально сильно», предоставляли от 2 до 3 попыток максимальных сокращений. Наилучшую из 3 попыток принимали за значение максимальной произвольной силы (МПС), а если 3-я попытка была наибольшей, то выполнялась 4-я, и если она была большей, то измерение повторяли пока не установится максимум. Интервал отдыха между каждой попыткой составлял не менее 1 мин.

Изометрические одиночные, парные и тетанические сокращения ТМГ вызывали электрическим раздражением *n. tibialis*, используя прямоугольные импульсы длительностью 1 мс супрамаксимальной силы и частотой 150 имп./с [5] от универсального нейромышечного электростимулятора (тип «ЭСУ-1», СССР) через изолирующую приставку. Общая длительность тетанического раздражения составляла 0,5 с.

Для стимуляции *n. tibialis* использовали монополярный электрод – активный электрод (катод) диаметром 1 см устанавливали под коленной ямкой (место наименьшего сопротивления), а пассивный (анод) размером 6 x 4 см – на нижней трети передней

поверхности бедра. Большой электрод заземления (7,5 x 6,5 см) устанавливали в проксимальной части голени между отводящими и раздражающим электродами. Положение стимулирующих электродов подбирали так, чтобы при некоторой «минимальной» силе раздражения регистрировать (по ЭМГ залпу *m. soleus*) прямой наибольший ответ мышцы (М-ответ). В дальнейшем раздражение увеличивали в 1,5–2 раза, что позволяло использовать супрамаксимальную силу раздражения (на 30–40 % больше «минимальной» силы, при которой впервые достигается максимальный электрический ответ мышцы – М-ответ). Для регистрации М-ответа мышцы применяли поверхностные биполярные чашечные (8 мм) Ag–AgCl-электроды с межэлектродным расстоянием 25 мм, которые устанавливали на *m. soleus* и располагали на уровне 6 см ниже головок *m. gastrocnemius* по средней линии *m. soleus*.

Амплитуда сокращения мышцы в ответ на одиночный электрический импульс, приложенный к двигательному нерву, являлась показателем изометрической силы одиночного сокращения (P_{oc}), а при тетанической ритмической стимуляции – показателем максимальной силы (P_o) сокращения ТМГ (рис. 1).

Для количественной оценки степени совершенства центрально-нервных (координационных) механизмов управления произвольным движением [5] рассчитывали величину силового дефицита (P_d), определяемую как дельта между P_o и МПС (см. рис. 1).

При парном раздражении второй электрический импульс подавали с интервалом в 3, 4, 5, 10, 20 и 50 мс после первого [5] и определяли максимальную амплитуду второго (суммированного) механического ответа ТМГ.

По тендограмме изометрического одиночного сокращения ТМГ в ответ на одиночный электрический импульс, прило-

женный к *n. tibialis*, рассчитывали временные показатели развития P_{oc} (см. рис. 1).

Рассчитывали: время от момента раздражения до пика P_{oc} (время одиночного сокращения – ВОС), время от пика до половины расслабления – $1/2$ ПР и время от момента раздражения до полного расслабления (общее время сокращения – ОВС). Точность измерений составляла 2 мс.

По тендограмме изометрического произвольного сокращения ТМГ, выполненного при условии «сократить максимально быстро и сильно», рассчитывали время нарастания мышечного сокращения, используя «относительные показатели», т.е. время достижения 25-, 50-, 75- и 90%-го уровня напряжения (см. рис. 1). Аналогично по тендограмме электрически вызванного сокращения при стимуляции *n. tibialis* с частотой 150 имп./с [5] определяли время нарастания электрически вызванного сокращения. Точность измерения составляла 2 мс. Максимальную скорость (dP/dt) развития изометрического напряжения определяли дифференцированием кривой сила-время с помощью аналоговой машины («тип «МН-10 м», СССР).

При обработке полученных результатов

исследования рассчитывали среднюю и стандартную ошибку средней ($M \pm m$). Статистическое значение между группами определяли, используя односторонний дисперсионный анализ (ANOVA). Различие между фоновыми (контрольными) показателями и показателями, зарегистрированными после АНОГ, оценивали с помощью параметрического критерия *t* Стьюдента, значение $P < 0,05$ принимали как существенное.

РЕЗУЛЬТАТЫ

АНОГ без пассивного растяжения мышцы.

Силовые свойства. Фоновые исследования функциональных свойств НМА показали, что изучаемые показатели находились в пределах физиологической нормы, и по своим функциональным возможностям все обследуемые могли быть охарактеризованы как практически здоровые люди, ведущие обычный двигательный образ жизни. Исследования, выполненные после механической разгрузки, выявили прежде всего общую однонаправленность изменений тестируемых мышечных свойств.

Анализ изменений силовых свойств

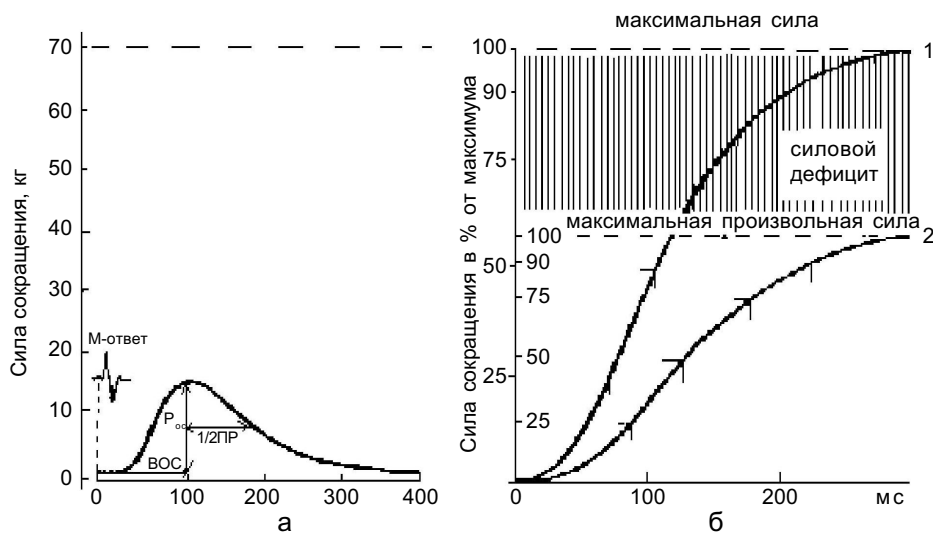


Рис. 1. Пример развития изометрического одиночного сокращения (а), изометрического тетанического и произвольного напряжения (б) человека. ВОС – время одиночного сокращения, $1/2$ ПР – время полурасслабления, ОВС – общее время сокращения, P_{oc} – сила одиночного сокращения

ТМГ после пребывания в условиях 60-суточной АНОГ, обнаружил достоверное снижение силы сокращения мышцы (рис. 2,а, верхняя панель). Так, изометрическая P_{oc} уменьшилась в среднем на 17,3 % ($P < 0,05$); МПС – на 33,5 % ($P < 0,05$) и P_o – на 18,0 % ($P < 0,05$).

МПС ТМГ как до, так и после экспериментальных воздействий была постоянно меньше, чем P_o мышцы и составила в среднем 78,5 и 62,8 % ($P < 0,001$). Таким образом, величина силового дефицита (P_d), указывающая на степень совершенства центрального звена управления мышечным аппаратом, составляла в фоновых исследованиях в среднем $23,1 \pm 4,8$ %, а после экспериментальных воздействий – $37,2 \pm 6,6$ % ($P < 0,001$; см. рис. 2,б,а).

Динамика изометрической силы ТМГ при парной стимуляции двигательного нерва супрамаксимальной интенсивностью,

когда второй стимул наносился через 3, 4, 5, 10, 20, 50 мс после первого, графически представлена на рис. 3. Наибольшая сила сокращения ТМГ до АНОГ отмечается при интервалах между импульсами 4–10 мс, а после АНОГ – 4–20 мс и уменьшение или увеличение интервалов между указанными импульсами сопровождается уменьшением силы ($P < 0,05$), не изменяя общей тенденции развития напряжения мышцы (см. рис. 3,а). Одновременно изменялся характер расположения кривых при одном и том же межимпульсном интервале: относительный прирост силы сокращения ТМГ на второй импульс различался: наибольший он был после АНОГ по сравнению с исходной величиной ($P < 0,001$).

Скоростные свойства. Анализ среднего времени развития изометрической P_{oc} ТМГ после АНОГ не обнаружил значимых изменений ВОС ТМГ. Показатель 1/2 ПР

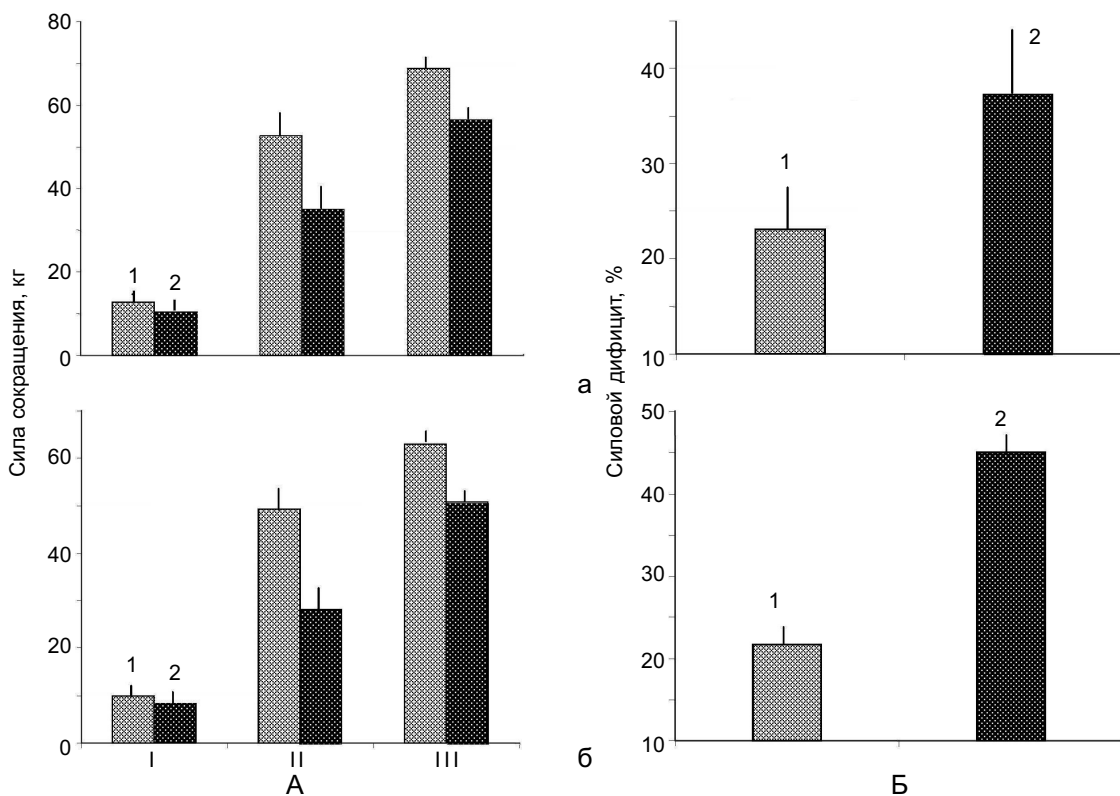


Рис. 2. Влияние 60-суточной антиортостатической гипокинезии (АНОГ) без пассивного (а) и с применением продолжительного пассивного растяжения (б) на силу сокращения – А (I – сила одиночного сокращения, II – максимальная произвольная сила, III – максимальная сила) и силового дефицита – Б: 1 – до, 2 – после АНОГ

ТМГ после АНОГ уменьшился в среднем на 7,2 % ($P < 0,05-0,01$), а ОВС ТМГ увеличилось на 1,3 %.

Скоростно-силовые свойства. Уменьшение МПС (33,5 %) было связано с существенным замедлением скорости развития напряжения во время выполнения «взрывного» произвольного изометрического сокращения (рис. 4, а), и уменьшением максимальной dP_{nc}/dt , когда измерение было выполнено в абсолютных величинах. Нормализованная (% МПС) величина dP_{nc}/dt уменьшилась на 18,7 %.

Анализ электрически вызванных сокращений ТМГ не обнаружил существенных различий кривых сила–время (см. рис. 4, а) и максимальной dP_{tc}/dt , тогда как максимальная нормализованная величина dP_{tc}/dt увеличилась на 23,6 %.

АНОГ с пассивным растяжением мышцы.
Силовые свойства. После 60-суточной

АНОГ все силовые показатели ТМГ были значительно снижены по сравнению с исходными значениями (см. рис. 2,а). Так, изометрическая P_{oc} уменьшалась в среднем на 17 % ($P < 0,05$), МПС – на 43,0 %, P_o – на 19,4 % ($P < 0,05$). МПС как до, так и после АНОГ была постоянно меньше по сравнению с P_o .

Значение P_d после АНОГ с использованием продолжительного пассивного растяжения ТМГ увеличилось на 100 % ($P < 0,02$; см. рис. 2, б).

Динамика изменений изометрической силы ТМГ при парной стимуляции двигательного нерва супрамаксимальной интенсивностью, когда второй стимул наносился через 3, 4, 5, 10, 20, 50 мс после первого, графически представлена на рис. 3, б. Как следует из анализа результатов, наибольшая сила сокращения ТМГ до АНОГ отмечается при интервалах между импульсами 4–20 мс, а после АНОГ с примене-

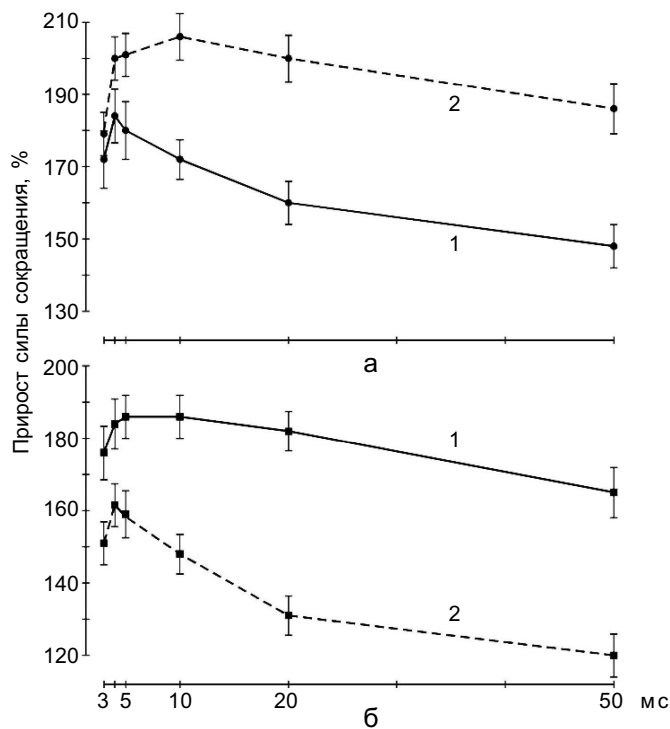


Рис. 3. Влияние антиортостатической гипокинезии (АНОГ) без пассивного растяжения на зависимость максимальной силы сокращения (% амплитуды парного раздражения) от межимпульсного интервала (а) и с применением продолжительного пассивного растяжения трехглавой мышцы голени (б): 1 – до, 2 – после АНОГ

нием продолжительного пассивного растяжения – 4–5 мс и уменьшение или увеличение межимпульсных интервалов сверх указанных сопровождается существенным ее снижением ($P < 0,05$), особенно после растяжения, не изменяя общей тенденции развития напряжения мышцы. Однако изменялся общий характер расположения кривых при одном и том же межимпульсном интервале: относительный прирост силы сокращения ТМГ на второй импульс различался до и после АНОГ – наименьший он был после АНОГ по сравнению с исходным значением ($P < 0,001$).

Скоростные свойства. ВОС и 1/2 ПР ТМГ после механической разгрузки с использованием продолжительного пассивного растяжения мышц-разгибателей стопы практически не изменились. Так, ВОС после 60-суточной АНОГ составило $133 \pm$

7 по сравнению $132 \text{ мс} \pm 5 \text{ мс}$; а 1/2 ПР – 97 ± 3 против $96 \text{ мс} \pm 10 \text{ мс}$ соответственно. ОВС незначительно увеличилось на 6,5 % ($P < 0,05$).

Скоростно-силовые свойства. Анализ результатов изменения времени (обратная величина скорости) нарастания изометрического сокращения ТМГ после АНОГ обнаружил, во-первых, что скорость нарастания изометрического напряжения ТМГ при произвольном «взрывном» сокращении значительно меньше, чем при электрически вызванном сокращении и, во-вторых, кривые сила–время существенно различаются (см. рис. 4, б). Снижение МПС (43,0 %) сопровождалось большим замедлением времени (обратная величина скорости) развития произвольного изометрического сокращения мышцы «взрывного» типа и снижением максимальной $dP_{\text{пс}}/dt$ (до АНОГ $0,39 \pm 0,03$

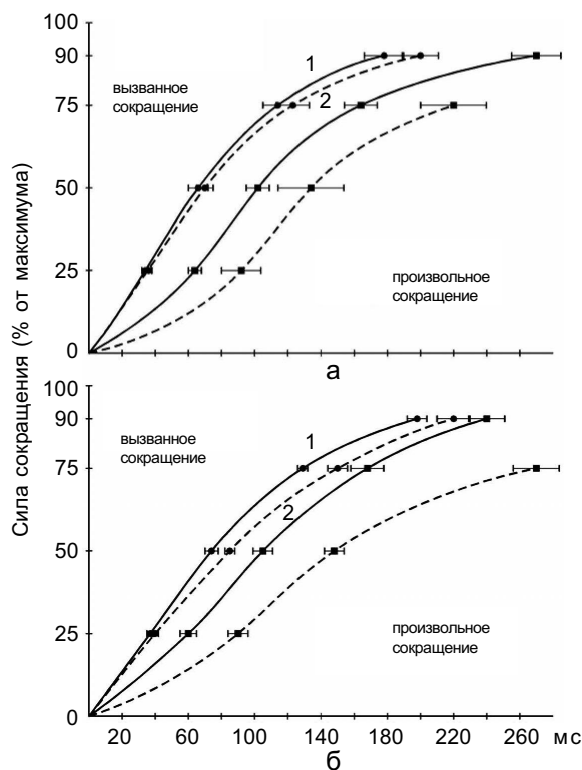


Рис. 4. Влияние 60-суточной антиорто статической гипокинезии (АНОГ) без пассивного растяжения трехглавой мышцы голени (а) и с применением продолжительного пассивного растяжения (б) на изменение кривых сила–время электрически вызванного и произвольного сокращений мышцы: 1 – до, 2 – после АНОГ

после $0,13 \text{ кг} \cdot \text{мс}^{-1} \pm 0,05 \text{ кг} \cdot \text{мс}^{-1}$), когда выражали в абсолютных величинах. Нормализованная (% от МПС) величина dP_{nc}/dt увеличилась на 12,5 % ($P < 0,05$).

Анализ кривая сила–время электрически вызванного тетанического сокращения ТМГ показывает снижение скорости нарастания изометрического напряжения (см. рис. 4, б) и уменьшение максимальной dP_{tc}/dt (до АНОГ $0,84 \pm 0,04$ после $0,78 \text{ кг} \cdot \text{мс}^{-1} \pm 0,02 \text{ кг} \cdot \text{мс}^{-1}$), когда измерение было выполнено в абсолютных величинах. Нормализованная (% МПС) величина dP_{tc}/dt увеличилась на 14,9 % ($P < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

АНОГ без пассивного растяжения.

В работе показано, что сократительные свойства медленно сокращающейся ТМГ [4] относительно быстро изменяются под воздействием механической разгрузки, дополняя, таким образом, ранее полученные данные [5, 38, 39].

Быстрая природа изменений характеристик кривой развития изометрической P_{oc} (ВОС и 1/2 ПР), с одной стороны, может быть объяснена, относительно большей атрофией медленно сокращающихся волокон (типа I), которые составляют большинство ТМГ [34], а с другой стороны, – длительностью процессов высвобождения и потребления Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом (СР) в результате механической разгрузки мышцы [17]. Первичным триггером этих изменений может быть изменение скорости выделения Ca^{2+} из миофибриллярных белков [17]. Уменьшение скорости потребления Ca^{2+} отмечается при неиспользовании мышцы [37]. Снижение скорости высвобождения Ca^{2+} отразится либо на увеличении времени кривой развития P_{oc} , либо позволит развить большую величину P_{oc} .

Природу снижения P_{oc} трудно объяснить. Первичный фактор объяснений этих

изменений может быть связан с изменениями в функции СР [17]. Однако это трудно представить, поскольку влияние СР на P_{oc} «маскируется» атрофическими процессами, но тем не менее, это представляет интерес, т.к. предполагается, что изменение P_{oc} происходит благодаря изменениям в СР. Изменения в кинетике механических ответов при парном раздражении с разными межимпульсными интервалами указывает на изменение содержания Ca^{2+} в мышце. Уменьшение длительности одиночного сокращения ТМГ может быть отчасти следствием снижения P_{oc} .

Кроме того, изменение в показателях P_{oc} может быть причиной изменений чувствительности мышцы после механической разгрузки, как отмечалось ранее [30], и мышечной температуры. Мы предполагаем, что в нашем эксперименте постельный режим – причина уменьшения чувствительности мышцы. Колебание температуры тела также может быть причиной изменения температуры мышцы и таким образом влиять на их сократительные свойства [21]. В настоящем исследовании у всех обследованных непрерывно контролировалась температура тела, которая была в пределах физиологической нормы ($36,4\text{--}36,6^\circ\text{C}$). Снижение температуры в пределах 5°C рассматривается как физиологическая норма. АНОГ не «сухая» водная иммерсия, когда действительно отмечается некоторое снижение температуры тела (2). Однако уменьшение настолько незначительное, что это не может быть связано со скоростью распространения нервного импульса по мышечному волокну [9] и в этом случае можно проигнорировать возможность влияния этого фактора.

Уменьшение P_{oc} , наблюдаемой в настоящем исследовании, согласуется с предыдущими данными, которые показали снижение мышечной силы во время произвольных и электрически вызванных сокра-

щений [5, 38, 39]. У всех обследованных после АНОГ обнаружено однонаправленное уменьшение P_{oc} и P_o ТМГ. P_o ТМГ уменьшается, составляя 18 % ее исходной величины. P_o является показателем способности мышцы генерировать максимальную силу и отражает число активных мостиков между актиновыми и миозиновыми нитями [20]. АНОГ продуцирует снижение P_o [5, 23, 24, 38, 39], что, вероятно, отражает снижение числа активных поперечно-полосатых мостиков и как следствие – уменьшение работоспособности. По этому случаю можно высказать два предположения. Первое, после АНОГ общее количество поперечно-полосатых мостиков было уменьшено, и второе, что сила, развиваемая каждым мостиком, была снижена. Однако, когда удельная сила мышцы рассчитывается на единицу площади поперечного сечения, то сила оказывается одинаковой после неиспользования [51]. Это указывает, что предположение об уменьшении максимального числа поперечных мостиков более адекватно к нашим результатам, чем изменение их плотности. Таким образом, снижение P_o ТМГ может быть непосредственно связано с уменьшением диаметра волокон и с атрофией мышцы.

Дополнительно, снижение P_o целой мышцы предполагает, что продолжительная механическая разгрузка может затронуть некоторые этапы связи возбуждение – сокращение [23]. Это может быть изменение в сарколемме потенциала действия, изменение движения заряда в Т-тубулярных каналах и/или прямое влияние на потребление Ca^{2+} СР. Альтернативно, неупотребление, вызывая атрофию мышцы, может увеличить внеклеточное пространство и напряженность мышцы, в целом, уменьшиться больше, чем площадь поперечного сечения волокна.

Механизмы, ответственные за потерю силы мышцы при неиспользовании, остаются

не вполне ясными. Уменьшение площади поперечного сечения медленно- и быстросокращающихся волокон мышцы не может быть одним из возможных механизмов, ответственных за снижение силы, хотя атрофия мышцы, вероятно, влияет на потерю силы. Морфологические исследования в нашей работе не были выполнены. Однако Nikida и соавт. [31] показали, что относительные изменения в размере мышцы и волокон были меньше, чем относительное изменение в силе. Эти авторы показали, что ультраструктурные изменения, возможно, уменьшили способность продуцировать силу сокращения мышцы во время и после продолжительной механической разгрузки.

Намного большее уменьшение МПС (34 %) по сравнению с незначительными изменениями в P_o (18 %) после 60-суточной АНОГ указывает на неспособность центральной нервной системы нормально активировать ТМГ. Является ли это недостатком мотивации со стороны отдельных обследованных или в произвольном уменьшении частоты стимуляции мотонейрона, или ансамбля мотонейронов, иннервирующих данную группу мышц, трудно распознать. Хотя все обследованные были крайне высоко мотивированы и не сообщали о возможном дискомфорте или жесткости в коленном суставе при выполнении тестовых испытаний (развитие МПС), которые могли бы объяснить низкий показатель МПС. Увеличение значения R_d свидетельствует о снижении центральной посылки к мышце, что снижает моторный контроль произвольного сокращения мышцы. Фактически, во время выполнения МПС электромиографическая активность была значительно измененной в результате механической разгрузки [23, 28]. Кроме того, снижение амплитуды после разгрузки предполагает, что меньшее число моторных, двигательных, единиц мышцы было активировано при неупотреблении

[28], и более того, было обнаружено уменьшение максимальной частоты импульсации моторных единиц [24], что можно было бы объяснить изменениями в проприоцептивных афферентах [48].

Скорость развития вызванного сокращения в ответ на электрическую стимуляцию нерва (частота 150 имп./с) и рассчитанная в относительной шкале изменилась незначительно после АНОГ. Это наблюдение согласуется с ранее полученными данными, что при разгрузке мышц не отмечалось существенных изменений в скоростно-силовых характеристиках мышц, [55] и поддерживает наблюдения об относительном постоянстве механизма тетанического сокращения и современной (поперечных мостиков) теории мышечного сокращения [52]. Поэтому, по-видимому, разумно заключить, что неупотребление (например, АНОГ) имеет небольшое влияние на цикл поперечных мостиков или на активность миозина [20].

АНОГ с пассивным растяжением мышцы

Наше исследование подтверждает ранее полученные данные, что продолжительное пассивное растяжение скелетной мышцы у человека может быть причиной значительных снижений силовых возможностей [13, 14, 27]. Продолжительное (в нашем случае 5 ч/сут на протяжении 60 сут) пассивное растяжение ТМГ приводит к снижению P_{oc} (на 17 %), МПС (на 43 %) и собственно-силовых свойств мышцы, оцениваемых по значению P_o (на 19 %). Снижение МПС было более значительным по сравнению с тем, что сообщалось ранее [13, 27]. Существенно большая потеря силы сокращения ТМГ может частично быть обусловлена сниженной активностью в условиях АНОГ и, частично, благодаря уменьшению способности генерировать силу. Более того, дефицит силы может быть связан и нарушением в передаче силы от волокон мышцы к ее сухожилию, поскольку возможно повреждение мышечно-

сухожильного соединения, которое крайне чувствительно к чрезмерному продолжительному растяжению и легко повреждаются из-за высокого напряжения, развивающегося на концах утонченных мышечных волокон в результате продолжительного растяжения [29]. В результате можно ожидать нарушения связи между жесткостью мышцы и сократительной работоспособностью и как следствие этого уменьшения жесткости мышечного пучка генерированной силы [14, 27].

Кроме изменений жесткости мышцы в результате продолжительного пассивного растяжения, можно предположить изменение и соединительной ткани, вызванное повреждением мышцы, что будет дополнительным фактором, вызывающим снижение генерирования силы [11, 43]. Подтверждением этого является чрезвычайно повышенная активность креатинкиназы как маркера степени повреждения мышцы при выполнении упражнений. Обнаружено значительное увеличение на 250 % этого показателя после сильного резкого растяжения мышцы [12] и только на 62 % после пассивного растяжения на протяжении 17 мин [53].

При обсуждении нервных механизмов, определяющих изменения в сократительных свойствах мышцы в ответ на ее растяжение, обычно рассматривают нарушения в афферентах мотонейронного пула [22]. Действительно, нейромышечные ответы по принципу обратной связи могут ослабить активность мышцы после продолжительного пассивного растяжения и, в частности, сухожильный рефлекс Гольджи, механорецепторы (афференты типа III) и рецепторы боли (афференты типа IV). Сухожильный рефлекс Гольджи вызывает аутогенное торможение, когда сухожильный орган, расположенный в сухожильно-мышечных суставах, регистрирует крайне высокое напряжение, развиваемое мышцей при ее растяжении. По принципу обратной связи афференты, организованные сухо-

жильным органом Гольджи, вызовут торможение агониста [25], что понизит уровень генерирования силы и уменьшит потенциально «вредное» напряжение на мышцу. Активность сухожильного органа Гольджи повышается при чрезвычайно интенсивном растяжении мышцы [32] и частота импульсации его рецепторов во время растяжения мышцы не является постоянной и поэтому эффект возникает практически мгновенно [10]. Действительно, величина МПС после продолжительного пассивного растяжения ТМГ составила в среднем только 43 % от исходной. Снижение активности после прекращения растяжения, возможно, частично и объясняется активностью сухожильного органа Гольджи [32] как одного из вероятных механизмов уменьшения МПС (сократительных свойств) в условиях настоящего эксперимента. Пассивное растяжение аннулирует не только возбуждение афферентов от мышечных веретен [10, 47], но и возбудимость мотонейронного пула может быть ослаблена непрямо через волокна I-а пресинаптическим торможением I-а афферентов [22].

Увеличенная податливость мышечно-сухожильного комплекса может также ослабить нервную активность по принципу обратной связи [27]. Обнаружено значительное (84,8 %) снижение амплитуды стреч-рефлекса после быстрых пассивных ритмических растяжений мышцы на протяжении одного часа [13], что связано с существенным уменьшением пассивной сопротивляющейся силы растяжения мышцы, позволяя предположить, что источник уменьшения рефлекторной чувствительности – это снижение активности афферентов большого диаметра как результат уменьшенной механической чувствительности мышечных веретен к растяжению [13, 27].

Можно предположить, что снижение силовых сократительных свойств (в част-

ности, уменьшение МПС и P_0) после продолжительного пассивного растяжения в условиях АНОГ связано с дискомфортом и болевыми ощущениями. Действительно, механорецепторы (центростремительные афференты типа III) и рецепторы боли (афференты типа IV) по принципу обратной связи могут уменьшить центральную посылку [16, 32]. Однако в настоящем исследовании сообщений о дискомфорте или боли во время выполнения максимальных произвольных усилий после выполнения продолжительной двухмесячной «тренировки» с пассивным растяжением мышц-разгибателей стопы, не поступало и, таким образом, восприятие растяжения и дискомфорт рассматривать как причину временного отказа от активности может быть отвергнуто, хотя некоторые обследуемые сообщали, что их «мышцы не хотят сокращаться» после применения продолжительного растяжения, несмотря на максимальное произвольное усилие.

Уменьшенная способность генерировать силу мышцы во время произвольных максимальных усилий после продолжительного пассивного растяжения может быть вызвана дополнительными факторами, чем снижение центральной, моторной, активности определяющей величину МПС в условиях АНОГ [7, 40] и, в частности, изменения в отношениях длина-напряжение и/или податливой деформации соединительной ткани. Снижение МПС после продолжительного пассивного растяжения, возможно, обусловлено удлинением мышечных волокон. Ультразвуковые исследования, выполненные после пассивного растяжения с измерением длины волокон отдельных головок ТМГ, обнаружили увеличение длины мышечных волокон в *m. soleus*, *m. lateral gastrocnemius* и в *m. medial gastrocnemius* на 8, 8 и 2 мм соответственно [35]. В результате взаимодействие актиновых и миозиновых нитей приходится

на менее «оптимальную» часть характеристической кривой длина–напряжение и, соответственно, напряжение мышцы развивается меньше. Изменение характеристик длина–напряжение, вызванное пассивным максимальным растяжением ТМГ, оказывает влияние на паттерн нервной активности: обнаруживается существенное уменьшение активности моторных единиц и электромиограммы [27]. Более того, уровень нервной модификации, вызванной пассивным растяжением, зависит от общего растяжения мышечно-сухожильного комплекса [14].

В настоящей работе используемое продолжительное пассивное растяжение мышцы существенно отличается от применяемого спортсменами при выполнении требуемого движения/упражнения. Интенсивность и продолжительность растяжения мышцы, необходимые для длительного изменения жесткости в мышце, неизвестны [45]. Более того, жесткость по своему вязко-эластическому характеру имеет тенденцию очень быстро возвращать мышцу к состоянию покоя и/или генетически и биомеханически определять длину мышцы. В этой связи представляется сомнительным противостоять этой тенденции, используя продолжительное пассивное растяжение мышцы, чтобы увеличить работоспособность, когда, в целом, работоспособность мышцы может быть поставлена под угрозу, изменяя тонкий динамический баланс нервных, архитектурных и электрофизиологических факторов, которые существуют в мышце, чтобы генерировать силу. Элементы, влияющие на жесткость мышцы, могут ее «стабилизировать» чтобы генерировать силу, и любое изменение этих элементов ставит под угрозу производство силы.

Таким образом, настоящее исследование показывает, что продолжительное пассивное растяжение мышц в условиях сниженной механической разгрузки не может облегчать сократительные свойст-

ва. Снижение МПС частично обусловлено снижением активности мышцы, а частично – способностью генерировать силу.

Yu. Koryak

STATIC STRETCH TRAINING IN CONDITIONS OF SIMULATED MICROGRAVITY MAINTAINS CONTRACTILE PROPERTIES OF MUSCLES

The effect of a 60-day 6° head-down tilt (HDT) of bed rest with and without countermeasures on the mechanical properties of human the triceps surae muscle was studied in 12 healthy young men subjects. One group (n=6; mean age 30.8 ± 3.1 years) underwent a 60-day HDT and a second group (n=6; mean age 30.5 ± 1.9 years) underwent HDT with countermeasures (long-term passive stretching). The results showed that the contractile properties of skeletal muscle change considerably. After HDT without countermeasures the maximal voluntary contraction (MVC) declined by 33.5 % (P < 0.05), the electrically evoked tetanic tension at 150 Hz (P_o) and isometric twitch contraction (P_t) reduced by 18.0 % (P < 0.02) and 17.3 % (P < 0.05), respectively. Time-to peak tension (TPT) of the twitch increased by 3.4 %, but half-relaxation time (1/2 RT) decreased by 7.2 %, and total contraction time (TCT) increased not significantly. The difference between P_o and MVC expressed as a percentage of P_o and referred to as force deficiency (P_d), has also been calculated. The P_d increased by 61 % (P < 0.001). The rate of rise of voluntary contractions calculated according to an relative scale significantly reduced, but the electrically evoked contraction no substantial changes were observed. After HDT with long-term passive stretching caused decrease by 43.0 % (P < 0.05) in MVC, and P_t, and in P_o by 17.0 %, and by 19.4 % (P < 0.05), respectively. The P_d increased significantly by 100 % (P < 0.001). TPT, and 1/2 RT not change significantly, and TCT of the twitch increased by 6.5 %, respectively in relation to the control condition. The rate of rise of electrically evoked tetanic tension did not change significantly during HDT with countermeasures but the rate of rise in on isometric voluntary tension development were decreased. These data indicate that prolonged passive stretching of a single muscle decreases voluntary strength. Thus, the received data specify, that the long passive stretching of a muscle does not find out preventive facilitate contractile properties of the muscular device from negative influences of mechanical unloading. This study presents evidence that prolonged passive muscle stretching can lead to some modification of contraction material behavior. In addition, altered material properties seem to affect proprioceptive feedback and, therefore, the motor unit activation in proportion to the contractile failure.

Key words: human triceps surae muscle – bed rest muscle stretching – contractile properties – voluntary activation electrically induced contraction – weightlessness countermeasures.

The State Science Center Institute of Medical and Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барер А.С., Савинов А.П., Северин Г.И., Стоклицкий А.Ю., Тихомиров Е.П. Физиолого-гигиеническое обоснование конструкции некоторых индивидуальных средств профилактики неблагоприятного действия невесомости // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1975. – **9**. – С. 41–47.
2. Волков М.Ю., Молчанова Л.Д. Изменения температуры тела человека в условиях 1- и 3-суточной иммерсии // Актуальные пробл. космич. биологии и медицины. – М.: Медицина, 1977. – С. 110–111.
3. Козловская И.Б., Григорьева Л.С., Гевлич Г.И. Сравнительный анализ влияний невесомости и ее моделей на скоростно-силовые свойства и тонус скелетных мышц человека // Там же. – 1984. – **6**. – С. 22–26.
4. Коряк Ю.А. Сравнение сократительных свойств мышц нижних конечностей у человека // Физиол. журн. – 1994. – **40**. – С. 30–38.
5. Коряк Ю.А. Функциональные свойства нервно-мышечного аппарата человека при повышенной и пониженной нагрузке : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М. – 2006. – 52 с.
6. Коряк Ю.А. Влияние пассивного растяжения трехглавой мышцы голени (ТМГ) у человека на ее сократительные свойства. – В кн.: XII конф. по космич. биологии и авиакосмич. медицине. – М. – 2002. – С. 182–183.
7. Коряк Ю.А., Козловская И.Б. Возбудимость мотонейронного пула у человека в условиях длительной антиортостатической гипокинезии (АНОГ). – В кн.: VII Всерос. симпозиум «Эколого-физиол. проблемы адаптации». – М., 1994. – С. 127–128.
8. Степанцов В.И., Тихонов М.А., Еремин А.В. Физическая тренировка как метод предупреждения гиподинамического синдрома // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1972. – **6**. – С. 64–69.
9. Христова Л.Г., Гидиков А.А., Асланова И.Ф., Киренская А.В., Козлова В.Г., Козловская И.Б. Влияние иммерсионной гипокинезии на некоторые параметры мышечных потенциалов человека // Там же. – 1986. – **20**. – С. 27–31.
10. Alter M.J. Science of Flexibility. – Champaign, IL: Human Kinetics, 1996.
11. Armstrong R.B., Duan C., Delp M.D., Hayes D.E., Glenn G.M., Allen G.D. Elevations in rat soleus muscle $[Ca^{2+}]$ with passive stretch // J. Appl. Physiol. – 1993. – **74**. – P. 2990–2997.
12. Ashmore R.C., Hitchcock L., Lee Y.B. Passive stretch of adult chicken muscle produces myopathy remarkably similar to hereditary muscular dystrophy // Exp. Neurol. – 1988. – **100**. – P. 341–353.
13. Avela J., Kyrułdinen H., Komi P.V. Altered reflex sensitivity after repeated and prolonged passive muscle stretching // J. Appl. Physiol. – 1999. – **86**. – P. 1283–1291.
14. Avela J., Finni T., Liikavainio T., Niemela E., Komi P.V. Neural and mechanical responses of the triceps surae muscle group after 1 h of repeated fast passive stretches // Ibid. – 2004. – **96**. – P. 2325–2332.
15. Bigland-Ritchie B.R., Furbush F.H., Gandevia S.C., Thomas C.K. Voluntary discharge frequencies of human motoneurons at different muscle lengths // Muscle & Nerve. – 1992. – **15**. – P. 130–137.
16. Bigland-Ritchie B., Furbush F., Woods J.J. Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors // J. Appl. Physiol. – 1986. – **61**. – P. 421–429.
17. Briggs F.N., Poland J.L., Solard R.J. Relative capabilities of sarcoplasmic reticulum in fast and slow mammalian skeletal muscle // J. Physiol. – 1977. – **266**. – P. 587–594.
18. Caldwell G.E. Tendon elasticity and relative length: effects on the Hill two-component muscle model // J. Appl. Biomech. – 1995. – **11**. – P. 1–24.
19. Campbell K.M., Biggs N.L., Blanton P.L., Lehr R.R. Electromyographic investigation of the relative activity among four components of the triceps surae // Amer. J. Phys. Med. – 1973. – **52**. – P. 30–41.
20. Close R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscle // Physiol. Rev. – 1972. – **52**. – P. 129–197.
21. Davies C.T.M., Young K. Effect of temperature on the contractile properties and muscle power of triceps surae in humans // J. Appl. Physiol. – 1983. – **55**. – P. 191–195.
22. Delwaide P.J. Human monosynaptic reflexes and presynaptic inhibition. An interpretation of spastic hyperreflexia // New Dev. Electromyogr. Clin. Neurophysiol / Ed. Desmedt J.E. Karger, Basel. – 1973. – **3**. – P. 508–522.
23. Duchateau J., Hainaut K. Electrical and mechanical changes in immobilized human muscle // J. Appl. Physiol. – 1987. – **62**. – P. 2168–2173.
24. Duchateau J., Hainaut K. Effects of immobilization on contractile properties, recruitment and firing rates of human motor units // J. Physiol. – 1990. – **422**. – P. 55–65.
25. Eccles J.C., Eccles R.M., Lundberg A. Synaptic actions on motoneurons caused by impulses in Golgi tendon organ afferents // Ibid. – 1957. – **138**. – P. 227–252.
26. Edman K.A.P. Double-hyperbolic force-velocity relation in frog muscle fibres // Ibid. – 1988. – **404**. – P. 301–321.
27. Fowles J.R., Sale D.G., MacDougall J.D. Reduced strength after passive stretch of the human plantarflexors // J. Appl. Physiol. – 2000. – **89**. – P. 1179–1188.
28. Fuglsang-Frederiksen A., Scheel U. Transient decrease in number of motor units after immobilization in man // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1978. – **41**. – P. :924–929.

29. Garrett W.E., Safran M.R. Jr., Seaber A.V., Glisson R.R., Ribbeck B.M. Biomechanical comparison of stimulated and nonstimulated skeletal muscle pulled to failure // *Amer. J. Sports Med.* – 1987. – **15**. – P. 448–454.
30. Goldspink G., Tabary C., Tabary J.C., Tardien C., Tardien G. Effect of denervation on the adaptation of sarcomere length of the muscle // *J. Physiol.* – 1974. – **236**. – P. 733–742.
31. Hikida R.S., Gollnick P.D., Dudley G.A., Convertino V.A., Buchanan P. (1989) Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity // *Aviat. Space Environ. Med.* – 1989. – **60**. – P. 664–670.
32. Houk J.C., Singer J.J., Goldman M.R. Adequate stimulus for tendon organs with observation on mechanics of the ankle joint // *J. Neurophysiol.* – 1971. – **34**. – P. 1051–1065.
33. Hutton R.S. Neuromuscular basis of stretching exercises. – In: *Strength and Power in Sport* / Ed. Komi P.V. – Oxford, UK: Blackwell Sci, 1992. – P. 29–38.
34. Johnson M.A., Polgar J., Weightman D., Appleton D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study // *J. Neurol. Sci.* – 1973. – **18**. – P. 111–129.
35. Kawakami Y., Abe T., Kuno S.Y., Fukunaga T. Training-induced changes in muscle architecture and specific tension // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 1995. – **72**. – P. 37–43.
36. Kawakami Y., Akima H., Kubo K., Muraoka Y., Hasegawa H., Kouzaki M., Imai M., Suzuki Y., Gunji A., Kanehisa H., Fukunaga T. Changes in muscle size, architecture and neural activation after 20 days of bed rest with and without countermeasures // *Ibid.* – 2001. – **84**. – P. 7–12.
37. Kim D.H., Witzmann F.A., Fitts R.H. Effects of disuse on sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* – 1982. – **243**. – C. 156–C160.
38. Koryak Yu. Electromyographic study of the contractile and electrical properties of the human triceps surae muscle in a simulated microgravity environment // *J. Physiol.* – 1998. – **510**. – P. 287–295.
39. Koryak Yu. “Dry” immersion induces neural and contractile adaptations in the human triceps surae muscle // *Environ. Med.* – 2002. – **46**. – P. 17–27.
40. Kozlovskaya I.B., Burlachkova N.I. Effects of microgravity on spinal reflex mechanisms. – In: *12th Man in Space Symp.: The Future of Human in Space.* – Washington, 1997. – P. 310–311.
41. Leterme D., Falempin M. Contractile properties of rat soleus motor units following 14 days of hindlimb unloading // *Pflug. Arch.* – 1996. – **432**. – P. 313–319.
42. Lieber R.L., Boakes J.L. Sarcomere length and joint kinematics during torque production in frog hindlimb // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1988. – **254**. – P. C759–C768.
43. Lieber R.L., Woodburn T.M., Friden J. Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain // *J. Appl. Physiol.* – 1991. – **70**. – P. 2498–2507.
44. Magnusson S.P. Passive properties of human skeletal muscle during stretch maneuvers. A review // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 1998. – **8**. – P. 65–77.
45. Magnusson S.P., Simonsen E.B., Aagaard P., Dyhre-Poulsen P., McHugh M.P., Kjaer M. Mechanical and physiological responses to stretching with and without preisometric contraction in human skeletal muscle // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 1996. – **77**. – P. 373–378.
46. Magnusson S.P., Simonsen E.B., Aagaard P., Kjaer M. Biomechanical responses to repeated stretches in human hamstring muscle in vivo // *Amer. J. Sports Med.* – 1996. – **24**. – P. 622–628.
47. Matthews P.B.C. *Mammalian Muscle Receptors and Their Central Actions.* – London: Arnold, 1972. – C.
48. Mayer R.F., Burke R.E., Toop J., Hodgson J.A., Kanda K., Walmsley B. The effect of long-term immobilization on the motor unit population of the cat medial gastrocnemius muscle // *Neuroscience.* – 1981. – **6**. – P. 725–739.
49. Pette D., Vrbova G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers // *Muscle & Nerve.* – 1985. – **8**. – P. 676–689.
50. Ross H.E., Brodie E., Benson A. Mass discrimination during prolonged weightlessness // *Science.* – 1984. – **225**. – P.219–221.
51. Steven L., Mounier Y., Holy X., Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – **68**. – P. 334–340.
52. Simmons R.M., Jewell B.R. Mechanics and models of muscular contraction // *Rec. Adv. Physiol.* – 1974. – **9**. – P. 87–147.
53. Smith L.L., Brunetz M.H., Chenier T.C., McCammon M.R., Houmard J.A., Franklin M.E., Israel R.G. The effects of static and ballistic stretching on delayed-onset muscle soreness and creatine kinase // *Res. Q. Exerc. Sport.* – 1993. – **64**. – P. 103–107.
54. Stump C.S., Overton J.M., Tipton C.M. Influence of single hindlimb support during simulated weightlessness in the rat // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – **68**. – P. 627–634.
55. Timson B.F. Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – **69**. – P. 1935–1945.

Учреждение РАН «Гос. Науч. центр РФ – Ин-т мед.-биол. проблем» РАН, Москва, Россия
E-mail: yurikoryak@mail.ru

Материал поступил в редакцию 26.06.2009

І.В. Бродяк, А.Р. Гнатуш, Н.О. Сибірна

Морфологічна характеристика плазматичних мембран лімфоцитів за умов експериментального цукрового діабету на тлі впливу L-аргініну та аміногуанідину

Досліджено діаметр і площу лімфоцитів та їхніх ядер, резервні та регуляторні можливості мембран цих клітин у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЦД), а також на тлі введення екзогенного L-аргініну або аміногуанідину. У тварин з ЦД виявили істотне розходження в розмірі та мембранному фонді лімфоцитів, який для цих клітин у контролі становив 70 %, а при діабеті – 40 %, що може бути однією з причин, які провокують зміни у властивостях і функціональному стані лімфоцитів. За умов діабету введення екзогенного L-аргініну та аміногуанідину спричинило позитивний коригувальний ефект – об'єм лімфоцитів зменшився, та покращилися регуляторні можливості мембран цих клітин.

Ключові слова: лімфоцити, експериментальний цукровий діабет, L-аргінін, аміногуанідин.

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) характеризується розвитком гіпоксичного стану. За умов гіпоксії дефіцит енергетичних субстратів активує вільнорадикальне окиснення та підвищує стабільність метаболітів оксиду азоту, що призводить до посилення цитотоксичних властивостей активних форм кисню та до розвитку оксидативного стресу [1, 7, 8, 15]. Патогенетична роль останнього пов'язана з пошкодженням ДНК, ліпідів, білків, порушенням клітинного гомеостазу та накопиченням молекул із зміненою структурою [3, 12]. Окиснення білкових і ліпідних компонентів плазматичної мембрани може викликати деполаризацію, зміни у білково-ліпідному складі та резервних можливостях мембран або лізис клітин [4, 13].

За умов діабету для послаблення токсичної дії вільних радикалів кисню використовується різноманітні речовини, зокрема L-аргінін. Дані літератури з цього питання суперечливі, тому що аргінін, як відомо,

є донором оксиду азоту, але з іншого боку, може виступати чинником, який пригнічує виділення супероксидного аніона. В одних дослідженнях показано [1], що у тварин, хворих на ЦД, при введенні L-аргініну збільшується вміст глюкози та глікозильованого гемоглобіну у крові, тобто посилюється патологічний стан. Інші дані літератури, навпаки, вказують на можливість коригувального позитивного ефекту введення L-аргініну [6, 9]. Існує кілька шляхів сприятливого впливу екзогенного L-аргініну при діабеті. Одним з основних є зниження переокисного окиснення ліпідів під час тривалого прийому аргініну [9], що може бути перспективним напрямком у діабетології. Застосування аміногуанідину (АГ) – селективного інгібітора індукцибельної NO-синтази та інгібітора неферментативного глікозилювання, а також чинника, здатного попереджати посттрансляційні модифікації білків за участю пероксинітриду, є відмінним від дії L-аргініну, проте актуальним

© І.В. Бродяк, А.Р. Гнатуш, Н.О. Сибірна

напрямок при цій патології [2].

Мета нашої роботи – дослідження об'єму лімфоцитів, діаметра їхніх ядер, резервних і регуляторних можливостей мембран цих клітин у нормі та за умов експериментального ЦД, а також впливу системи L-аргінін–NO на зміни у структурі мембран при введенні екзогенного L-аргініну і АГ.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 120–140 г. Тваринам забезпечили вільний доступ до їжі та води із перебуванням у стандартних умовах (12-годинна зміна світла та темряви). ЦД викликали внутрішньоочеревинним введенням стрептозотозину фірми “Sigma” (США) у дозі 7 мг/100 г. Стрептозотозин розчиняли в 10 ммоль/л цитратному буфері; рН 5,5. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів “Lachema” (Чехія). В експерименті використовували тварин зі вмістом глюкози 14–16 ммоль/л. Через 72 год з моменту індукції діабету тваринам однієї групи починали вводити з питною водою L-аргінін (“Reanal”, Угорщина) в концентрації 1,25 г/л протягом 14 діб, а іншій групі – АГ (“Sigma”, США) у концентрації 1 г/л протягом 30 діб. Тварин, яким вводили досліджувані речовини, декапітували під ефірним наркозом відповідно на 14-ту та 30-ту добу експерименту.

Забір крові для отримання лейкоцитів проводили з застосуванням 3,8%-го розчину цитрату натрію (кінцеве розведення цитрат натрію : кров = 1:100).

Лімфоцити виділяли з цитратної крові у градієнті густини з використанням Gradisol-G (“Aqua-medica”, Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (рН

7,2–7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98 %.

У камері Горяєва підраховували кількість виділених лімфоцитів, які центрифугували при 1500 хв⁻¹ протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину, а тоді концентрацію клітин в осаді доводили до 100–200 тис./мкл.

У пробірки об'ємом 1,5 мл поміщали по 10 мкл суспензії лімфоцитів. Додавали по 100 мкл одного із розчинів хлориду натрію (0,9; 0,45; 0,2 %). В 0,45%-му розчині хлориду натрію клітини інкубували 40 с, 60 с, 5 хв чи 1 год. В 0,2%-му розчині хлориду натрію клітини інкубували 40 с. Перша пробірка (0,9%-й розчин хлориду натрію) була контролем. Із інших пробірок після певного проміжку часу інкубації забирали і переносили на предметне скло краплю розведеної суспензії об'ємом 5 мкл. Із цієї краплі виготовляли мазок і фіксували метиловим спиртом. Клітини зафарбовували за Романовським. Під світловим мікроскопом при збільшенні 1350 (окуляр-мікромір MOB-1-15*) вимірювали діаметр клітин. Вираховували середній діаметр (D) для 40–50 лімфоцитів на одному мазку. Площу поверхні клітин розраховували за формулою: $S = \pi D^2$.

Порівнюючи розміри клітин в ізотонічному розчині та після 1-годинної інкубації в гіпотонічному розчині, визначали регуляторну здатність клітин. Оцінку проводили за коефіцієнтом, який вираховували як відношення різниці діаметрів до вихідного діаметра клітин:

$$\text{коефіцієнт регуляторної здатності} = (D_{0,45\% (1 \text{ год})} - D_{0,9\%}) / D_{0,9\%}$$

Резервні можливості мембрани визначали за зміною розміру клітин після 40-секундної інкубації в 0,2%-му розчині хлориду натрію порівняно з вихідним значенням. Розраховували індекс резервної поверхні: $S_{0,2\%} / S_{0,9\%}$. Зменшення індексу є показником дефіциту мембранного фонду [10].

Результати досліджень обробляли статистично з використання середнього арифметичного та стандартної похибки ($M \pm m$), а також достовірного інтервалу, що використовувався при оцінці ступеня достовірності (P) за допомогою критерію t Стьюдента. Розбіжності вважалися статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Щоб установити основні відмінності в розмірі лімфоцитів периферичної крові при ЦД порівняно з контролем, морфометрично досліджували напрямок змін у розмірі цих клітин при введенні екзогенного L-аргініну або АГ.

Залежно від виміряних діаметрів лімфоцитів (у мікрометрах), графічно зображали розподіл клітин у відсотковому відношенні, а отримані результати представляли у вигляді лейкоцитограми (рис. 1).

У популяції лімфоцитів контрольних тварин виявили, що клітини характеризуються широкою варіацією розмірів – від 3 до 14 мкм (див. рис. 1). Більшість лімфоцитів (23 %) мають розмір 7 мкм. Малі

лімфоцити мають діаметр до 6 мкм. Середні – від 6 до 8 мкм – це клітини, які синтезують антитіла [16]. Лімфоцити великого розміру мають діаметр більше ніж 8 мкм – це клітини з вираженою мітотичною активністю [5].

Поєднання різних пулів лімфоїдних клітин у периферичній крові або перевага одного із них впливає на характер клінічного перебігу захворювання та імунний статус хворого [5]. Морфологічно лімфоцити периферичної крові контрольних щурів і тварин з ЦД мало відрізняються, тоді як при діабеті статистичний аналіз розподілу лімфоцитів за розміром виявив зсув кривої розподілу вправо до субпопуляції великих лімфоїдних клітин (8–10 мкм) порівняно з кривою розподілу в контролі (див. рис. 1).

При ЦД спостерігається зменшення вмісту малих лімфоцитів розміром до 7 мкм, що може вказувати на зниження кількості Т-хелперів [11] і, як наслідок, маємо порушення клітинного імунітету та цитотоксичної функції Т-ефекторів і натуральних кілерів [5, 10, 16]. Такі зміни, можливо, зумовлені частковим порушенням лімфоцитопоезу в результаті зниження

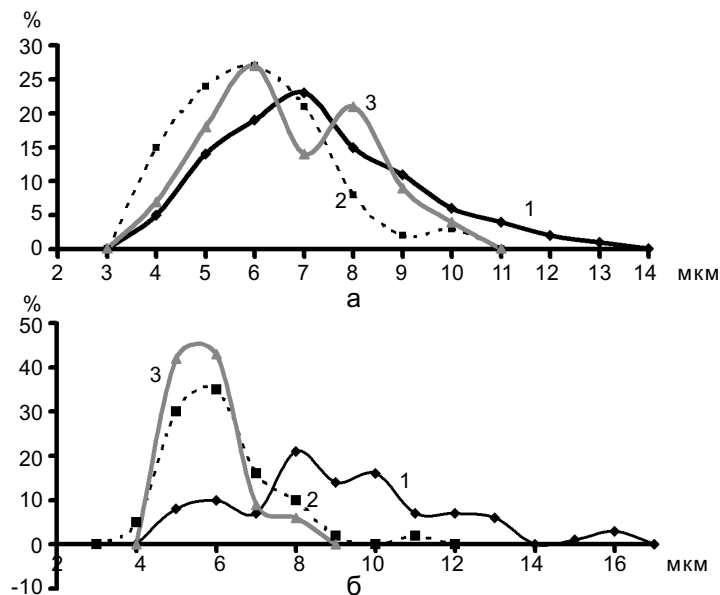


Рис. 1. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на лейкоцитограму контрольних щурів (а) і тварин з експериментальним стрептозотоциновим діабетом (б). 1 – без введення препаратів, 2 – введення L-аргініну, 3 – введення аміногуанідину

концентрації інсуліну. Аналіз патофізіологічного та біохімічного профілю системи крові ссавців та людини при ЦД показав, що залежність проліферативної та функціональної активності її клітин від інсуліну є функцією еволюційного часу цієї системи, а сам гормон має властивості спільного гемопоетину [14, 17].

На рис. 1 наведено три лейкоцитограми, які відображають розподіл лімфоцитів без введення досліджуваних речовин і під впливом L-аргініну та АГ. Після введення аргініну лейкоцитограма як у контролі, так і при діабеті показали збільшення числа малих лімфоцитів від 3 до 12 мкм з максимальним числом клітин розміром 6 мкм. Лімфоцити контрольних тварин під впливом АГ утворюють на лейкоцитограмі два піки: один пік з максимальним числом клітин розміром 6 мкм, а інший – 8 мкм. За умов діабету введення АГ, як і у разі з L-аргініном, викликало зсув кривої вліво до

популяції малих лімфоцитів діаметром 6 мкм. Їхня кількість зросла до 45 %. Таким чином, введення досліджуваних речовин призводило до появи у периферичній крові контрольних щурів і тварин з ЦД лімфоцитів малого розміру, які відповідають за клітинні реакції імунного захисту організму.

На другому етапі для дослідження впливу системи L-аргінін–NO на зміни у діаметрі та площі лімфоцитів крові клітини інкубували в розчинах хлориду натрію різної осмолярності. Порівняння отриманих морфологічних показників лімфоцитів крові контрольних тварин при інкубації в 0,45%-му розчині хлориду натрію від 40 с до 1 год показало, що об'єм клітин збільшується впродовж перших 40–60 с (табл. 1). З 5-ї хвилини розмір клітин зменшується. Стабільного стану лімфоцити сягали приблизно до кінця 60-ї хвилини. В 0,2%-му розчині хлориду натрію на 40-й секунді інкубації

Таблиця 1. Зміна розмірів лімфоцитів, інкубованих у розчинах хлориду натрію різної осмолярності (M ± m, n = 6)

Група тварин; показник	Концентрація розчину, час інкубації клітин					
	0,9 %	0,45 %	0,45 %	0,45 %	0,45 %	0,2 %
	0 с	40 с	60 с	5 хв	1 год	40 с
Контроль						
Діаметр, мкм	7,2 ± 0,3	8,3 ± 0,5*	8,0 ± 0,3*	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,4	12,3 ± 0,6*
Площа поверхні, мкм ²	163	215	200	197	185	471
Введення L-аргініну						
Діаметр, мкм	6,0 ± 0,3*	6,3 ± 0,4	6,3 ± 0,3	6,1 ± 0,3	5,8 ± 0,4	7,8 ± 0,5
Площа поверхні, мкм ²	113	125	126	115	108	191
Введення аміногуанідину						
Діаметр, мкм	6,7 ± 0,4	7,7 ± 0,3	6,9 ± 0,4	7,5 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,6 ± 0,6
Площа поверхні, мкм ²	140	186	150	175	173	181
Цукровий діабет						
Діаметр, мкм	9,1 ± 0,5*	10,1 ± 0,4**	9,8 ± 0,3**	9,9 ± 0,4**	8,0 ± 0,3**	12,7 ± 0,5**
Площа поверхні, мкм ²	257	322	193	311	201	508
Введення L-аргініну						
Діаметр, мкм	6,1 ± 0,4**	6,7 ± 0,3	6,9 ± 0,4	7,1 ± 0,4	6,3 ± 0,3	7,7 ± 0,4
Площа поверхні, мкм ²	117	143	149	160	125	187
Введення аміногуанідину						
Діаметр, мкм	5,8 ± 0,3**	7,4 ± 0,4	6,8 ± 0,4	7,0 ± 0,3	7,4 ± 0,5	7,8 ± 0,5
Площа поверхні, мкм ²	105	171	144	152	170	192

Примітка. Тут і в табл. 2: * P < 0,05 – порівняно з контрольними клітинами, інкубованими в 0,9%-му розчині хлориду натрію; ** P < 0,05 – порівняно з лімфоцитами тварин, хворих на цукровий діабет (інкубація в 0,9%-му розчині хлориду натрію).

набухання лімфоцитів було найбільш вираженим.

При ЦД у морфометрії лімфоцитів зареєстрували такі зміни: на 40-й секунді інкубації в 0,45%-му розчині хлориду натрію об'єм клітин у середньому збільшувався на 1 мкм і залишався в цьому діапазоні (10,1 мкм \pm 0,4 мкм) протягом наступних 5 хв експозиції, а через 1 год – зменшувався до 8,0 мкм \pm 0,3 мкм. При діабеті на 40-й секунді інкубації в 0,2%-му розчині хлориду натрію цей показник зростав на 40 % порівняно з розміром лімфоцитів у фізіологічному розчині (див. табл. 1).

Морфометричне дослідження лімфоцитів контрольних тварин при введенні L-аргініну показало, що під час інкубації лімфоцитів у 0,45%-му розчині хлориду натрію об'єм клітин достовірно збільшувався; в 0,2%-му розчині хлориду натрію діаметр досліджуваних лейкоцитів зростав на 30 % (див. табл. 1). Під впливом АГ у розмірах лімфоцитів контрольних щурів спостерігаються такі зміни: в 0,45%-му розчині хлориду натрію впродовж перших 40 с об'єм клітин збільшувався; з 5-ї хвилини клітини набували стабільного розміру, який не змінювався до кінця 60-ї хвилини інкубації; в 0,2%-му розчині хлориду натрію діаметр і площа лімфоцитів зростали лише на 15 %.

Встановлено, що в щурів з ЦД на тлі впливу L-аргініну впродовж перших 5 хв інкубації в 0,45%-му розчині хлориду натрію розмір лімфоцитів збільшувався і сягав стабільного (вихідного) значення через 1 год експозиції. Збільшувався також діаметр лімфоцитів у 0,2%-му розчині хлориду натрію на 26 % порівняно з клітинами у фізіологічному розчині (див. табл. 1). При дії АГ розмір лімфоцитів зростав упродовж перших 5 хв інкубації в 0,45%-му розчині хлориду натрію і сягав максимальних значень при експозиції в 0,2%-му розчині (див. табл. 1). Слід відмітити, що до кінця 60-ї хвилини інкубації в 0,45%-му розчині хлориду натрію лімфоцити так і не досягали

вихідного розміру.

На третьому етапі досліджень порівнювали розмір лімфоцитів та діаметр їх ядер під час інкубації в розчинах різної осмолярності, а також на тлі введення L-аргініну або АГ.

Порівняльне дослідження розмірів ядра (табл. 2) і клітини (див. табл. 1) показало, що резерв цитоплазматичної мембрани лімфоцитів контрольних тварин значно перевищив резерв ядерної мембрани (при інкубації в 0,2%-му розчині хлориду натрію діаметр лімфоцитів збільшувався на 72 % порівняно з 53 % для ядерної мембрани цих клітин). Аналіз розмірів ядер лімфоцитів у контрольних тварин на тлі введення L-аргініну порівняно зі значеннями у щурів без дії речовин дав змогу виявити зменшення розміру ядра на 12 % (0,9%-й розчин хлориду натрію). При введенні L-аргініну резерв цитоплазматичної мембрани лімфоцитів не перевищив резерв ядерної мембрани (в 0,2%-му розчині хлориду натрію діаметр лімфоцита збільшувався на 30 %, а ядерної мембрани – на 28 %; див. табл. 2).

Під впливом АГ у контрольних щурів не змінювався розмір ядра лімфоцита (інкубація в 0,2%-му розчині хлориду натрію), а резерв цитоплазматичної мембрани цих клітин не перевищив резерв ядерної мембрани і зростав лише на 15 % (див. табл. 2).

За умов стрептозотоцинового діабету розмір лімфоцитів, інкубованих у 0,2%-му розчині хлориду натрію, збільшувався на 40 % (див. табл. 1), а розмір ядра – на 27 %, що вказує на перевищення резерву цитоплазматичної мембрани клітин над резервом ядерної мембрани (див. табл. 2). Проте порівняно з контрольними тваринами при діабеті порушується резерв як для цитоплазматичної, так і для ядерної мембран лімфоцитів.

На тлі введення L-аргініну та АГ у тварин з ЦД розмір ядра зменшувався на 29 % порівняно зі значеннями у щурів без введення (див. табл. 2). При діабеті L-аргінін викликав зміни у мембранному

фонді лімфоцитів: інкубація клітин у 0,2%-му розчині хлориду натрію призводила до збільшення діаметра клітин на 26 %, а ядра – лише на 12 %. Таким чином, при ЦД на тлі введення L-аргініну, незважаючи на зменшення розміру лімфоцитів і їхніх ядер, резерв цитоплазматичної мембрани цих клітин перевищив резерв ядерної мембрани удвічі, що опосередковано може свідчити про покращення міграційних властивостей лімфоцитів крові. Відомо, що резервні білки плазматичної мембрани лейкоцитів містяться в секреторних пухирцях. Під час стимуляції клітин вони переміщуються до цитолемі, транспортуючи різні білки та адгезивні молекули до поверхні лімфоцитів, і цим забезпечують їхню міграцію із кровоносних судин у тканини.

Отже, морфометрія лімфоцитів щурів з ЦД дала змогу встановити особливості кінетики об'єму цих клітин, яка проявлялася в зміні ядерно-цитоплазматичного відношення в бік помітного збільшення частки цитоплазми.

Порівнюючи розміри клітин в ізотоніч-

ному розчині та після інкубації в гіпотонічних розчинах, оцінювали регуляторну здатність і резервні можливості лімфоцитів.

Незначне збільшення розміру клітин (від 7,2 мкм у контролі до 7,5 мкм на тлі експозиції в 0,45%-му розчині хлориду натрію, 1 год) свідчить про нормальну регуляторну здатність лімфоцитів контрольних тварин. Провівши порівняльний аналіз напрямку змін коефіцієнта регуляторних можливостей мембран лімфоцитів контрольних щурів, встановили, що на тлі впливу L-аргініну досліджувана властивість клітин погіршувалася, а під впливом АГ – покращувалася (рис. 2).

Порівнюючи отримані результати за умов ЦД з контрольними значеннями, можна стверджувати, що при діабеті порушуються регуляторні можливості мембран лімфоцитів, що є наслідком розрегульованості всіх типів обміну речовин і негативного впливу гіперосмолярності внутрішнього середовища, зумовленого високою концентрацією глюкози у перифе-

Таблиця 2. Зміна розмірів ядер лімфоцитів, інкубованих у розчинах хлориду натрію різної осмолярності (M ± m, n = 6)

Група тварин; показник	Концентрація розчину, час інкубації клітин		
	0,9 %	0,45 %	0,2 %
	0 с	40 с	40 с
Контроль			
Діаметр, мкм	6,6 ± 0,3	7,6 ± 0,4*	10,3 ± 0,6*
Площа поверхні, мкм ²	135	179	333
Введення L-аргініну			
Діаметр, мкм	5,8 ± 0,4	6,1 ± 0,3	7,4 ± 0,4*
Площа поверхні, мкм ²	106	117	172
Введення аміногуанідину			
Діаметр, мкм	6,4 ± 0,3	7,4 ± 0,4*	7,4 ± 0,3*
Площа поверхні, мкм ²	129	173	171
Цукровий діабет			
Діаметр, мкм	8,1 ± 0,6*	8,9 ± 0,5	10,3 ± 0,6**
Площа поверхні, мкм ²	206	246	330
Введення L-аргініну			
Діаметр, мкм	5,9 ± 0,3**	6,5 ± 0,4	6,6 ± 0,4
Площа поверхні, мкм ²	111	134	138
Введення аміногуанідину			
Діаметр, мкм	5,6 ± 0,3**	7,2 ± 0,4**	7,6 ± 0,5**
Площа поверхні, мкм ²	100	161	183

ричній крові [6, 18]. За умов стрептозотоцинового діабету введення L-аргініну та АГ покращило мембранну регуляцію клітин у порівнянні з вихідними значеннями при діабеті.

У контрольних щурів на тлі введення L-аргініну та АГ зниження резервного індексу лімфоцитів (див. рис. 2) свідчить про дефіцит мембранного фонду.

При ЦД у лімфоцитах виявили достовірне зменшення мембранного резерву порівняно з контролем. Введення L-аргініну викликало незначне зниження індексу резервних можливостей цитоплазматичних мембран лімфоцитів, проте під впливом АГ досліджувана властивість не зазнавала вірогідних змін порівняно з лімфоцитами при діабеті. Отже, у тварин з експериментальним ЦД введення досліджуваних речовин викликало позитивний коригувальний ефект на регуляторну здатність мембран лімфоцитів крові та незначні зміни у резервному фонді цих клітин.

ВИСНОВКИ

1. При морфометричному дослідженні лейкоцитів крові щурів з експериментальним ЦД виявлено зменшення числа малих лімфоцитів розміром до 7 мкм та збільшення субпопуляції великих лімфоцитів (8–10 мкм), тоді як на тлі дії АГ і L-аргініну кількість малих лімфоцитів діаметром 6 мкм збільшилася до 45 %, сягаючи контрольних значень.

2. При стрептозотоциновому діабеті порушується резерв ядерної та цитоплазматичної мембран лімфоцитів, який для цих клітин у контролі становив 70 %, а при діабеті – 40 %, що може бути однією з причин, які провокують зміни властивостей і функціонального стану лейкоцитів периферичної крові за досліджуваної патології.

3. За умов експериментального ЦД при введенні L-аргініну, незважаючи на зменшення розмірів лімфоцитів та їхніх ядер, резерв цитоплазматичної мембрани цих

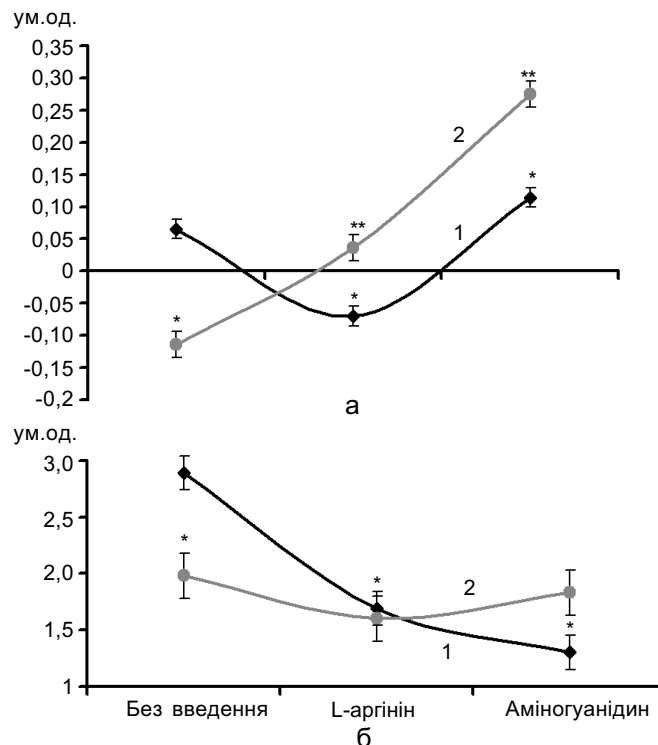


Рис 2. Зміни коефіцієнта регуляторних можливостей (а) та індексу резервних можливостей (б) мембран лімфоцитів у контролі (1) та за умов експериментального діабету (2), а також на тлі введення L-аргініну або аміногуанідину. * $P < 0,05$ – порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ – порівняно з експериментальним діабетом

клітин перевищив резерв ядерної мембрани вдвічі, а також поліпшилася регуляторна здатність мембран лімфоцитів порівняно з вихідними значеннями при діабеті.

4. У тварин з експериментальним ЦД екзогенний L-аргінін і АГ проявили позитивний коригувальний ефект щодо морфологічних і фізіологічних характеристик мембран лімфоцитів, що може свідчити про покращення адгезивних і рухових властивостей лейкоцитів у мікросудинному руслі за цих умов.

И.В. Бродяк, А.Р. Гнатуш, Н.А. Сибирная

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ НА ФОНЕ ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА И АМИНОГУАНИДИНА

Исследовано диаметр и площадь лимфоцитов и их ядер, резервные и регуляторные возможности мембран этих клеток в норме и при экспериментальном сахарном диабете (СД), а также на фоне введения экзогенного L-аргинина или аминоксидина. Обнаружено достоверное отличие в размере и мембранном фонде лимфоцитов животных с СД, который для этих клеток в контроле составлял 70 %, а при диабете – 40 %, что может быть одной из причин, которые провоцируют изменения в свойствах и функциональном состоянии лимфоцитов. Введение экзогенного L-аргинина и аминоксидина в условиях СД имело положительный корригирующий эффект – объём лимфоцитов уменьшался и улучшались регуляторные возможности мембран этих клеток.

Ключевые слова: лимфоциты, экспериментальный сахарный диабет, L-аргинин, аминоксидин.

I.V. Brodyak, A.R. Hnatysh, N.O. Sybirna

EFFECT OF L-ARGININE AND AMINOGLUCANINE SYSTEM ON MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PLASMA MEMBRANES OF BLOOD LYMPHOCYTES DURING EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Diameter, the surface area of lymphocytes and their nuclei as well as the reserve potential and regulatory properties of lymphocytes membranes in control rats, in rats with experimental diabetes mellitus before and after administration of L-arginine and aminoguanidine were investigated. Significant dif-

ference in size and the membrane fund of lymphocytes in animals with experimental diabetes mellitus was detected. In control lymphocytes, the membrane fund was 70% while during diabetes mellitus it was 40%. Such a difference might be one of the reasons of changes in properties and functional state of lymphocytes in diabetes. Administration of L-arginine and aminoguanidine to diabetic animals caused positive effect: the volume of lymphocytes diminished and the regulatory membrane properties of these cells became better.

Key words: lymphocytes, experimental diabetes mellitus, L-arginine, aminoguanidine.

Ivan Franko National University of L'viv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив L-аргініну на активність NO-синтази та процес окисної модифікації білків при стрептозотоциновому діабеті у щурів // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2005. – № 4. – С. 43–49.
2. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив аміногуанідину на процес окисної модифікації білків за умов експериментального цукрового діабету у щурів // Укр. біохім. журн. – 2006. – 78, № 5. – С. 114–119.
3. Гомоляко І.В., Тумасова К.П. Ультраструктурна характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на хронічний холецистит // Вісн. морфології. – 1999. – № 5 (1). – С. 6–8.
4. Карімов І.З. Окисна модифікація білків і перекисне окислення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології // Лаб. діагностика. – 2005. – № 1. – С. 7–13.
5. Мазуров Д.В. Изучение моноцитов периферической крови человека // Клеточ. иммунология. – 2001. – № 3. – С. 21–23.
6. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – 65, № 4. – С. 485–503.
7. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Терап. архив. – 2005. – № 1. – С. 82–87.
8. Рябов Г.А., Азизов Ю.М., Пасечник И.Н. и др. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у больных в критических состояниях // Вестн. интенсив. терапии. – 2002. – № 4. – С. 4–7.
9. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюрба А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2005. – 51, № 2. – С. 3–7.
10. Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – № 11. – С. 44–46.
11. Хоменко Р.М., Грузов М.А., Шляховенко В.С.

- Содержание и ультраструктура CD4⁺-лимфоцитов крови здоровых людей и больных сахарным диабетом 1-го типа // Физиол. журн. – 1989. – **35**, № 5. – С. 31–37.
12. Bonnefont-Rousselot D., Bastard J.P., Jaudon M.C., Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance // Diabetes Nutr. Metab. – 2000. – **26**, № 3. – P. 163–176.
 13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // Nature. – 2001. – **414**, № 6865. – P. 813–820.
 14. Cerchiaro G.A., Scavone C., Teixeira S. et al. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin // Biochemical. Pharmacol. – 2001. – **62**, № 3. – P. 357–362.
 15. Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications // Diabetes Nutr. Metab. – 1999. – **12**, № 1. – P. 42–46.
 16. Dailey M. O. Expression of T lymphocyte adhesion molecules: regulation during antigen-induced T cell activation and differentiation // Crit. Rev. Immunol. – 1998. – **18**. – P. 153–184.
 17. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin // Diabetologia. – 2000. – **43**, № 12. – P. 1528–1533.
 18. Iori E., Calo L., Valbusa D. et al. Diabetic ketosis activates lymphomonocyte-inducible nitric oxide synthase // Diabet Med. – 2002. – **19**, № 9. – P. 777–783.

Львів. нац.ун-т ім. Івана Франка
E-mail: brodyak_iryna@yahoo.com

Матеріал надійшов до
редакції 08.07.2008

О.М. Чуян, О.О. Бірюкова, М.Ю. Раваєва

Вплив керованого дихання з індивідуально підбраною частотою на показники варіабельності ритму серця

Вивчені зміни показників варіабельності серцевого ритму і фрактальної нейродинаміки в умовах керованого дихання на частоті коливань спектра серцевого ритму. Показано, що кероване дихання, частота якого відповідає частоті локалізації максимального піку потужності серцевого ритму в низькочастотному діапазоні є механізмом управління серцевим ритмом і зміною функціонального стану організму людини в цілому.

Ключові слова: кероване дихання, варіабельність серцевого ритму, фрактальна нейродинаміка, система вегетативного керування ритмом серця.

ВСТУП

Особливий інтерес останніми роками викликає дослідження синхронізації біологічних ритмів у живих організмах, життєдіяльність яких зумовлена взаємодією великого числа складних ритмічних процесів [6, 7]. Яскравим прикладом такої взаємодії між різними фізіологічними ритмами є функціонування серцево-судинної системи людини. Найбільш важливими коливальними процесами, що визначають її динаміку, є серцевий ритм і дихання. Порівняно недавно було виявлено, що основні ритми серцево-судинної системи можуть бути синхронізовані між собою [4; 11], що відповідає сучасним уявленням про функціонування складних систем [7]. Причому було встановлено, що систему, яка задає основний серцевий ритм, або систему вегетативного керування серцем (СВКС), можна розглядати як генератор, роль якого відіграє дихання [11]. Тому застосування керованого дихання можна розцінювати як введення періодичної компоненти в зовнішній шумовий сигнал, що надходить в СВКС. Оскільки доведено

існування синхронізації між диханням і ритмом регуляції судинного тону на частоті 0,1 Гц [7], тому вибір частоти дихання часто проводять згідно з Де Боер-моделлю, коли наявність власних коливань системи з указаною частотою дає змогу використовувати резонансний відгук у низькочастотному (LF) діапазоні коливань серцевого ритму з періодом 10 с [5]. Ефект резонансу в цьому разі зумовлений фізичним збігом частот двох гармонійних коливальних процесів: зовнішнього, яким виступає дихання, та власних коливань системи. Проте широко відома індивідуальна варіативність хвильового піку в низькочастотному діапазоні спектра (від 0,05 до 0,15 Гц), тому недоліком існуючих підходів є те, що частота дихання 1 вдих за с (0,1 Гц), не завжди матиме резонансний відгук у СВКС.

Отже, перспективним є використання методу керованого дихання з індивідуально підбраною частотою. Проте у використаних методиках, як правило, відсутні критерії оцінки адекватності й ефективності використання параметрів керованого дихання з боку функціонального стану всієї

© О.М. Чуян, О.О. Бірюкова, М.Ю. Раваєва

серцево-судинної системи, взаємодії її відділів, які визначається якістю й узгодженістю функціонування механізмів їх вегетативної регуляції. Тому можливість зміни показників СВКС і функціонального стану організму в цілому під впливом керованого дихання з індивідуально підібраною частотою залишається невивченою.

Метою нашого дослідження було виявлення змін показників варіабельності серцевого ритму (ВСР) в умовах керованого дихання на частоті коливань спектра серцевого ритму.

МЕТОДИКА

У дослідженні брали участь 21 умовно здорова студентка-волонтер віком від 18 до 21 року зі значеннями стресс-індексу (Si або індекс напруженості ІН) [1] від 50 до 200 ум.од. Оскільки особи з таким Si переважають серед обстежених нами студентів [3], можна припустити, що у них розвивається найбільш типова реакція на кероване дихання.

Дослідження ВСР проводили за допомогою програмно-апаратного комплексу (ПАК) «Омега-М» (виробництво науководослідної лабораторії «Динаміка», м. Санкт-Петербург) щодня протягом 10 діб і через 7 діб після закінчення курсу керованого дихання (17 діб експерименту) для реєстрації ефекту післядії в один і той самий час доби, що дало змогу виключити вплив добових коливань ВСР на результати обстеження [9].

ПАК «Омега-М» призначений для комплексного дослідження функціонального стану організму людини. Основу методу складає нова інформаційна технологія аналізу ВСР – «фрактальна нейродинаміка» (ФНД). Для апаратно-програмної реалізації методу з електрокардіосигналу виділяють 5 ритмів. У кожному з них визначаються хвили першого порядку, що є огинаючими цих ритмів. Подальша нейродинамічна обробка – це перетворення сиг-

налів у кодову комбінацію за двійковою основою, що складається з послідовності імпульсів, всі параметри яких однакові (рис. 1).

Методично такий алгоритм дає можливість отримати в реальному масштабі часу одномоментну інформацію про стан організму людини з усіх основних рівнів регуляції на прикладі аналізу ритмічної активності серця [2].

Реєстрацію проводили в положенні сидячи при спокійному диханні протягом 5 хв, тобто часу, необхідного для набору 300 кардіокомплексів. Для цього були використані основні методи аналізу ВСР (у системі оцінок, що рекомендуються стандартами Європейського кардіологічного і Північноамериканського товариств стимуляції та електрофізіології [8]), а також метод фрактальної нейродинаміки, що дає змогу отримати інтегральні характеристики функціонального стану обстежуваних (табл. 1).

У перший день експерименту запис показників ВСР і ФНД проводили на тлі спонтанного дихання – контрольний запис. При цьому контролювали відсутність форсованих вдихів і затримок дихання під час реєстрації ЕКГ, тим самим виключаючи довільні впливи дихання на серцево-судинну систему, тобто дослідження проводили у відносно стандартних умовах. У наступні дні експерименту запис показників ВСР і ФНД проводили на тлі керованого дихання, частота якого відповідала частоті локалізації максимального піку потужності серцевого ритму в LF-діапазоні.

Під час сеансу керованого дихання кожна обстежувана дихала під індивідуальний ритм, що задавався «дихальною ку-

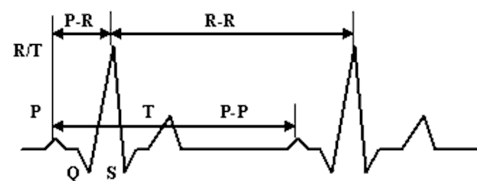


Рис. 1. Нейродинамічний метод обробки ритмограми

Таблиця 1. Основні методи аналізу варіабельності ритму серця

№ пп	Короткі позначення	Показники	Фізіологічна інтерпретація
Статистичні методи			
1	SDNN, СКВ	Standard deviation of the NN interval – середньо квадратичне відхилення повного масиву нормальних (NN) кардіоінтервалів (мс)	Сумарний ефект вегетативної регуляції кровообігу [8]
2	RMSSD	The square root of the mean squared differences of successive NN interval – корінь з суми різниць послідовного ряду кардіоінтервалів (мс)	Активність парасимпатичної ланки вегетативної регуляції [8]
3	PNN50	Відсоток (частка) послідовних інтервалів NN, різниця між якими перевищує 50 мс (%)	Показник міри переваги парасимпатичної ланки регуляції над симпатичною [8]
Геометричні методи			
4	Mo	Мода – значення R-R, що найбільш часто зустрічається (мс)	Відповідає найбільш вірогідному для цього періоду часу рівню функціонування систем регуляції [1, 8]
5	AMo	Амплітуда моди – кількість R-R, відповідних значенню моди (n)	Умовний показник активності симпатичної ланки регуляції [1, 8]
6	ΔX	Варіаційний розмах – різниця між найменшим і найбільшим значеннями R-R (мс)	Умовний показник активності парасимпатичної ланки регуляції [1, 8]
Методи варіаційної пульсометрії			
7	Si, IH	Індекс напруги регуляторних систем	Міра переважання симпатичних впливів над парасимпатичними [1]
Методи спектрального аналізу			
8	TP, TOTAL	Total power – сумарна потужність спектра ВСР (мс ²)	Сумарний абсолютний рівень активності регуляторних систем [8]
9	HF	High frequency – потужність спектра високочастотного компонента ВСР (мс ²)	Відносний рівень активності парасимпатичної ланки регуляції [8]
10	LF	Low frequency – потужність спектра низькочастотного компонента ВСР (мс ²)	Відносний рівень активності вазомоторного центру [8]
11	VLF	Very low frequency – потужність спектра дуже низькочастотного компонента ВСР (мс ²)	Міра центральних впливів на сердечний ритм [8]
Інтегральні показники функціонального стану			
12	A	Показник адаптації	Міра активності автономного контура регуляції ритму серця [2]
13	B	Показник вегетативної регуляції	Міра активності вегетативного контура регуляції ритму серця [2]
14	C	Показник центральної регуляції	Міра активності гіпоталамо-гіпофізарної системи [2]
15	D	Показник психоемоційного стану	Міра активності центральної нервової системи [2]
16	Health	Інтегральний показник функціонального стану обстежуваних	Характеризує загальний функціональний стан [2]

лею», параметри якої розраховувалися за ритмограмою, записаною безпосередньо перед сеансом дихання на ПАК «Омега». Співвідношення тимчасових інтервалів вдишу та видиху було постійне і становило: 38 і 62 % відповідно, що збігається з правилом «золотого перетину» [2]. Періоди дихання спочатку експоненціально подовжувалися і в завершальній фазі експоненціально скорочувалися. Тривалість сеансу становила близько 5 хв. Повторний запис ритмограми проводили не раніше, ніж через 5 хв після закінчення сеансу керованого дихання.

Критерієм ефективності використовуваного методу була зміна показників ВСР і ФНД щодо контрольного запису, отриманого в 1-й (фоновий) день експерименту при спонтанному диханні. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакету програм Омега-М і Statistica 6.0. Достовірність відмінностей отриманих результатів визначали за допомогою критерію Вілкоксона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Статистичними методами аналізу серцевого ритму у обстежуваних протягом 10-добового курсу керованого дихання з індивідуально підбраною частотою виявлено достовірне збільшення значень показників PNN50, RMSSD і СКВ, починаючи з 2-ї, 3-ї і 5-ї доби спостереження відповідно (рис. 2).

На 10-ту добу дослідження показники RMSSD, СКВ і PNN50 збільшилися щодо їх фонових значень на 30 ($P<0,05$), 28 і 71 % ($P<0,01$) відповідно. Це свідчить про те, що під впливом курсової дії керованого дихання посилюється автономний контур, зокрема парасимпатичної ланки регуляції серцевого ритму, а, отже, оптимізація регуляції фізіологічних функцій.

Крім того, слід зазначити, що через 7 діб після припинення сеансів керованого дихання значення показників статистичного аналізу ВСР залишалися достовірно вищими від початкових (див. рис. 2), що дає змогу говорити про виражений ефект післядії цього курсу.

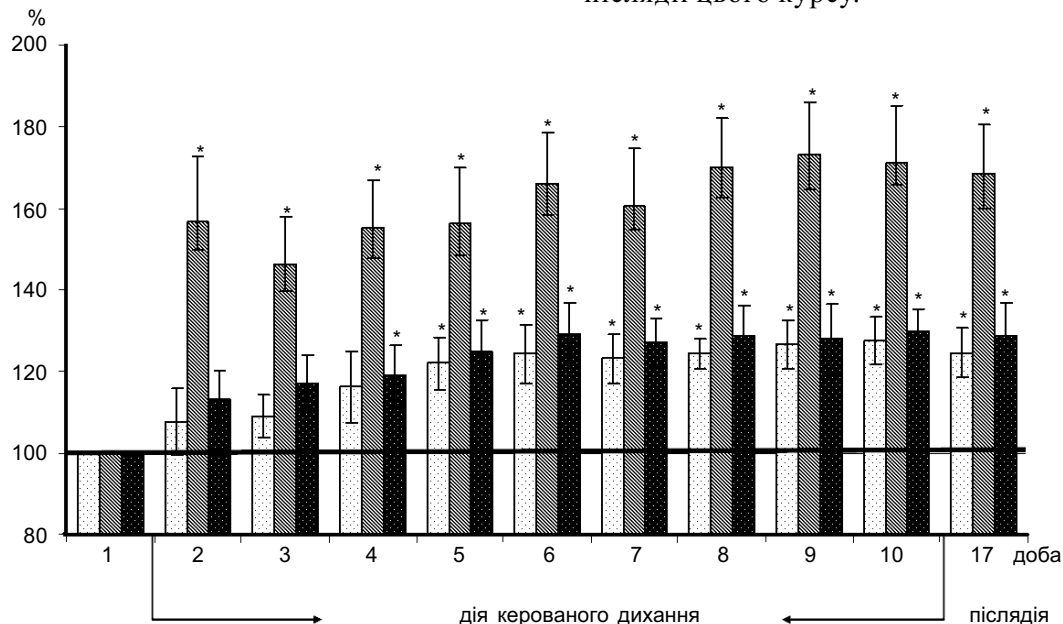


Рис. 2. Зміна показників статистичного аналізу ритму серця під впливом керованого дихання з індивідуально підбраною частотою у обстежуваних у різні терміни дослідження (у відсотках щодо цих показників при спонтанному диханні значень, прийнятих за 100 %): 1 – СКВ, 2 – рNN50, 3 – RMSDD. * $P<0,05$ за критерієм Вілкоксона щодо початкових значень вивчених показників

Отримані результати підтверджуються і геометричним аналізом серцевого ритму, які свідчать про те, що вже після 5-кратної дії керованого дихання достовірно змінилися досліджувані показники (див. рис. 2), а на 10-ту добу спостереження значення показника ΔX були на 17 % ($P < 0,01$) вищими, а АМо на 19 % ($P < 0,05$) нижчими від контрольних.

Через 7 діб після курсу керованого дихання, значення вивчених показників достовірно відрізнялися від початкових: АМо – 83 %, ΔX – 114 % ($P < 0,05$; рис. 3).

Розширення основи і уплощення купола гістограми R-R характеризується зменшенням значень показника АМо і збільшенням ΔX і Мо і може свідчити про посилення активності автономного контура регуляції серцево-судинної системи та активізацію парасимпатичного і зменшення впливу симпатичного відділу ВНС на серцевий ритм [8].

Похідними з геометричного аналізу є кількісні показники варіаційної пульсометрії, найбільш поширеним і інформативним

методом якої вважають аналіз Si регуляторних систем організму [1].

Під впливом керованого дихання на 5-ту добу експерименту різко знизився (на 31 %) Si [6] ($P < 0,05$) щодо фонових значень цього показника (рис. 4).

Слід відзначити, що після наступних сеансів керованого дихання значення цього показника знаходилися в межах 75–80 ум.од., тобто на рівні «плато» (див. рис. 4). На цьому самому рівні Si залишався і через 7 діб після закінчення курсу.

Спектральний аналіз ВСР показав достовірні зміни досліджуваних показників, починаючи з 2–3-ї доби експерименту (рис. 5,а), проте максимальним був зареєстрований на 10-ту добу дії керованого дихання, коли потужності спектра в діапазонах LF і HF серцевого ритму зросли на 112 і 69 % ($P < 0,01$) відповідно щодо фонових значень. Слід зазначити, що більшою мірою підвищилася потужність LF-компонента спектра. Зміни VLF-компонента спектра були недостовірні.

Отже, отримані нами результати щодо

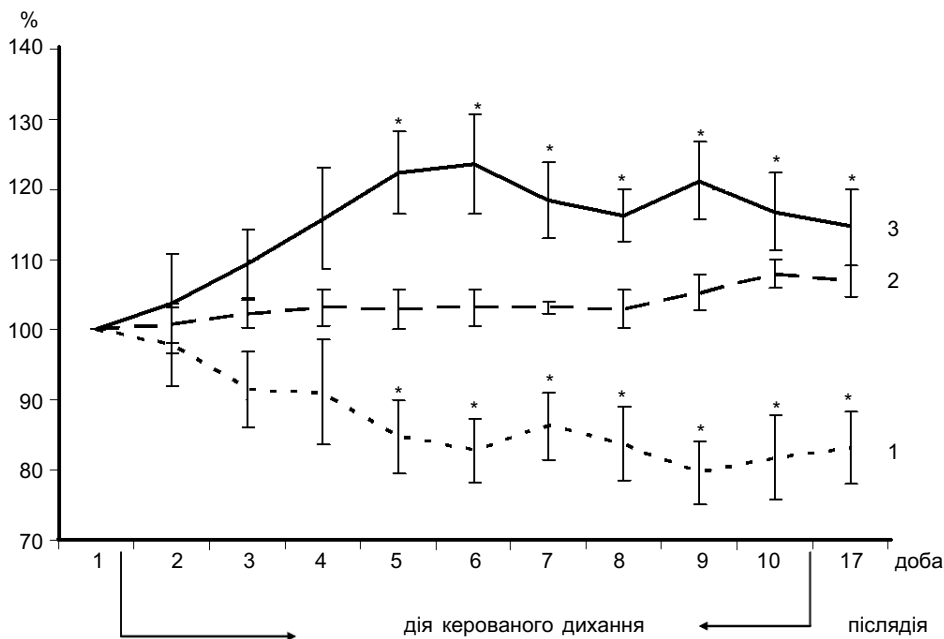


Рис. 3. Зміна показників геометричного аналізу ритму серця під впливом керованого дихання з індивідуально підбраною частотою у різні терміни дослідження (у відсотках щодо початкових значень, прийнятих за 100 %): 1 – АМо, 2- Мо, 3 – ΔX . * $P < 0,05$

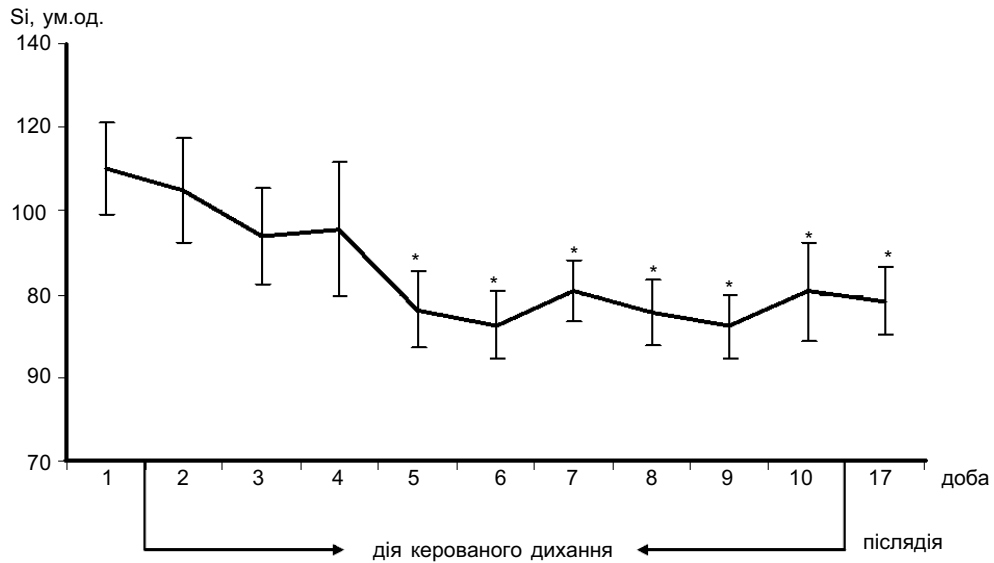


Рис. 4. Зміна Si під впливом керованого дихання з індивідуально підбраною частотою у різні терміни дослідження. *P<0,05

збільшення потужності як LF, так і HF-компонентів спектра серцевого ритму під дією керованого дихання на частоті низько-частотної складової спектра серцевого ритму можуть свідчити про посилення вагусних дій і барорефлекторної регуляції СВКС.

Разом зі зміною потужності окремих компонентів спектра ВСР під впливом керованого дихання збільшувалася загальна його потужність (див. рис. 5,б). Так, на 10-ту добу керованого дихання зареєст-

ровано максимальну потужність спектра (177 % щодо фонових значень цього показника; P<0,001).

Відомо, що TP відображає сумарну активність вегетативних дій на серцевий ритм. Вагусна активація зазвичай супроводжується збільшенням цього показника [8], а чим він більший, тим сильніше виражені адаптаційні можливості організму. Тому збільшення TP у обстежуваних під впливом керованого дихання з індивідуально підбраною частотою може бути

Таблиця 2. Динаміка інтегральних показників функціонального стану обстежуваних

Час	Показники				
	A	B	C	D	Health
1-ша доба	61,21 ± 2,83	66,94 ± 4,33	56,42 ± 3,58	57,94 ± 2,75	60,63 ± 3,10
3-тя доба	65,03 ± 3,37	74,38 ± 4,52	64,52 ± 2,62	63,47 ± 2,69	66,85 ± 2,86
	P<0,05		P<0,05		P<0,05
5-та доба	70,07 ± 3,83	79,64 ± 3,91	65,67 ± 4,16	66,24 ± 3,48	70,41 ± 3,63
	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
7-ма доба	70,08 ± 2,87	77,24 ± 2,21	66,30 ± 3,44	68,53 ± 2,91	70,54 ± 2,83
	P<0,01	P<0,01	P<0,05	P<0,01	P<0,01
10-та доба	71,87 ± 3,26	80,14 ± 4,60	69,07 ± 2,88	71,13 ± 3,20	73,39 ± 3,29
	P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01
17-та доба	74,05 ± 3,74	81,53 ± 3,74	71,48 ± 3,49	72,08 ± 3,66	73,60 ± 3,61
	P<0,01	P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,01

Примітка: P – достовірність відмінностей за критерієм Вілкоксона щодо початкових значень вивчених показників.

пов'язане з активацією вегетативного і зменшенням впливу центрального контура регуляції СВКС, що призводить до збільшення адапційного потенціалу організму.

Застосування курсової дії керованого дихання призвело до збільшення показників ВСР і ФНД у середньому на 17–23 % ($P < 0,01$) щодо фонових значень (табл. 2).

Слід зазначити, що збільшення значень

інтегральних показників функціонального стану під впливом 10-добового курсу керованого дихання було зареєстровано вже на 3–5-ту добу і продовжувало плавно збільшуватися впродовж усього курсу, залишаючись достовірно високим і через 7 днів після закінчення експерименту. Отримані результати ФНД свідчать про те, що кероване дихання з частотою коливань LF-

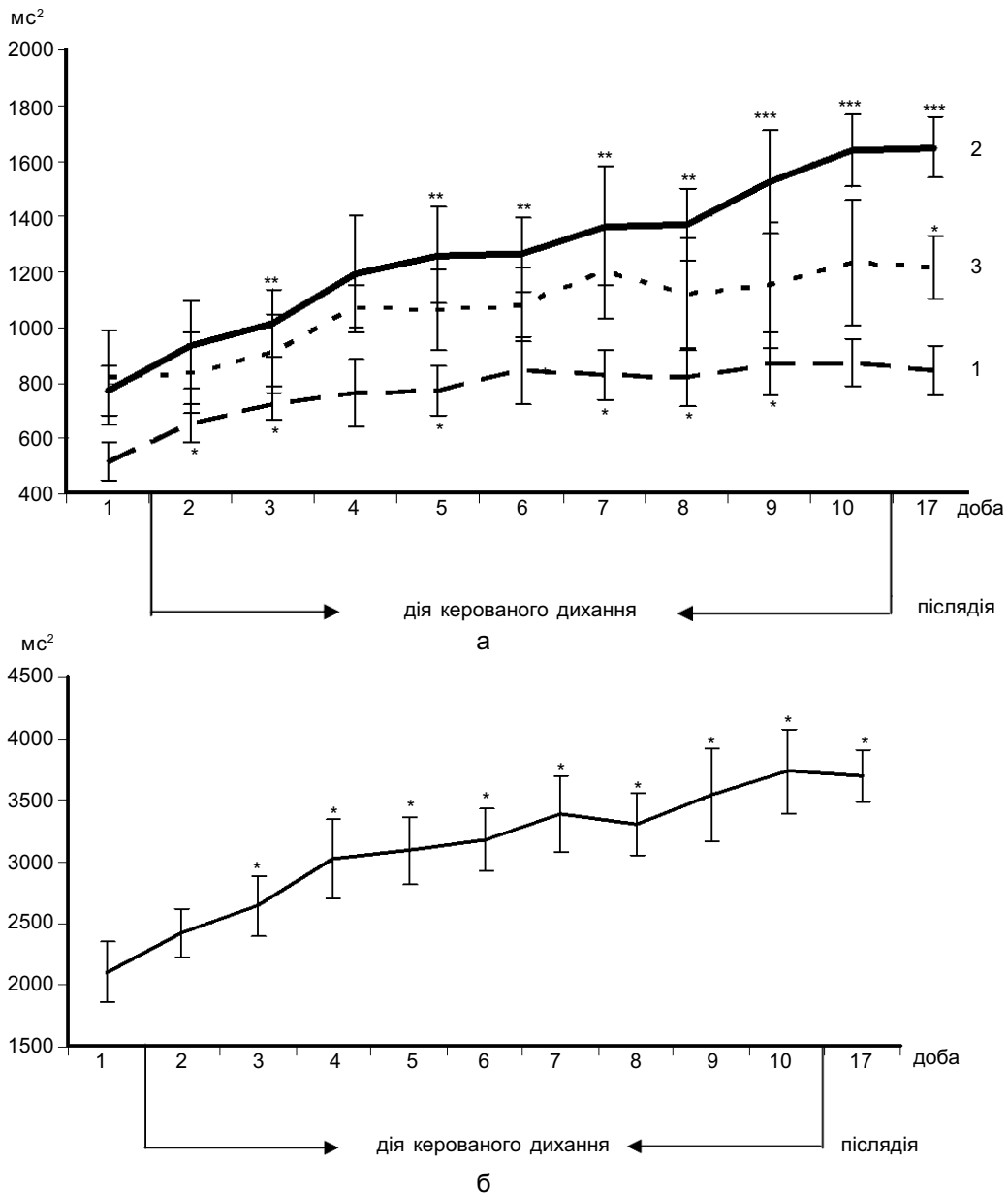


Рис. 5. Зміна потужності спектральних компонентів серцевого ритму (а) та загальної потужності спектра (TP; б) під впливом керованого дихання з індивідуально підбраною частотою у різні терміни експерименту. 1 – HF, 2 – LF, 3 – VLF. * $P < 0,05$

компоненти спектра серцевого ритму забезпечує регуляцію його головних функцій на різних рівнях: автономному, вегетативному, гіпоталамо-гіпофізарному, центральному, а, отже, сприяє збільшенню адаптивних можливостей усього організму.

Таким чином, згідно з приведеними результатами дослідження, 10-добова дія керованого дихання з індивідуально підбраною частотою викликає достовірну зміну вивчених показників ВСР і її похідних. Відомо [1], що ВСР є інтегрованим показником взаємодії трьох чинників, які регулюють серцевий ритм: рефлекторного симпатичного, рефлекторного парасимпатичного і гуморально-метаболічно-медіаторного середовища. Зміна серцевого ритму є універсальною оперативною реакцією цілісного організму у відповідь на будь-яку дію зовнішнього середовища і характеризує баланс між тонусом симпатичного і парасимпатичного відділів ВНС. Тому отримані нами результати щодо достовірної зміни показників ВСР і ФНД свідчать про нормалізацію за допомогою керованого дихання на частоті максимального піку в LF-діапазоні серцевого ритму симпатовагусного балансу організму обстежуваних.

Отже, динаміка показників ВСР і ФНД свідчить про те, що курсова дія керованого дихання з індивідуально підбраною частотою здатна вибірково змінювати основні механізми регуляції серцевого ритму, що мають адаптивне значення, внаслідок чого відновлюються міжсистемні зв'язки значною мірою через нормалізацію вегетативної регуляції, що призводить до активації внутрішніх резервів організму, механізмів неспецифічної резистентності, оптимізації нейроендокринної регуляції і розширення фізіологічних резервів, а також сприяє нормалізації функціонального стану організму в цілому.

Мабуть, це можна пояснити тим, що для роботи того або іншого коливального

контур управління, яким, зокрема, є СВКС важливе значення має система зворотного зв'язку [10]. При цьому характер еферентного сигналу залежатиме від характеристик аферентної інформації, що надходить у центр управління коливальним контуром. Тому зміна особливостей власних коливальних процесів організму можлива на основі ефекту резонансу в спектрі ВСР при дії керованого дихання на частотах коливань спектра серцевого ритму.

Таким чином, застосування керованого дихання з частотою, що підбирається індивідуально на основі попереднього запису ВСР, можна розцінювати як введення періодичної компоненти в зовнішній сигнал для гармонізації СВКС людини, а достовірні позитивні зміни показників ВСР і ФНД пов'язані з підлаштуванням ендогенних ритмів під зовнішній ритм керованого дихання, що задається.

ВИСНОВКИ

1. Кероване дихання, частота якого відповідає частоті локалізації максимального піку потужності серцевого ритму в LF-діапазоні є могутнім механізмом керування серцевим ритмом і зміною функціонального стану організму в цілому.

2. Курсове дихання з індивідуально підбраною частотою активує у обстежуваних парасимпатичну ланку ВНС та автономний контур регуляції і ослаблює централізацію управління серцевим ритмом.

3. Кероване дихання забезпечує регуляцію головних функцій серцевого ритму на різних рівнях: автономному, вегетативному, гіпоталамо-гіпофізарному, центральному, а, отже, сприяє збільшенню адаптивних можливостей усього організму.

4. Курсова дія керованого дихання має виражений ефект післядії, що реєструється впродовж подальших 7 діб після закінчення курсу.

Е.Н. Чуян, Е.А. Бирюкова, М.Ю. Раваева

**ВЛИЯНИЕ УПРАВЛЯЕМОГО ДЫХАНИЯ
С ИНДИВИДУАЛЬНО ПОДОБРАННОЙ
ЧАСТОТОЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ
ВАРИАбельНОСТИ РИТМА СЕРДЦА**

Изучены изменения показателей variability сердечного ритма и фрактальной нейродинамики в условиях управляемого дыхания на частоте колебаний спектра сердечного ритма. Показано, что управляемое дыхание, частота которого соответствует частоте локализации максимального пика мощности сердечного ритма в низкочастотном диапазоне является мощным механизмом управления сердечным ритмом и изменения функционального состояния организма в целом.

Ключевые слова: управляемое дыхание, variability сердечного ритма, фрактальная нейродинамика, система вегетативного управления ритмом сердца.

E.N. Chujan, E.A. Birukova, M.U. Ravaeva

**THE INFLUENCE OF INDIVIDUALLY CHOSEN
CONTROLLED BREATHING FREQUENCY ON
THE HEART RATE VARIABILITY INDEXES**

We studied the changes in indexes of variability of heart rate and fractal neurodynamics under conditions of controlled breathing on fluctuation frequency of a spectrum of heart rate. It is shown that the controlled breathing, which frequency corresponds to a frequency of localization of the maximum peak of capacity of a heart rate in low-frequency is a powerful mechanism of management of heart rate and change of a functional condition of an organism as a whole.

Key words: controlled breathing, heart rate variability, fractal neurodynamics, heart rate vegetative management system.

Тавр. нац. ун-т ім. В.І. Вернадського;

*Центр корекції функціонального стану людини,
Сімферополь*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баевський Р.М., Берсенева Г.П. Оцінка адаптаційних

можливостей організму і ризк розвитку захворювань. – М.: Медицина, 1997. – 236 с.

2. Обґрунтування апаратно-програмних методів, призначених для скрінинг-діагностики внутрішніх захворювань і для оцінки ефективності лікувально-профілактичних заходів в системі диспансеризації військовослужбовців та пенсіонерів МО: звіт про науково-дослідну роботу. – СПб: ВМА, 2002. – 77 с.
3. Чуян О.М., Бирюкова О.О., Раваева М.Ю., Нікіфоров І.Р. Особенности системы вегетативного керування серцем у випробовуваних с різним типом вегетативної регуляції //Вчені записки Тавр. нац. ун-ту ім. В. І. Вернадського. – 2009. – 22 (61), №1. – С. 113-133.(Сер. «Біологія, хімія»).
4. Brac^ic^Lotric^ M, Stefanovska A. Synchronization and modulation in the human cardiorespiratory system // Physica A. – 2000. – 283. – P. 61.
5. De Boer R.W., Karemuker J.M., Stracker J. // Hemodynamic fluctuations and baroreflex sensitivity in humans: a beat-to-beat model // Amer. J. Physiol. – 1987. – 253, № 3. – P. 680.
6. Glass L. Synchronization and rhythmic processes in physiology // Nature. – 2001. – 410. – P. 277.
7. Glass L., Mackey M.C. From clocks to chaos: the rhythms of life. – Princeton: Princeton University press, 1988. – P. 214.
8. Heart rate variability. Standatds of Measurement, Physiological interpretation and clinical use// Circulation. – 1996. – 93. – P.1043-1065.
9. Huikuri H.V., Niemela M.J., Ojala S., Rantala A., Ikaheimo M.J., Airaksinen K.E. Circadian rhythms of frequency domain measures of heart rate variability in healthy subjects and patients with coronary artery disease. Effects of arousal and upright posture // Circulation. – 1994. – 90, № 1. – P. 121.
10. Malpas S. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. // Physiol Heart Circulat. Physiol. – 2002. –№ 282. – P. 6-20.
11. Prokhorov M.D., Ponomarenko V.I., Gridnev V.I., Bodrov M.B., Bespyatov A.B. Synchronization between main rhythmic processes in the human cardiovascular system // Phys. Rev. E. – 2003. – № 68. – P. 13.

Тавр. нац. ун-т ім. В.І. Вернадського;

*Центр корекції функціонального стану людини,
Сімферополь*

E-mail: health.center.tnu@gmail.com

*Матеріал надійшов до
редакції 04.11.2009*

ОГЛЯДИ

УДК 577.352.33

О.А. Федоренко, С.М. Марченко

Спонтанно активні іонні канали мембран ядерної оболонки

В еукаріотних клітинах генетичний апарат обмежений ядерною оболонкою, яка складається з двох мембран, внутрішньої та зовнішньої, і може розглядатися як специфічна частина ендоплазматичного ретикулума клітини. В ядерних мембранах знаходяться ядерні пори – комплекси, які забезпечують високоселективний транспорт макромолекул і пасивне перенесення іонів і малих молекул. Крім того, у внутрішній та зовнішній мембранах ядерної оболонки були описані іонні канали, селективні до катіонів та аніонів. Фізіологічне значення цих каналів повністю досі не встановлено через їх важкодоступність для прямого електрофізіологічного дослідження, але ми можемо припустити, що вони, ймовірно, відіграють важливу роль у підтриманні іонного балансу між цитоплазмою/нуклеоплазмою та люменом ядерної оболонки. У цьому огляді ми зібрали та проаналізували дані щодо спонтанно активних іонних каналів, які були знайдені в мембранах ядерної оболонки клітин різних типів, що дало нам можливість уперше класифікувати ці канали та припустити їх функційне значення.

Ключові слова: іонні канали, ядерна оболонка, ядерна пора, внутрішньоклітинна сигналізація, кальцієвий сигнал, клітинні депо Ca^{2+} .

ВСТУП

Відомо, що одна з головних характеристик еукаріотної клітини є її компартменталізація. Система внутрішньоклітинних мембранних утворень, основою яких є ендоплазматичний ретикулум (ЕР), відіграє велику роль у нормальному функціонуванні клітини. У клітинних мембранах наявні іонні канали, специфічні за своїми властивостями, які на відміну від іонних каналів цитоплазматичної мембрани залишаються недостатньо вивченими через складності у проведенні електрофізіологічних досліджень безпосередньо на внутрішньоклітинних мембранах, не порушуючи їх нативність.

Генетичний апарат клітини відокремлений від решти цитоплазми специфічною органелою – ядерною оболонкою, котру розглядають як частину ЕР, оскільки її зовнішня мембрана та перинуклеарний

простір морфологічно зв'язані з мембраною та люменом ЕР, а також мають спільні біохімічні властивості [5, 6]. Було показано, що ядерна оболонка, як і ЕР, може функціонувати як кальцієве депо [33, 36, 42].

Ядерна оболонка, безперечно, є найбільшою цистерною ЕР. Великий розмір робить її єдиною частиною ЕР в клітинах ссавців, придатною для прямих patch-clamp-реєстрацій. Таким чином, мембрани ядерної оболонки можна використовувати для дослідження іонних каналів решти ЕР.

Досить суперечливим залишається питання щодо функції іонних каналів ядерної оболонки. Вважають, що вони відповідають за підтримання сталої концентрації різних іонів у перинуклеарному просторі та нуклеоплазмі під час певних фізіологічних станів протягом функціо-

© О.А. Федоренко, С.М. Марченко

нальної активності клітини. Усі ядерні іонні канали, які на цей час були описані в літературі, демонструють різні біофізичні властивості, проте фізіологічне значення такого різноманіття каналів залишається незрозумілим. Отже, дослідження іонних каналів ядерної оболонки представляє інтерес у декількох відношеннях. По-перше, вони можуть брати активну участь у регуляції транспорту між цитоплазмою та нуклеоплазмою, а також генетичного апарату клітини. По-друге, ці іонні канали ядерної оболонки можна розглядати як канали ER.

Дослідження іонних каналів ядерної оболонки має насамперед велике теоретичне значення, оскільки сприяє більш глибокому розумінню механізмів внутрішньоклітинної регуляції, зокрема передачі клітинних сигналів всередину ядра, що спричиняє зміни в активності генетичного апарату. Ці дослідження дають підставу для подальшого вивчення властивостей ядерної оболонки та її зв'язку з такими фізіологічними явищами в клітині, як апоптоз, нейродегенерація тощо.

Ми спробували зібрати всі відомі дані щодо іонних каналів ядерних мембран, які були знайдені в клітинах різних типів, та пояснити їх значення у нормальному функціонуванні клітини.

Особливості будови та функціонування ядерної оболонки клітини. Ядерна оболонка – специфічна органела, яка формується внаслідок розширення та злиття цистерн ER таким чином, що навколо ядра утворюється подвійна стінка. Ця структура характерна для всіх еукаріотних клітин. Ядерна оболонка складається із зовнішньої та внутрішньої мембран, які розділені люменом, або перинуклеарним простором, завширшки 20–60 нм. Мембрани ядерної оболонки в морфологічному відношенні не відрізняються від решти внутрішньоклітинних мембран: вони мають товщину близько 7 нм і складаються з двох осміофільних шарів.

Ядерна оболонка не лише обмежує

генетичний матеріал клітини, вона є напівпроникним бар'єром між цитоплазмою та нуклеоплазмою. Транспорт крізь ядерну оболонку забезпечують численні комплекси ядерної пори (NPC). Через ці комплекси здійснюється пасивна дифузія іонів і молекул з молекулярною масою менше ніж 40 кДа [31], а також високоселективний активний транспорт макромолекул – нуклеїнових кислот і протеїнів [2, 37, 39]. Крім того, в зовнішній і внутрішній ядерних мембранах були виявлені іонні канали, що демонструють різні біофізичні властивості залежно від типу клітин, в яких вони були знайдені.

Зовнішня та внутрішня мембрани ядерної оболонки мають певні біохімічні та функціональні відмінності [25, 36, 60]. Морфологічні дослідження показали, що зовнішня ядерна мембрана є продовженням ER [6, 25, 35, 61]. Ця мембрана, як і сарко/ендоплазматичний ретикулум, містить Ca^{2+} -АТФазу, яка відповідає за активний транспорт іонів кальцію [32]. Внутрішня мембрана тісно взаємодіє з нуклеоскелетом (ламінами А, В і С) через рецептор до ламіну В, а також LAP1- і 2-протеїн та емерин [53, 61, 62], мутації яких призводять до важких спадкових хвороб [8]. До того ж, як показали нещодавні дослідження, набір іонних каналів у внутрішній і зовнішній мембранах ядерної оболонки суттєво відрізняється [25, 36, 16–19]. Крім того, ядерна оболонка, так само як і ER, вважається кальцієвим депо, з якого під час певних фізіологічних явищ (збудження) вивільнюється Ca^{2+} [4, 24, 33, 36, 44, 46, 51, 54]. Перші дослідження, які підтверджують це припущення були проведені на ізольованих ядрах клітин печінки [42]. Автори показали, що ці ядра можуть акумулювати Ca^{2+} АТФ-залежним чином і виділяти його при аплікації інозитолтрифосфату.

Отже, ядерна оболонка клітини виконує не лише структурну функцію, а також бере активну участь у внутрішньоклітинній сигналізації.

Комплекс ядерної пори – функціональна та структурна одиниця оболонки ядра клітини. Дослідження з використанням електронної мікроскопії показали наявність у ядерній оболонці дуже характерних утворень – ядерних пор, які пронизують обидві ядерні мембрани [29, 37, 39]. В ядерній порі зовнішня та внутрішня мембрани зливаються, внаслідок чого сполучаються цитоплазма та нуклеоплазма, утворюючи канал діаметром близько 90 нм [20, 35]. У цьому каналі знаходиться NPC, який являє собою величезну надмолекулярну структуру масою понад 125 МДа та складається з понад 100 окремих білкових молекул – нуклеопоринів [35]. У клітинах хребетних виявлено більш ніж 30 різних нуклеопоринів, з яких більшість розчинна і лише 2 білки інтегровані у мембрану. В NPC представлено 8–24 копії кожного з цих білків [34, 49, 50]. У складі більшості нуклеопоринів наявні так звані FG-повтори, збагачені на залишки фенілаланіну та гліцину, які необхідні для зв'язування з рецепторами (специфічними для ядерного імпорту та експорту) і забезпечують транспортування молекул крізь ядерну оболонку.

Складний комплекс пор має октагональну симетрію та включає три ряди гранул розміром близько 25 нм, по 8 штук у кожному – три головні кільця, які укладені одне під одним [1, 29, 59]. Один ряд лежить з боку нуклеоплазми, другий – з боку цитоплазми, третій – розташований в центральній частині пори [43, 50]. Центральне, або люменальне, кільце має 8 випинів, що оточують центральне ядро структури, в якому знаходиться сам канал цього комплексу. Дослідження електронної та флуоресцентної мікроскопії показали, що діаметр внутрішнього каналу ядерної пори приблизно 6 нм, а довжина близько 15 нм [1, 26]. Від цитоплазматичного кільця відходять 8 виростів у цитоплазму, а 8 виростів нуклеоплазматичного кільця утворюють кошикоподібну структуру, яка сполучається з

нуклеоскелетом [22, 27]. Таким чином, NPC бере участь в організації структури ядра.

Під час поділу клітини NPC розпадаються на окремі нуклеопорини, які поширюються на всю клітину [34]. Вважається, що розпад NPCs супроводжується фосфорилуванням деяких білків ядерної пори. Після руйнування ядерної оболонки окремі нуклеопорини збираються в певні скупчення, які можна спостерігати у цитоплазмі. Формування NPCs при утворенні нової ядерної оболонки після розподілу клітини не потребує синтезу нових протеїнів, оскільки компоненти комплексів ядерних пор збираються відразу ж після мітозу [23].

Щільність ядерних пор залежить від типу клітини, її фізіологічного стану та метаболічної активності [39]. Так, наприклад, у гепатоцитах щільність NPC становить приблизно 10–15 пор на 1 мкм² [55], у нейронах Пуркінє – 19–25 пор на 1 мкм², в олігодендроцитах – 5–7 пор на 1 мкм². Загальна кількість ядерних пор на одне ядро нейрона варіює від 18451 ± 2336 (у нейронах Пуркінє) до 621 ± 394 (у гранулярних нейронах). У гліальних клітинах щільність ядерних пор на одне ядро дещо нижча і становить від 1782 ± 162 (у протоплазматичних астроцитах) до 402 ± 67 (в олігодендроцитах) [23].

Є дані, що інколи ядерні пори можуть утворювати кластери з двох чи більше NPC. У нейронах Пуркінє такі кластеризовані комплекси ядерних пор становлять 82 % від загальної кількості пор в ядерній оболонці, а в інтернейронах – 44 % [23]. Фізіологічне значення цього явища залишається нез'ясованим.

Через NPCs здійснюється двобічне перенесення іонів і молекул між цитоплазмою та нуклеоплазмою, яке може бути двох видів – активний і пасивна дифузія. За рахунок активного транспорту крізь ядерні пори проникають нуклеїнові кислоти та протеїни; для цього використовується енергія гідролізу ГТФ за наявності Ran, яка

є Ras-спорідненою ГТФазою [29]. Крім того, білки, які переносяться в ядро повинні мати специфічні сигнальні послідовності, так само й молекули, які з ядра повинні потрапити у цитоплазму [13, 57]. Нині відомо безліч ядерних сигнальних послідовностей різних білків тварин, дріжджів і рослин, які впізнаються специфічними транспортними рецепторами, що зв'язуються з NPC [29, 37].

Пасивно крізь ядерну пору можуть проникати молекули масою до 40 кДа та іони [31]. Хоча за традиційною точкою погляду NPCs не перешкоджають пересуванню іонів з цитоплазми у ядро і навпаки, останні дослідження показали, що ядерні пори таки створюють бар'єр для вільної дифузії. Так вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки може модулювати пасивний транспорт через NPC [54, 58].

Деякі науковці висловлюють припущення, що у NPC крім центрального каналу пори, через який здійснюється активний транспорт та пасивна дифузія, є й інші додаткові периферичні канали, які забезпечують рух неорганічних іонів (K^+ , N^+ , H^+ , Ca^{2+} та Cl^-) всередину чи назовні ядра навіть під час транспорту через NPC великої молекули, яка може закривати центральну пору комплексу. Ці канали, ймовірно, є АТФ- та Ca^{2+} -залежними [39, 52].

Морфологічні та функціональні дослідження, які проводили різні групи вчених, показали тісний зв'язок між іонними каналами ядерної мембрани та ядерною порою [9–12, 38, 39]. Електронно-мікроскопічні дослідження показали наявність восьми малих периферичних каналів, які розташовуються навколо центральної пори NPC [52]. Було показано, що кількість іонних каналів, зареєстрованих за допомогою методу patch-clamp у клітинах деяких типів, може збігатися з кількістю NPC [38, 56]. Крім того, було зроблено припущення, ніби ці дві транспортні системи (крізь центральну пору та периферичні

канали), незважаючи на свою фізичну відокремленість, можуть взаємно впливати одна на одну, проте механізми цього впливу залишаються нез'ясованими. Всі ці дані навели на думку, ніби іонні канали дійсно входять до складу NPC. Але це твердження спростовують праці інших науковців [18, 25, 36].

Отже, NPC – не лише головна структурна складова ядерної оболонки, він є основною сполучною ланкою між цитоплазмою та нуклеоплазмою, транспорт через яку характеризується високою селективністю.

Іонні канали мембран ядерної оболонки клітини. Електрофізіологічні властивості ядерної оболонки почали досліджувати ще у 60-ті роки, проте вперше зареєструвати поодинокі іонні канали вдалося значно пізніше [38]. Виявилось, що крім ядерних пор, через які відбувається ядерно-цитоплазматичний транспорт, у зовнішній та внутрішній мембранах ядерної оболонки наявні іонні канали, які сполучають цитоплазму із перинуклеарним простором. За останній час з'явилася низка праць, які підтверджують існування ядерних іонних каналів у багатьох типах клітин [3, 14–19, 21, 25, 36, 38, 39, 48].

Для досліджень властивостей поодиноких іонних каналів ядерних мембран використовують ізольовані ядра [3, 15, 36], а також протеоліпосоми [25] чи плоскі ліпідні бішари [40, 48] зі вбудованими в них ядерними мембранами. За допомогою певних методичних підходів можна досліджувати внутрішню та зовнішню ядерні мембрани та їх іонні канали окремо [36, 37, 48]. Проте єдиним методом, який дає змогу досліджувати ядерні іонні канали у їх нативному стані, є використання ізольованих ядер [16–19].

Під час реєстрації поодиноких каналів у внутрішньоклітинних мембранах було виявлено багато іонних каналів різних типів. Частина з них не потребує для своєї

активації жодних стимулів, і тому такі канали називаються спонтанно активними іонними каналами. Серед них розрізняють катіонні та аніонні канали, які відрізняються за своїми біофізичними властивостями та фізіологічним значенням.

Першими з іонних каналів, які вдалося зареєструвати на мембранах ядерної оболонки, були калійселективні канали з багатьма рівнями провідності, максимальна з яких становила 200 пСм [38].

Нині вже є велика кількість праць, в яких, використовуючи електрофізіологічні методи, були описані мало селективні катіонні канали на внутрішніх мембранах клітин. Однак вони не були виділені та клоновані, адже досі не знайдено їх блокатори чи інші молекули, за допомогою яких ці канали можна ідентифікувати поза мембраною.

Ядерні мембрани нейронів Пуркінє містять катіонний канал з великою провідністю ($198 \text{ пСм} \pm 27 \text{ пСм}$ у симетричному розчині KCl). Цей канал є мало селективним до одновалентних катіонів ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}=0,65$) та не пропускає двовалентні катіони (Ca^{2+} , Ba^{2+}). Відомі модулятори катіонних каналів (тетраетиламоній, амінопіридин, рутеніум ред, ріанодин, гепарин, La^{3+} , АТФ, Mg^{2+}) не мають жодного впливу на ці канали, і лише Ca^{2+} та Ba^{2+} у дуже високих концентраціях (100 ммоль/л) пригнічують їх активність [36]. Автори припускають, що ці канали необхідні для підтримання іонного балансу під час вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки в ядрах цих нейронів.

У внутрішній мембрані ядер пірамідальних нейронів CA1-ділянки у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl були зареєстровані канали з провідністю 220–260 пСм [17]. Як показали досліди, в розчині KCl/трис-Cl, це катіонні канали, які за своїми кінетичними властивостями та провідністю близькі до мало селективних катіонних каналів, що були описані раніше

в ядрах нейронів Пуркінє мозочка щура. Частота відкритого стану каналів ядер нейронів мозочка була також потенціалзалежна, при великих позитивних потенціалах (більше ніж +60 мВ) канали майже весь час були відкриті, а при великих негативних потенціалах (-60 мВ та нижче) закривалися [36]. Отже, катіонні канали у внутрішній мембрані ядер нейронів CA1-ділянки гіпокампа мають більшу чутливість до зміни мембранного потенціалу, адже вони повністю пригнічуються при менших негативних потенціалах (-40 мВ). Ці канали, ймовірно, беруть участь у регуляції кальцієвого сигналу, і розбіжність у потенціалзалежності може означати, що вони по-різному регулюються. Зокрема, більша чутливість до негативних потенціалів може означати, що викид Ca^{2+} з ядерної оболонки в гіпокампі має меншу тривалість.

АТФ-залежні калієві канали були знайдені на ядрах в-клітин підшлункової залози миші. Ці канали активуються АДФ та блокуються АТФ у підвищених (мілімолярних) концентраціях. Було показано, що блокування цих каналів призводить до збільшення концентрації Ca^{2+} в ядрі, внаслідок чого активується фактор транскрипції CREB (від англ. CAMP response element-binding) впливаючи таким чином на експресію генів [47]. Ми таким чином пояснюємо зв'язок між зміною в метаболізмі клітини та її генетичною активністю через активність цих каналів.

До цього часу залишається невизначеним фізіологічна роль катіонселективних іонних каналів у внутрішній ядерній мембрані. Канали, які проникні для K^{+} та інших одновалентних катіонів, але непроникні для Ca^{2+} , що були знайдені в ядерній мембрані нейронів Пуркінє [18, 36], пірамідальних нейронів гіпокампа [17] та Т-лімфоцитах [16]. Схожі канали були описані для мембран саркоплазматичного ретикулула клітин багатьох типів [45].

Відомо, що саркоплазматичний та ендоплазматичний ретикулуми, а також ядерна оболонка є кальцієвим депо, тому в них повинен бути механізм, який запобігає зміненню мембранного потенціалу під час виходу кальцію з цих органел. Таким чином, можна зробити припущення, що ці канали забезпечують потік одновалентних катіонів, який запобігає змінам потенціалу під час транспорту через мембрану інших катіонів, наприклад Ca^{2+} [63, 64]. Крім того, у порожнині ендоплазматичного ретикулума відбувається синтез і модифікації всіх білків клітини, а для їх подальшого транспортування велике значення має мембранний потенціал.

Також є дані, які свідчать, що зміна внутрішньоклітинної концентрації одновалентних катіонів лежить в основі механізмів апоптозу. Зокрема, було встановлено, що збільшення вмісту іонів натрію спричиняє набухання ядра, а зміни концентрації іонів калію займають провідне положення у контролюванні процесів поширення різноманітних змін у клітині під час апоптозу [7].

Іншим типом спонтанно активних іонних каналів виявилися канали, селективні до Cl^- . Хлорні канали у клітинах можуть регулювати кисле середовище у клітинних компартментах та електронейтралізування під час транспорту іонів (H^+ або Ca^{2+}) крізь внутрішньоклітинні мембрани. Крім того, іони хлору відповідають за підтримання сталого тиску (та об'єму) клітини [56].

П'ять основних типів хлорних каналів ідентифіковано на цей час: канали, пов'язані з лігандкеруваними рецепторами, а також канали родини CFTR, CIC, CLIC і CLCA. Серед них представники родини CLIC та деякі з CIC експресуються на мембранах внутрішньоклітинних органел, зокрема ендоплазматичного ретикулума, ядерної оболонки, ендосом [14, 30].

Молекулярна структура хлорних каналів була досліджена завдяки клонуванню їх генів, і функції цих каналів були вивчені на

молекулярному рівні. Молекула CIC складається з 18 спіралей, більшість з яких неповністю перетинає мембрану, 9 з них розташовані перпендикулярно до поверхні мембрани. Канал має вигляд ромба розміром $10 \times 5,5 \times 6,5$ нм та випинає з обох боків мембрани [30].

Всі CIC-канали є гомодимерами. Аналіз тривимірної структури вказує на наявність двох однакових субодиниць, які контактують між собою на великій площі, що містить по чотири спіралі від кожної з цих субодиниць. Ті CIC-канали, які були досліджені на рівні одного каналу (CIC-0, CIC-1 та CIC-2) демонстрували два чітких рівні за амплітудою рівня провідності, що вказувало на наявність у молекулі каналу двох ідентичних пор з окремими селективними фільтрами (послідовність селективності яких: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$). Кристалографічний аналіз підтвердив це спостереження. Більшість каналів CIC демонструють чітку потенціалзалежність, крім того, мають подвійний ворітний механізм: по-перше, кожна з пор каналу може закриватися незалежно і швидко (до 10 мс), а потім відкриватися при деполяризації; по-друге, є механізм, який одночасно закриває обидві пори на тривалий час (10 с – 1 хв) та відкриває їх при гіперполяризації [30]. Вважають, що залишок аспартату в домені D1 діє як сенсор напруги. Ворітні механізми каналів залежать не лише від потенціалу, а також модулюються концентрацією аніонів і рН цитоплазми [93]. CIC були знайдені у саркоплазматичному ретикулумі (CIC-1), в ендосомах та синаптичних везикулах (CIC-3), ендоплазматичному ретикулумі (CIC-6), лізосомах (CIC-7) [30], проте, ймовірно, вони можуть бути локалізовані й на інших внутрішньоклітинних мембранах.

Аніонні канали, які були знайдені у внутрішній ядерній мембрані гранулярних нейронів зубчастої звивини [19] та в зовнішній ядерній мембрані Jurkat-клітин [16], ймовірно, належать до родини CIC,

адже ці канали дуже швидко флюктували між двома однаковими за значенням рівнями провідності.

Іншою родиною хлорних внутрішньоклітинних каналів є CLIC. Першим представником цієї родини, який вдалося виділити та клонувати є аніонний канал ядерних мембран клітин коров'ячої нирки р64 [14]. Молекулярна маса цього каналу 64 кДа, складається він з 437 амінокислотних залишків та має лише одну ділянку, що перетинає мембрану [30]. У ядрах моноцитів людини були клоновані внутрішньоклітинні хлорні канали NCC27, або CLIC-1, та CLIC-2. У клітинах ссавців був клонований CLIC-3. Усі ці канали демонструють високу гомологію один до одного. Як і CLIC-1, так CLIC-2, CLIC-3 було визначено на мембрані ядерної оболонки, де вони спричиняють рух аніонів крізь неї [56]. Було показано, що CLIC-3 своїм С-кінцем сполучається з мітогенактивною протеїнкіназою ERK7 (від англ. extracellular signal-regulated kinase 7) і, можливо, бере участь у регуляції росту клітини [14]. CLIC були виявлені майже в усіх тканинах ссавців, але найбільший рівень їх експресії спостерігається в серці, нирках, легенях і скелетних м'язах.

У клітинах людини були знайдені хлорні канали, що не відносились до жодного з цих типів, а саме MCLC (від англ. mid-1-related chloride channel), які локалізувалися головним чином на ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі, хоча у сперматозитах висока їх щільність спостерігалася на мембранах ядерної оболонки, що вказує на участь цих каналів у сперматогенезі. MCLC у цих досліджах мали провідність 70 пСм у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl і були більш проникні для аніонів, ніж катіонів ($P_{Cl^-}/P_{K^+}=3,7$). Як показали електрофізіологічні дослідження, ці канали можуть проводити й інші аніони у такій послідовності: $Br^- > Cl^- > F^- > SO_4^{2-}$ [41].

Внутрішньоклітинні хлорні канали мо-

жуть блокуватися Zn^{2+} і Cd^{2+} у мікромольних концентраціях. ClC є малочутливими до таких класичних блокаторів аніонних каналів, як нітрофенілпропіламінбензоат, дифеніламінокарбоксилат і можуть бути заблокованими ними лише у мілімолярних концентраціях. CLIC блокують інданілоксиацетат, дисульфонова кислота та TS-ТМ-каліксарен [30].

Хлорні канали, що були знайдені в мембранах ядерної оболонки різних типів клітин, різко відрізняються за своїми біофізичними властивостями. Ці дані підтверджують наше припущення про те, що в клітинах різних типів експресуються різні набори іонних каналів у мембранах ядерної оболонки. Крім того, навіть у нейронах різних відділів ЦНС вони мають розбіжності. Ця розбіжність у властивостях аніонних каналів ядерних мембран різних типів, імовірно, пов'язана з відмінностями у функціонуванні їх ядерних оболонок, проте достовірного пояснення цього явища на цей час не існує.

Припускають, що аніонні канали в ядерній оболонці необхідні для підтримання між цитоплазмою та перинуклеарним простором іонного балансу, який може суттєво змінюватися під час певних фізіологічних явищ, наприклад звільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки, проте це твердження потребує доведення.

Проблеми дослідження спонтанно активних іонних каналів ядерних мембран. Як вже було зазначено, ядерна оболонка є одночасно інтегральною частиною ендоплазматичного ретикулума та специфічною структурою, яка може регулювати ядерно-цитоплазматичний транспорт. Така подвійність функцій викликає сумніви щодо фізіологічного значення іонних каналів, які знаходяться на ядерній оболонці. По-перше, вони можуть являти собою іонні канали ендоплазматичного ретикулума. По-друге, у patch-clamp може бути зареєстрована каналоподібна активність ядерних

пор [28, 39, 55]. Таким чином, працюючи з ядерною оболонкою, важливо чітко визначити, чи належать канали, які реєструються, до комплексу ядерної пори.

Щільність ядерних пор у ядерній оболонці клітин різних типів варіює від одиниць до декількох десятків на $1 \mu\text{m}^2$ [23]. Така висока щільність дає підстави припускати, що під час реєстрацій у patch-піпетці може міститися велика кількість ядерних пор. Таким чином, можна очікувати, що опір під час методу patch-clamp буде дуже низьким. Проте насправді з ядерною мембраною може бути встановлений щільний гігаомний контакт [38], завдяки чому низка іонселективних каналів була описана в ядерній оболонці клітин різних типів [15, 21, 25, 36, 41, 48].

Для того, щоб пояснити ці розбіжності у даних, було припущено, що катіонні канали великої провідності (декілька сотень пікосіменсів), які були знайдені у мембранах ядерних оболонок різних типів клітин, являють собою канали комплексів ядерної пори для пасивної дифузії, що, маючи ворітні механізми, можуть поводити себе як звичайні іонні канали. На користь цієї гіпотези виступають деякі вчені [3, 10, 11, 28, 38, 39, 55], проте їх дані викликають деякі сумніви. Так, наприклад, при дослідженні біофізичних властивостей катіонних каналів великої провідності, які являли собою основний тип спонтанно активних іонних каналів, що були зареєстровані в мембранах ядерної оболонки нейронів Пуркінє мозочка, було чітко показано, що вони не можуть бути каналами ядерної пори, хоча рівень їх щільності в мембранах ядер нейронів цього типу відповідає рівню ядерних пор у таких клітинах [36].

Було показано, що катіонні канали великої провідності можуть бути зареєстровані як у зовнішній, так і внутрішній ядерній мембрані. В обох випадках канали мали ідентичну провідність, селективність і кінетику, але дуже відрізнялися за своєю

потенціалзалежністю [18]. Канали у зовнішній ядерній мембрані інгібувалися позитивними потенціалами в patch-піпетці, а у внутрішній – негативними. Ці дані швидше узгоджуються із локалізацією каналів у мембранах, ніж з їх асоціацією із комплексом ядерної пори. Топологічна орієнтація каналів відносно ядерних мембран була ідентична для обох каналів. Ці канали інгібувалися негативним потенціалом всередині ядерної оболонки, що вказує на знаходження сенсорної ділянки їх молекули всередині перинуклеарного простору. Хоча щільність і провідність катіонних каналів відповідають характеристиці каналу дифузійної пори, інші біофізичні властивості катіонних каналів суперечать цьому припущенню [18].

Отже, було надано докази того, що катіонні канали великої провідності не пронизують подвійну ядерну оболонку, проте забезпечують прямий контакт між нуклеоплазмою або цитоплазмою та перинуклеарним простором [18]. Ми припускаємо, що катіонні канали великої провідності можуть належати до іонних каналів ендоплазматичного ретикулума та необхідні для його специфічних функцій. Наприклад, вони можуть брати участь у регуляції вивільнення Ca^{2+} з депо [63, 64].

Досі невідомо, чому не вдається виявити активність каналу ядерної пори за допомогою методу patch-clamp. Одна з можливих причин може бути руйнування цілісності комплексу ядерної пори під час утворення гігаомного контакту. Так, наприклад, було показано, що формування останнього цитоплазматичної мембрани супроводжується значними змінами у структурі цитоскелета. Тому можна припустити, що під час patch-clamp від ядерної мембрани руйнується нуклеоскелет, який має тісний взаємозв'язок з комплексом ядерної пори. Таким чином, молекулярна природа каналу комплексу ядерної пори для пасивної дифузії та його властивості

потребують подальших досліджень.

Підсумовуючи все написане вище, можна підкреслити, що у сучасній літературі є багато інформації, яка стосується структурних і функціональних особливостей ядерної оболонки клітин. Але питанням регуляції ядерно-цитоплазматичного транспорту почали займатися відносно недавно, тому в багатьох роботах присутні досить суперечливі дані. На цей час залишається безліч нез'ясованих питань щодо розуміння яким чином відбувається передача внутрішньоклітинних сигналів всередину ядра, яка роль у цьому належить ядерним порам та іонним каналам ядерних мембран.

Дослідження іонних каналів ядерної оболонки дає нам змогу краще зрозуміти процеси, що лежать в основі внутрішньоклітинної сигналізації. Хоча чітко визначення фізіологічного значення наявності у внутрішній та зовнішній ядерних мембранах спонтанно активних іонних каналів, які є селективними для аніонів та одновалентних катіонів, досі нез'ясоване. Крім того, залишається відкритим питання щодо можливої участі цих каналів у патологічних процесах, які відбуваються в клітині.

Е.А. Федоренко, С.М. Марченко

СПОНТАННО АКТИВНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ МЕМБРАН ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ

В эукариотных клетках генетический аппарат ограничен ядерной оболочкой, которая состоит из двух мембран, внешней и внутренней, и может рассматриваться как специфическая часть эндоплазматического ретикулума клетки. В ядерных мембранах находятся ядерные поры – комплексы, которые обеспечивают высокоселективный транспорт макромолекул и пассивный – ионов и малых молекул. Кроме того, во внутренней и во внешней мембранах ядерной оболочки были описаны ионные каналы с разными свойствами. Физиологическое значение этих каналов полностью пока не установлено из-за их труднодоступности для прямого электрофизиологического исследования, но мы можем предположить, что они могут играть важную роль в поддержании ионного баланса между цитоплазмой/нуклеоплазмой и люменом ядерной оболочки. В этом обзоре мы собрали и проанализировали данные по

спонтанно активным ионным каналам, которые были найдены в мембранах ядерной оболочки клеток разных типов, и постарались предположить их функциональное значение. Ключевые слова: ионные каналы, ядерная оболочка, ядерная пора, внутриклеточная сигнализация, кальциевый сигнал, клеточные депо Ca^{2+} .

O.A. Fedorenko, S.M. Marchenko

SPONTANIOUSLY ACTIVE ION CHANNELS OF THE NUCLEAR ENVELOPE MEMBRANE

The genetic apparatus of the eukaryotic cells is enclosed by the nuclear envelope, which consists of two membranes, the inner and the outer ones, and can be regarded as the specific part of the endoplasmic reticulum of the cell. There are nuclear pores in the nuclear membranes – complexes, which provide the highly selective transport of macromolecules and passive transport of ions and small molecules. Besides, ion channels selective to cations and anions were described in the inner and the outer nuclear membranes. The physiological significance of these channels is not still clear because of the difficulty of access for the direct electrophysiological investigation, but we can suppose that they can play an important role in the ion balance between the cytoplasm/nucleoplasm and the nuclear lumen. In this review we gathered and analyzed data about spontaneously active ion channels which were found in the membranes of the nuclear envelope from cells of different types and tried to propose their functional meaning.

Key words: ion channels, nuclear envelope, nuclear pore, intracellular signaling, calcium signal, Ca^{2+} store of the cell.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akey C.W. Structural plasticity of the nuclear pore complex // *J.Mol. Biol.* – 1995. – **248**. – P. 273–293.
2. Allen T.D., Cronshaw J.M., Bagley S., Kiseleva E., Goldberg M.W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**. – P. 1651–1659.
3. Assandri R., Mazzanti M. Ionic permeability on isolated mouse liver nuclei: influence of ATP and Ca^{2+} // *J. Membr. Biol.* – 1997. – **157**, № 3. – P. 301–309.
4. Badminton M.N., Campbell A.K., Rembold C.M. Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca^{2+} in HeLa cells // *J. Biol. Chemistry.* – 1996. – **271**, № 49. – P.31210–31214.
5. Baumann O., Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains // *Int. Rev. Cytol.* – 2001. – **205**. – P. 149–214.
6. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle // *Cell Calcium.* – 2002. – **32**,

- № 5–6. – P. 235–249.
7. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 39176–39184.
 8. Burke B., Stewart C.L. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease // *Nature*. – 2002. – **3**. – P. 575–585.
 9. Bustamante J.O., Liepins A., Hanover J.A. Nuclear pore complex ion channels // *Mol. Membr. Biol.* – 1994. – **11**, № 3. – P. 141–150.
 10. Bustamante J.O., Hanover J.A., Liepins A. The ion channel behaviour of the nuclear pore complex // *J. Membr. Biol.* – 1995. – **146**, №3. – P. 239–251.
 11. Bustamante J.O., Varanda W.A. Patch-clamp detection of macromolecular translocation along nuclear pores // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1998. – **31**, № 3. – P.333–354.
 12. Bustamante J.O. Current concepts in nuclear pore electrophysiology // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – **84**, № 3–4. – P. 347–365.
 13. Danker T., H. Oberleithner. Nuclear pore function viewed with atomic force microscopy // *Pflug. Arch. – Eur. J. Physiol.* – 2000. – **439**. – P. 671–681.
 14. Debska G., Kicinska A., Skalska J., Szewczyk A. Intracellular potassium and chloride channels: an update // *ABP.* – 2001. – **48**. – P. 137–144.
 15. Draguhn A., Borner G., Beckmann R., Buchber K., Heinemann U., Hucho F. Large-conductance cation channels in te envelope of nuclei from rat cerebral cortex // *J. Membr. Biol.* – 1997. – **158**, № 2. – 159–166.
 16. Fedorenko O.A., Volkova T.M., Marchenko S.M. New cation channel of the T-lymphocyte nuclear membrane // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, № 1. – P. 17–21.
 17. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Spontaneous active ion channels of the nuclear envelope membranes of pyramidal hippocampal neurons // *Neurophysiology.* – 2007. – **39**, № 1. – P. 3–8.
 18. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Nuclear ionic channels of the granule cells from the dentate gyrus // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, № 3. – P. 9–15.
 19. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Cationic large conductance channels of the nuclear envelope of Purkinje neurons of cerebellum // *Neurophysiology.* – 2007. – **39**, № 2. – P. 13–18.
 20. Feldherr C.M., Akin D., Cohen R.J. Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts // *J. Cell Sci.* – 2000. – **114**. – P. 4621–4627.
 21. Franco-Obergon A., Wang H., Clapham D.E. Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines // *Biophys. J.* – 2000. – **79**. – P. 202–214.
 22. Gant T.M., Wilson K.L. Nuclear assembly // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1997. – **13**. – P. 669–695.
 23. Garcia-Segura L.M., Lafarga M., Berciano M.T., Hernandez P., Andrez M.A. Distribution of nuclear pores and chromatin organization in neurons and glial cells of the rat cerebellar cortex // *J. Comp. Neurol.* – 1989. – 290, № 3. – P. 440–450.
 24. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope // *Cell.* – 1995. – **80**, № 3. – P. 439–444.
 25. Guihard G., Proteau S., Payet M.D., Eskande D., Rousseau E. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes // *FEBS Lett.* – 2000. – **476**. – P. 234–241.
 26. Goldberg M.W., Allen T.D. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy // *J. Mol. Biol.* – 1996. – **257**. – P. 848–865.
 27. Goldberg M.W., Wiese C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // *J. Cell Sci.* – 1997. – **110**. – P. 409–420.
 28. Innocenti B., Mazzanti M. Identification of a nucleocytoplasmic ionic pathway by osmotic shock in isolated mouse liver nuclei // *J. Membr. Biol.* – 1993. – **131**, № 2. – P. 137–142.
 29. Jaggi R.D., Franco-Obergon A., Ensslin K. Quantative topographical analysis of nuclear pore complex function using scanning force microscopy // *Biophys.J.* – 2003. – **85**. – P. 4093–4098.
 30. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebek A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels // *Physiol. Rev.* – 2001. – **82**. – P.503–568.
 31. Keminer O., Peters R. Permeability of single nuclear pore // *Biophys. J.* – 1999. – **77**, № 1. – P. 217–228.
 32. Lanini L., Bachs O., Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, № 16. – P.11548–11552.
 33. Leite M.F., Thrower E.C., Echivarria W., Koulen P., Bennett A.M., Ehrlich B.E., Nathanson M.H. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently // *PNAS.* – 2003. – **100**, № 5. – P. 2975–2980.
 34. Lenart P., Ellenberg J. Monitoring the permeability of the nuclear envelope during the cell cycle // *Methods.* – 2006. – **38**, № 1. – P. 17–24.
 35. Marelli M., Lusk C.P., Chan H., Aitchison J.D., Wozniak R.W. A link between the synthesis of nucleoporins and the biogenesis of the nuclear envelope // *J. Cell Biol.* – 2001. – **153**, № 4. – P. 709–724.
 36. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N., Kostyuk P.G., Thomas R.C. Spontaneously active and InsP₃-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones // *J. Physiol.*

- 2005. – **15**, № 565. – P.897–910.
37. Matzke M., Aufsatz W., Gregor W., van Der Winden J., Papp I., Matzake A.J. Ion transporters in the nucleus? // *Plant Physiol.* – 2001. – **127**. – P. 10–13.
 38. Mazzanti M., DeFelice L.J., Cohn J., Malter H. Ion channels in the nuclear envelope // *Nature.* – 1990. – **22**, № 343(6260). – P. 764–767.
 39. Mazzanti M., Bustamante J.O., Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**, № 1. – P. 1–19.
 40. Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., Thompson C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes // *Nature.* – 1997. – **23**, № 385(6614). – P. 353–357.
 41. Nagasawa M., Kanzaki M., Lino Y., Morishita Y., Kojima I. Identification of a novel chloride channel expressed in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and nucleus // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 23. – P. 20413–20418.
 42. Nicotera P., Orrenius S., Nilsson T., Berggren P.O. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – **87**, № 17. – P. 6858–6862.
 43. Pante N., Aebi U. Molecular dissection of the nuclear pore complex // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1996. – **31**. – P. 153–199.
 44. Petersen O.H., Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Mogami H., Tepikin A.V. The calcium store in the nuclear envelope // *Cell Calcium.* – 1998. – **23**, № 2–3. – P.87–90.
 45. Picard L., Cote K., Teijeira J., Greentree D., Rousseau E. Sarcoplasmic reticulum K^{+} channels from human and sheep atrial cells display a specific electropharmacological profile // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2002. – **34**. – P. 1163–1172.
 46. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // *Physiol. Rev.* – 1994. – **73**, №3. – P. 595–636.
 47. Quesada I., Rovira J.M., Martin F., Roche E., Nadal A., Soria B. Nuclear K^{+} channels trigger nuclear Ca^{2+} transients that modulate ATP nuclear function // *PNAS.* – 2002. – **99**, № 14. – P. 9544–9549.
 48. Rousseau E., Michaud C., Lefebvre D., Proteau S., Decrouy A. Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei // *Biophys. J.* – 1996. – **70**, № 2. – P. 703–714.
 49. Rout M. P., Aitchison J. D., Suprpto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture and transport mechanism // *J. Cell Biol.* – 2000. – **148**. – P. 635–651.
 50. Ryan K.J., Wente S.R. The nuclear complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – **12**. – P. 361–371.
 51. Santella L., Garafoli E. Calcium signaling in the cell nucleus // *FASEB J.* – 1997. – **11**. – P. 1091–1109.
 52. Shahin V., Danker T., Enss K., Ossig R., Oberleithner H. Evidence for Ca^{2+} - and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes // *FASEB J.* – 2001. – **15**, № 11. – P. 1895–1901.
 53. Shumaker D.K., Kuczumski E.R., Goldman R.D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions // *Curr. Opin. Cell Biology.* – 2003. – **15**, № 3. – P. 358–366.
 54. Stehno-Bittel L., Perez-Terzic C., Clapham D.E. Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca^{2+} store // *Science.* – 1995. – **270**. – P. 1835–1838.
 55. Tonini R., Grohovaz F., Laporta C.A., Mazzanti M. Gating mechanism of the nuclear pore complex channel in isolated neonatal and adult mouse liver nuclei // *FASEB J.* – 1999. – **13**, № 11. – P. 1395–1403.
 56. Tonini R., Ferroni A., Valenzuela S.M., Warton K., Campbell T.J., Breit S.N., Mazzanti M. Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells // *FASEB J.* – 2000. – **14**, № (9). – P. 1171–1178.
 57. Walther T.C., Pickersgill H.S., Cordes V.C., Goldberg M.W., Allen T.D., Mattaj I.W., Fornerod M. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import // *J. Cell Biol.* – 2002. – **158**. – P.63–77.
 58. Wei X., Henke V.G., Strubing G., Brown E.B., Clapham D.E. Real-time imaging of nuclear permeation by EGFP in single intact cells // *Biophys. J.* – 2003. – **84**. – P.1317–1327.
 59. Wente S.R. Gatekeepers of the nucleus // *Science.* – 2000. – **288**. – P.1374–1377.
 60. Worman H.J., Courvalin J.C. The inner nuclear membrane // *J. Membr. Biol.* – 2000. – **177**. – P. 1–11.
 61. Worman H.J. Components of the nuclear envelope and their role in human disease // *Novartis Found Symp.* – 2005. – **264**, № 35. – P. 227–230.
 62. Worman H.J., Courvalin J.C. Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease // *Int. Rev. Cytol.* – 2005. – **246**. – P. 231–279.
 63. Yamashita M., Sugioka M., Ogawa Y. Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release // *FEBS Journal* – 2006. – **273**. – P.3585–3597.
 64. Yamashita M. ‘Quantal’ Ca^{2+} release reassessed – a clue to oscillation and synchronization // *FEBS Lett.* – 2006. – **580**. – P. 4979–4983.

О.І. Сукманський, М.С. Дрогомирецька, О.В.Деньга, І.О.Сукманський

Роль глікозаміногліканів у патогенезі атеросклерозу

В огляді описана роль глікозаміногліканів і протеогліканів у патогенезі атеросклерозу і можливості корекції атеросклеротичних уражень судин за допомогою впливу на їхній метаболізм.

Ключові слова: глікозаміноглікани, протеоглікани, атеросклероз, стінка артерій.

Серцево-судинні захворювання займають перше місце серед причин смерті людей. Найпоширеніші з них: ішемічна хвороба серця (хвороба коронарних артерій), атеросклероз і гіпертензія. Атеросклероз, який за виразом Дильмана [4] є „нормальною віковою хворобою”, уражає не тільки аорту та судини серця, але й артерії мозку, нирок та інших органів.

В останні роки все більшої ваги набуває гіпотеза, згідно з якою в основі атеросклерозу артеріальних судин лежить запальний процес, що супроводжується інфільтрацією їхньої стінки макрофагами та лімфоцитами, продукцією цитокінів і загальними проявами запалення у вигляді гострофазної реакції [9, 15, 17, 47, 51]. Роль моноцитів, мобілізованих у артеріальну стінку під впливом молекул адгезії та хемокінів, полягає також у тому, що вони експресують металопротеїнази, які послаблюють фіброзний покрив атеросклеротичних бляшок, сприяють їй розривам, виникненню тромбозу і гострих коронарних порушень[29].

Згідно з сучасними уявленнями, в механізмі розвитку атеросклеротичних уражень артеріальних судин головними є три процеси: 1) проліферація гладеньком'язових клітин (ГМК), макрофагів і лімфоцитів; 2) утворення ГМК матриксу сполучної тканини, що містить фібрилярні білки (колаген) і протеоглікани; 3) накопи-

чення ліпідів, вільного й етерифікованого холестерину в матриксі та прилеглих до нього клітинах [12]. Результати наукових досліджень останніх років переконливо свідчать про важливу роль протеогліканів і їх активних сірковмісних компонентів – глікозаміногліканів (мукополісахаридів) у патогенезі атеросклерозу, зокрема в регуляції всіх трьох перелічених процесів.

Глікозаміноглікани (ГАГ) відносяться до гетерополісахаридів: вони є полімером дисахариду, що складається з уронової кислоти (D-глюкуронової чи L-ідунової) та гексозаміну (N-ацетиламіноглюкози чи галактози) [38]. В організмі людини та тварин ГАГ знаходяться не у вільному стані, а у складі протеогліканів, де їхні лінійні ланцюги пов'язані з білковим ядром. Відомі 6 класів ГАГ. Це – гіалуронова кислота, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат, дерматансульфат, кератансульфат і гепаринсульфат (гепарин). ГАГ є важливим компонентом міжклітинної речовини сполучної тканини, вони входять також до складу клітинних мембран вищих організмів, що робить універсальною їхню присутність у різних органах і тканинах, зокрема в серцево-судинній системі. В стінках судин наявні різні ГАГ, але переважає серед них гепарин.

Нині вже стало хрестоматійним положення про важливу роль ГМК (що мігрують з медії до інтими) в синтезі колагену та

протеогліканів (отже, і ГАГ), які формують сполучнотканинний матрикс, що є основою для утворення атеросклеротичних бляшок [31]. В цьому плані все більше фактів накопичується на користь гіпотези, згідно з якою в механізмі розвитку атеросклеротичних уражень судин провідною ланкою є „реакція на ретенцію”, в якій критичну роль надають посиленому синтезу протеогліканів ГМК судин під впливом пептидних факторів росту і зв’язуванню з протеогліканами атерогенних ліпопротеїнів низької щільності (ЛНЩ) [19]. При цьому протеоглікани впливають на проліферацію і міграцію ГМК, беруть участь у ліпідному метаболізмі, в зв’язуванні та пероксидації ліпідів, справляють дію на продукцію цитокінів, перебіг запального та імунного процесів, на активацію й адгезію тромбоцитів і процеси коагуляції.

Цікаві дослідження виконані на клітинній культурі ГМК аорти щурів [28]. Використовуючи мічений ^{35}S -сульфат, автори показали, що інгібіція синтезу ГАГ 4-метилумбеліферил- β -D-ксилозидом зменшує накопичення екстрацелюлярного матриксу, вміст у ньому хондроїтин-сульфату, а також фібронектину, ламініну і тромбоспондіну, які відіграють важливу роль у міжклітинній взаємодії та взаємодії клітина–матрикс. При цьому спостерігається пригнічення постконфлюентного (багатошарового) росту ГМК та зміни їхньої структури, зокрема зниження цитоскелетних філаментів, що містять α -актин, який синтезується диференційованими ГМК. Слід також зазначити, що важливу роль хондроїтин-сульфату у розвитку атеросклерозу підтвердили подальші дослідження [54].

Відомо, що хондроїтин-сульфат є природним ГАГ, який має протизапальну дію та використовується як засіб лікування остеоартритів. Цікаве дослідження виконане на кроликах, у яких одночасно відтворювали атеросклероз (утриманням на

гіперліпідемічній дієті) і хронічний артрит (внутрішньосуглобовим введенням сенсibilізованим тваринам овальбуміну). Профілактичне введення тваринам хондроїтин-сульфату в дозі 100 мг/кг на добу зменшувало відсоток кроликів, у яких розвивались атеросклеротичні ураження аорти. При цьому в сироватці крові зменшувалася концентрація прозапальних молекул – С-реактивного білка та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) і пригнічувалась експресія ССЛ2/моноцит-хематрактантного білка (MCP-1) і циклоксигенази-2 в мононуклеарах периферичної крові, а також знижувалась ядерна транслокація нуклеарного фактора NF- κ B [29].

Основними хондроїтин- та дерматан-сульфатними протеогліканами екстрацелюлярного матриксу є агрекан, верзикан, біглікан і декорин. Показано, що дія названих протеогліканів на розвиток атеросклерозу залежить від довжини ланцюгів ГАГ. Збільшення довжини сприяє зв’язуванню атерогенних ліпідів і розвитку атеросклерозу, а запобігання цьому збільшенню за допомогою впливу на сигнальні шляхи і ферменти синтезу ГАГ може бути використане з терапевтичною метою [35].

Важливу роль у розвитку атеросклерозу відіграє інший ГАГ – гіалуронова кислота. Вона є нессульфатованим ГАГ, який складається з дисахаридних одиниць, представлених D-глюкуроною кислотою та N-ацетил-D-глюкозаміном. Гіалуронова кислота розташовується переважно в позаклітинному просторі та на поверхні клітин, але виявлена і всередині клітин. Цей унікальний біополімер виконує в живих організмах багато функцій. Він контролює гідратацію тканин і підтримує структуру позаклітинного матриксу, а через свої рецептори (гіаладгерини) бере участь в адгезії, міграції та проліферації клітин, у загоєнні ран, розвитку запалення та інших патологічних процесах [7]. Головним рецептором гіалуронової кислоти є CD44, а іншим – RHAMM (від англ. receptor for

hyaluronic acid mediated motility) [7, 27, 61].

Ці властивості визначають важливе значення гіалуронової кислоти у розвитку атеросклерозу. Слід зазначити, що нативна, високомолекулярна гіалуронова кислота і продукти її деградації – низькомолекулярна відіграють різну, часто протилежну роль у формуванні окремих ланок атеросклеротичного процесу. Узагальнюючи дані літератури, можна сказати, що високомолекулярна гіалуронова кислота є антиангіогенною, а низькомолекулярна стимулює проліферацію та диференціювання ендотеліальних клітин. Разом з тим високомолекулярна гіалуронова кислота стимулює ріст і міграцію ГМК судин, а низькомолекулярна, навпаки, пригнічує їхню проліферацію [7].

У дослідженні на культивованих ГМК аорти щурів показано, що високомолекулярна гіалуронова кислота в дозах 1–5 мг/мл дозозалежно індукує міграцію цих клітин без помітного впливу на їхню проліферацію [27]. Автори також установили, що високомолекулярна гіалуронова кислота незалежно активує білки Rho-родини: RhoA та Rac; відповідно перший – через CD44, а другий – через RHAMM (ці білки є регуляторами цитоскелета актину). При цьому індукована гіалуроновою кислотою міграція ГМК залежить виключно від медийованої RHAMM-активації Rac, пов'язаної з ФІЗК (фосфатидил-інозитол-3-кіназою). Показано, що надмірна експресія гіалуронової кислоти в ГМК судин (у трансгенних мишей з дефіцитом аполіпропротеїну E- apoE) сприяє розвитку атеросклерозу; в аорті при цьому потоншується еластичний шар, судини втрачають еластичність [18]. Дослідження на химерах кісткового мозку (між мишами apoE^{-/-}.CD^{+/+} та apoE^{-/-}.CD^{-/-}) виявило, що рецептори гіалуронової кислоти CD44 на клітинах ендотелію, макрофагах і Т-лімфоцитах підвищують адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин і їхню трансендотеліаль-

ну міграцію [61]. Автори цього дослідження також показали, що CD44 регулюють міграцію ГМК судин у відповідь на низькомолекулярну гіалуронову кислоту, а їхній дефіцит активує фіброз в атеросклеротичних ураженнях.

На культурі ГМК аорти кроликів лінії Watanabe зі спадковою гіперліпідемією показано, що ці клітини накопичують у 2–4 рази більше гіалуронової кислоти і виявляють зменшену здатність деградувати екзогенну ³H-ГК, ніж ГМК кроликів з нормальною ліпідемією. Так само фібробласти шкіри гомозиготних пацієнтів зі спадковою гіперліпідемією (зумовленою дефіцитом рецепторів ЛНЩ у клітинах) накопичують у кілька разів більше гіалуронової кислоти, ніж клітини здорових осіб [48].

Дослідження на культурі ГМК аорти людей показали, що в період старіння цих клітин підвищується синтез гіалуронової кислоти й активність ферментів її синтезу, а також попередника синтетичних ензимів. При цьому більш старі клітини виявляли вищу швидкість міграції, і ця міграція модулювалася гіалуроновою кислотою через CD44-ERK1/2-медийований шлях передачі сигналу [58]. Через RHAMM і CD44-рецепторний сигнальний шлях гіалуронова кислота медіює також ангіогенез, який відіграє важливу роль не тільки в загоєнні поранених тканин, але і в механізмі розвитку проліферативної діабетичної ретинопатії та атеросклеротичних уражень судин [50]. Відомо, що при цукровому діабеті підвищується ризик атеросклеротичних уражень судин. Як показали експерименти на свинях, при експериментальній гіперліпідемії та діабеті в зрізах коронарних судин тварин підвищується вміст гіалуронової кислоти, біглікану і apoB та знижується вміст еластину [36].

Цікаво, що гіалуронова кислота накопичується навкруги ГМК в атеросклеротичних ураженнях судин при діабеті. Встанов-

лено, що її концентрація в сироватці крові хворих на діабет ($86,6 \text{ нг/мл} \pm 5,6 \text{ нг/мл}$) є достовірно вищою, ніж у здорових людей ($41,7 \text{ нг/мл} \pm 12 \text{ нг/мл}$) [39]. У хворих на діабет I типу, схильних до розвитку атеросклерозу, підвищується вміст С-реактивного білка, гіалуринової кислоти та гіалуронідази в крові, а також збільшується товщина інтими-медії каротидних судин, причому останній показник корелює з концентрацією гіалуринової кислоти в плазмі крові [41]. Гіалуринова кислота здатна формувати комплекси з ЛНЩ, які інкорпуються макрофагами, що індукують їхню трансформацію у пінисті клітини. Це показано в досліджах на кроликах, у яких викликали аліментарну гіперхолестеринемію і вводили підшкірно гіалуринову кислоту. При цьому захоплена макрофагами остання окиснювалася через CD204 [49].

ГАГ артерій зазнають композиційних і структурних змін у період розвитку атеросклерозу. Ці зміни досліджували в експериментах на кроликах, яких протягом 8 тиж утримували на гіперхолестеринемічній чи ацидозогенній дієті або на комбінованому раціоні (гіперхолестеринемічний сумісно з ацидозогенним). При цьому підвищення загального вмісту ГАГ у аорті спостерігали лише у тварин, що вживали комбінований раціон. Цікаво, що ГАГ, екстраговані з аорти кроликів з гіперхолестеринемією, виявляли меншу здатність взаємодіяти з ЛНЩ, ніж у контролі. Разом з тим ГАГ з аорти тварин, утримуваних на комбінованому раціоні, не виявляли таких змін. Молекулярна маса ГАГ тварин з гіперхолестеринемією (але не тварин на комбінованому раціоні) була нижчою, ніж у контролі. Автори роблять висновки, що ацидоз сам по собі не впливає на склад ГАГ та на їхню взаємодію з ЛНЩ, але при комбінації атерогенних умов, зокрема при хронічній нирковій недостатності, може змінювати концентрацію ГАГ і розміри ланцюгів гліканів [56].

Як було вказано вище, накопичення в

стінці судин і взаємодія імунних клітин, включаючи Т-клітини і моноцити/макрофаги відіграє важливу роль у патогенезі атеросклерозу, особливо інкорпорація ЛНЩ моноцитами/макрофагами. Прямі дослідження з міченими ^{125}I окисненими ЛНЩ показали, що низькомолекулярна ($6,9 \text{ кДа}$) гіалуринова кислота підвищує в моноцитах експресію прибирального ('scavenger') рецептора CD36, інкорпорацію ними мічених окЛНЩ та трансендотеліальну міграцію цих клітин, що сприяє їхній трансформації у пінисті клітини. Цей процес здійснюється через протеїнкіназний шлях, і в ньому відіграє важливу роль головний рецептор гіалуринової кислоти CD44 [52]. На думку авторів, цей процес має велике значення у розвитку запалення та формуванні атеросклеротичних бляшок за допомогою міграції моноцитів та їхнього диференціювання в пінисті макрофаги. Автори підкреслюють саме роль низькомолекулярної гіалуринової кислоти, бо існує уявлення, що високомолекулярна не чинить атерогенної дії.

Сучасні дослідження показують, що в патогенезі атеросклерозу важливу роль відіграють цитокіни та хемокіни, які медіюють запальні та імунні реакції [8, 12, 13]. У цьому відношенні цікавий ІЛ-15, який, як відомо, активує проліферацію Т-клітин і стимульованих мононуклеарів [13]. Дослідження, виконані на ductus arteriosus (у якому формування неоінтимальної подушки нагадує процеси, що відбуваються в судинах при атеросклерозі) показали, що ІЛ-15 гальмує медіовану фактором росту з тромбоцитів-ВВ проліферацію ГМК, але не впливає на їхню міграцію. Разом з тим він дозозалежно пригнічує індуковану простагландином E1 продукцію гіалуринової кислоти, яка є могутнім стимулятором формування неоінтими. З цього випливає, що ІЛ-15 може бути перспективним для гальмування продукції гіалуринової кислоти та формування неоінтими при атеросклерозі [30]. Роль вазодилататорних простагландинів у

регуляції синтезу гіалуронової кислоти та формуванні екстрацелюлярного матрикса, який є основою для утворення атеросклеротичних бляшок у судинах показують також інші дослідження [26].

Значення різних ГАГ у патогенезі атеросклерозу неоднозначні. Установлено, що гепарин інгібує проліферацію та міграцію ГМК як у клітинній культурі, так і в експериментах на тваринах [40]. Методом гібридизації ізольовані й охарактеризовані ріст-арештувальні гени, що індуються в ГМК, підданих дії гепарину [22]. Показано, що серед них *CCN5* є специфічним ріст-арештувальним геном, який інгібує проліферацію, рухливість та інвазивність ГМК, але не впливає на їхню адгезію та апоптоз [32].

Установлено також, що протеоглікани беруть участь у транспорті ліпопротеїнів. З'ясовано, що дефективне зв'язування гепарин-сульфатних протеогліканів з ароЕ підвищує ризик атеросклерозу в зв'язку з неефективним кліренсом залишків ліпопротеїнів печінкою [34]. Однак протеоглікани екстрацелюлярного матриксу інтими артерій можуть сприяти порушенню зворотного транспорту холестерину і його накопиченню в судинній стінці в період атерогенезу. Подібна дія цих протеогліканів може бути пов'язана з їхнім активувальним впливом на триптазу – серинову протеазу, що звільнюється при дегрануляції тучних клітин і є необхідною для стабілізації ГАГ. Цей фермент викликає деградацію аполіпопротеїнів ліпопротеїну високої щільності 3 і порушує його здатність вивільняти холестерин з культивованих макрофагальних пінистих клітин [33]. У попередженні та гальмуванні розвитку атеросклерозу велику роль відіграє кліренс залишкових атерогенних ЛНЩ. Критичною молекулою в цьому процесі є ароЕ, який медіює високоафінне зв'язування залишкових ліпопротеїнів з членами родини рецепторів ЛНЩ (рЛНЩ), а також з

гепаран-сульфатними протеогліканами клітинної поверхні, які відіграють як кооперативну, так і незалежну роль у кліренсі залишкових ліпопротеїнів. При дефективному кліренсі ЛНЩ у мишей з дефіцитом адапторного білка, що контролює інтерналізацію рЛНЩ, виникає автосомно-рецесивна гіперхолестеринемія, але кліренс залишкових ліпопротеїнів при цьому не сильно порушений. Можливо, в цьому разі засвоєння залишкових ліпопротеїнів гепатоцитами забезпечують гепаран-сульфатні протеоглікани [37].

Важливу гідродинамічну та захисну роль (проти запальних та інших пошкодженнях судин) відіграє шар глікокаліксу люмінальної поверхні ендотеліоцитів, побудований з ГАГ (головними з них є гіалуронова кислота і гепаран-сульфат). У фізіологічних умовах цей шар є товщиною 0,5–0,6 мкм і має велике значення у процесах транспорту та засвоєння ліпопротеїнів. Він легко порушується при змінах току крові, запальних та інших пошкодженнях судин, що сприяє розвитку атеросклерозу [42, 44, 60]. Зокрема, обстеження здорових волонтерів показало, що товщина глікокалікса в мікросудинах після внутрішньовенного введення ендотоксину зменшується від $0,60 \pm 0,1$ до $0,30 \text{ мкм} \pm 0,1$ мкм, а вміст головного компоненту глікокалікса гіалуронової кислоти в крові підвищується від 62 ± 18 до $85 \text{ нг/мл} \pm 24$ нг/мл. При цьому спостерігається також активація моноцитів і підвищення коагуляційної активності. Характерно, що всі ці порушення згладжуються під впливом пригнічення важливого медіатора запалення ФНП- α етанерцептом [42].

Роль ГАГ у патогенезі атеросклерозу може визначатись і тим, що вони беруть участь у агрегації тромбоцитів і згортанні крові [25], а також у процесах адгезії Т-лімфоцитів до екстрацелюлярного матриксу [16]. Добре відома антикоагулянтна та антитромботична дія гепарину, який скла-

дається з сульфатованих залишків D-глюкозаміну і D-глюкуронової кислоти (різні фракції гепарину мають різну довжину полімерного ланцюга та різну молекулярну масу – від 2 до 50 кДа). В останні роки особливу увагу дослідників привертають низькомолекулярні деривати гепарину (4–5 кДа), які одержують деполімеризацією гетерогенного гепарину [10, 11, 20, 21, 23, 59]. На відміну від гетерополімерного гепарину, вони мають більшу біодоступність і антитромботичну дію, але виявляють меншу антикоагулянтну активність, що зменшує небезпеку геморагічних ускладнень при їхньому клінічному застосуванні.

Установлено, що низькомолекулярні гепарини мають виразну антиатерогенну дію і можуть застосовуватися для попередження та лікування тромбозу, ішемічних нападів та інфарктів міокарда [20, 21, 23, 59]. У механізмі антиатерогенної дії гепаринів, крім інгібіції проліферації і міграції ГМК, яка була відзначена вище, певну роль відіграють гальмування ними пероксидації ліпідів і протизапальні ефекти [20, 21]. Показано, зокрема, що гепарин гальмує продукцію хемокінів, індуовану інтерфероном- γ , і трансендотеліальну міграцію Т-лімфоцитів [46]. Він сприяє вивільненню антиоксидантного фермента супероксиддисмутази (СОД), активність якого знижена у хворих на атеросклероз коронарних артерій [53]. Цей фермент продукується ГМК і гальмує продукцію перекису водню та реактивних форм кисню, які сприяють пероксидації ліпідів. Крім того, СОД пригнічує продукцію фактора росту, подібного до фактора росту епідермісу, який активує проліферацію ГМК і розвиток атеросклерозу [43]. Показано також, що кофактор ІІ гепарину інгібує тромбін і чинить антиатерогенну дію [55], а в мишей, дефіцитних за цим фактором, прискорено формування неоінтими та розвиток атеросклерозу [57]. Характерно,

що антиатерогенну дію виявляє також глюकोзамін, який є важливою складовою молекули гепарину [24].

Позитивна дія гепарину при атеросклерозі може бути пов'язана також з його впливом на макрофаги. Відомо, що останні в середині атеросклеротичних уражень судин експресують ендотеліальну ліпазу. Дослідження *in vitro* на ТНР-1 макрофагах показало, що супресія функції названого ферменту зменшує виток холестерину з макрофагів (медійований ароАІ), а його активація – підвищує. Характерно, що виток холестерину з макрофагів зменшується також під впливом гепарину [45].

Таким чином, ГАГ як складова протеогліканів, відіграють важливу роль у патогенезі атеросклерозу. Вони регулюють проліферацію, міграцію та адгезію ГМК, впливаючи на продукцію пептидних факторів росту та сигнальні механізми їхньої дії, а також на молекули клітинної поверхні. Немеш важливим є вплив ГАГ на ліпідний метаболізм, пероксидацію ліпідів і транспорт ліпопротеїнів. Через систему цитокінів вони регулюють перебіг запального та імунного процесів, активність моноцитів/макрофагів і лімфоїдних клітин, істотно впливають на активність тромбоцитів і процеси згортання крові.

Разом з тим більшість публікацій присвячена місцевому значенню ГАГ у судинах. Бракує досліджень метаболізму ГАГ та їхнього синтезу за допомогою радіонуклідного методу. Дуже мало праць присвячено системній ролі ГАГ. Відсутні дослідження стосовно зв'язку метаболізму ГАГ у серцево-судинній системі та звапнених тканинах кісток і зубів.

Проведені нами радіонуклідні дослідження показали, що при експериментальному атеросклерозі (викликаному атерогенною дієтою) у щурів достовірно підвищується включення міченого ^{35}S -сульфату, а, отже, синтез сірковмісних ГАГ у тканинах аорти, серця, печінки, ни-

рок, слинних залоз, а також у зв'язаних тканинах кісток і зубів [5, 6]. Тобто ці порушення метаболізму ГАГ при експериментальному атеросклерозі носять системний характер. Загальні порушення обміну ГАГ протилежної спрямованості (пригнічення синтезу) виявлені нами як у зв'язаних тканинах, так і в багатьох внутрішніх органах при експериментальному флюорозі [3]. Системні порушення обміну ГАГ виявили в своїх дослідженнях також Березовський і співавт. [1] при тривалій гіпоксії та аліментарній депривації. Як і в наших дослідженнях, автори спостерігали також виразні зміни в кістковій тканині щурів, де ГАГ відіграють важливу роль у процесах мінералізації і ремоделювання [14]. Слід зазначити, що успішна експериментальна терапія атеросклерозу супроводжується нормалізацією обміну ГАГ не тільки у тканинах серця й аорти, а також в інших внутрішніх органах і зв'язаних тканинах [5, 6]. Так само експериментальна профілактика і терапія флюорозу не лише попереджує чи усуває грубі порушення з боку зубів, але й нормалізує синтез ГАГ у зв'язаних тканинах і внутрішніх органах [3].

**О.И. Сукманский, М.С. Дрогомирецкая,
О.В.Деньга, И.О. Сукманский**

РОЛЬ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

В обзоре рассмотрена роль гликозаминогликанов и протеогликанов в патогенезе атеросклероза, а также возможности коррекции атеросклеротических поражений сосудов путем влияния на их метаболизм.

Ключевые слова: гликозаминогликаны, протеогликаны, атеросклероз, стенка артерий.

**O.I. Sukmansky, M.S. Drogomiretska,
O.V. Den'ga, I.O. Sukmansky**

THE GLYCOSAMINOGLYCANS ROLE IN PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS

In this review we summarize the role of glycosaminoglycans and proteoglycans in pathogenesis of atherosclerosis and possibilities for correction of lesions of atherosclerotic vessels

via influence on their metabolism.

Key words: glycosaminoglycans, proteoglycans, atherosclerosis, arterial wall.

*Odesa State Agrarian University;
P.L.Shupik National Medical Academy of Post-graduate
Education, Kyiv;
Institute of Stomatology AMS of Ukraine, Odesa*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовський В.Я., Літовка І.Г., Костюченко О.С. Фізіологічна регенерація кісткової тканини за умов дозованої нормобаричної гіпоксії // Фізіол. журн. – 2007. – 57, №6. – С.40–45.
2. Бойко Е. Р., Канева А.М. Апопротен Е и его значение в клинической физиологии// Успехи физиол. наук. – 2009. – 40, № 1. – С.3–15.
3. Гороховский В.Н., Подорожная Р.П., Сукманский О.И., Деньга О.В., Кнава О.Э., Макаренко О.А. Нарушения синтеза гликозаминогликанов при экспериментальном флюорозе и пути их коррекции// Рос. стоматол. журн. – 2008, № 1. –С.11–13.
4. Дильман В.М. Старение, климакс и рак. – Л., 1968. – 130 с.
5. Дрогомирецкая М.С., Сукманский О.И., Деньга О.В., Макаренко О.А., Подорожная Р.П., Кнава О.Э. Обмен гликозаминогликанов (ГАГ) в тканях полости рта и некоторых внутренних органах при экспериментальном атеросклерозе и его лечении на фоне ортодонтического вмешательства//Вісн. стоматології. – 2007. – №3. – С.11–16.
6. Дрогомирецкая М.С., Сукманский О.И., Деньга О.В., Подорожная Р.П., Кнава О.Э. Обмен серосодержащих соединений при экспериментальном атеросклерозе//III Міжнар. наук. конф. "Гомеостаз, фізіологія, патологія, фармакологія і клініка": Тези доп., Одеса, 2007. – С.39–40.
7. Євдокімова Н.Ю. Гіалурунова кислота, рецептор CD44 та їхня роль в ускладненнях цукрового діабету//Укр.біохім. журн. – 2008. – 80, № 5. – С.5–44.
8. Красникова Т.Л., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б. Хемокины, рецепторы хемокинов и атерогенез// Успехи соврем. биологии. – 2003. – 123, №5. – С.506–514.
9. Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н. Атерогенез как иммуно-воспалительный процесс// Вестн. РАМН. – 2004. – № 7. – С.3–11.
10. Сидоренко Б.А., Заикина Н.В., Преображенский Д.В. Эноксапарин и другие низкомолекулярные гепарины в кардиологии//Кардиология. – 1998. – №10. – С.82–90.
11. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В. Низкомолекулярные гепарины: возможность применения// Там же. – 1995. – №10. – С.86–91.
12. Стойка Р.С., Фильченков А.А., Залесский В.Н. Цитокины и клетки-мишени в регуляторной системе атерогенеза//Успехи соврем. биологии. – 2003. – 123,

- №1. – С.82–97.
13. Сукманський О.І. Цитокіни – нова система біорегуляторів // Вісн. стоматології. – 2005. – №3. – С.69–74.
 14. Сукманський О.І., Горохівський В.Н. Глікозаміноглікани (ГАГ) і кісткова тканина // Там само. – 2009. – № 3. – С.113–118.
 15. Цурко В.В., Леоненко І.В., Егоров І.В., Красносельский М.Я. Роль медиаторных механизмов в иммунопатогенезе воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях и остеопорозе // Терап. архив. – 2009. – **81**, № 6. – С. – 92–96.
 16. Allain F., Vanpouille C., Carpentier M. Slomianny M.C., Durieux S., Spik G. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T-lymphocytes to extracellular matrix // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**, №5. – P.2714–2719.
 17. Bot P.T., Hoefler I.E., Piek J.J., Pasterkamp G. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis // Curr. Med. Chem. – 2008. – **5**. – №8. – P.786–791.
 18. Chai S., Chai Q., Danielsen C.C., Hjorth P., Nyengaard J.R., Ledet T., Yamaguchi Y., Rasmussen L.M., Wogensen L. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis // Circulat. Res. – 2005. – **96**. – № 5. – P.583–591.
 19. Dadlani H., Ballinger M.L., Osman N., Getachew R., Little P.J. Smad and p38 MAP kinase-mediated signaling of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**. – № 12. – P.7844–7852.
 20. Deepa P. R., Varalakshmi P. Atheroprotective effect of exogenous heparin-derivative treatment on the aortic disturbances and lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic diet fed rats // Clin. Chim. Acta. – 2005. – **355**, №1–2. – P.119–130.
 21. Deepa P.R., Varalakshmi P. Favourable modulation of the inflammatory changes in hypercholesterolemic atherogenesis by a low-molecular-weight heparin derivative // Int. J. Cardiol. – 2006. – **106**, №3. – P.338–347.
 22. Delmolino L.M., Stearns N.A., Castellot Jr. J.J. COP-1, a member of the CCN family, is a heparin-induced growth arrest specific gene in vascular smooth muscle cells // J. Cell Physiol. – 2001. – **188**, № 1. – P.45–55.
 23. De Lorenzo F., Dotsenko O., Kakkar Y.Y. Low molecular weight heparins in cardiovascular medicine // Minerva Cardioangiol. – 2005. – **53**, № 6. – P.585–603.
 24. Duan Y., Paka L., Pillarisetti S. Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis // Cardiovasc. Diabetol. – 2005. – **4**. – P. 16.
 25. Elhadj S., Mousa S.A., Forsten-Williams K. Chronic pulsatile shear stress impact synthesis of proteoglycans by endothelial cells effect on platelet aggregation and coagulation // J. Cell Biochem. – 2002. – **86**, №2. – P.239–250.
 26. Fischer J. W., Schrüfer K. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis // Throm. Haemost. – 2007. – **98**, №2. – P.287–295.
 27. Goulffic Y., Guilluy C., Guirin P., Patra P., Pasaud P., Loirand G. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation // Cardiovasc. Res. – 2006. – **72**, №2. – P.339–348.
 28. Hamati H.F., Britton E.L., Carey D.J. Inhibition of proteoglycan synthesis alters extracellular matrix deposition, proliferation, and cytoskeletal organization of rat aortic smooth muscle cells in culture // J. Cell Biol. – 1989. – **108**, №6. – P.2495–2505.
 29. Herrero-Beaumont G., Marcos M.E., Sónchez-Pernaute O., Granados R., Ortega L., Montell E., Vergés J., Egido J. Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis // Brit. J. Pharmacol. – 2008. – **154**, №4. – P.843–851.
 30. Iwasaki S., Minamisawa S., Yokoyama U., Akaike T., Quan H., Nagashima Y., Nishimaki S., Ishikawa Y. Interleukin-15 inhibits smooth muscle cell proliferation and hyaluronan production in rat ductus arteriosus // Pediatr. Res. – 2007. – **62**, №4. – P.392–398.
 31. Kumar v., Cotran R.S., Robbins S.L. Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia, London, Toronto etc.: W.B. Saunders Company, 2003. – 873 p.
 32. Lake A.C., Bialik A., Walsh K., Castellot J.J. CCN5 is a growth arrest-specific gene that regulates smooth muscle cell proliferation and motility // Amer. J. Pathol. – 2003. – **162**, №1. – P.219–231.
 33. Lee M., Sommerhoff C.P., von Eckardstein A., Zettl F., Fritz H., Kovanen P.T. Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2002. – **22**, № 12. – P.2086–2091.
 34. Libeu C.P., Lund-Katz S., Phillips M.C., Wehrli S., Hernaiz M.J., Capila I., Linhardt R.J., Raffai R.L., Newhouse Y.M. New insights into the heparan sulfate proteoglycan-binding activity of apolipoprotein E // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, №42. – P.39138–39144.
 35. Little. P.J., Ballinger M.L., Burch M.L., Osman N. Biosynthesis of natural and hyperelongated chondroitin sulfate glycoaminoglycans: new insights into an elusive process // Open Biochem. J. – 2008. – **2**. – P.135–142.
 36. McDonald T.O., Gerrity R.G., Jen C., Chen H.J., Wark K., Wight T.N., Chait A., O'Brien K.D. Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis // J. Histochem. Cytochem. – 2007. – **55**, №11. – P.1149–1157.
 37. Mahley R.W., Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing // J. Clin. Invest. – 2007. – **117**, №1. – P.94–98, 153–174.
 38. Marks D.B. Biochemistry. 2nd ed. Philadelphia, Baltimore, Hong Kong, London etc.: Harwal Publishing, 1994. – 337 p.
 39. Mine S., Okada Y., Kawahara C., Tabata T., Tanaka Y. Serum hyaluronan concentration as a marker of angi-

- opathy in patients with diabetes mellitus// *Endocr. J.* – 2006. – **53**, №6. – P.761–766.
40. Mishra-Gorur K., Delmolino L.M., Castellot Jr. J.J. Biological function of heparan sulfate and heparan sulfate proteoglycans//*Trends Glycosci. Glycotechnol.* – 1998. – **10**. – P.193–210.
 41. Nieuwdorp M., Holleman F., de Groot E., Vink H., Gort J., Kontush A., Chapman M.J., Hutten B.A. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis//*Diabetologia.* – 2007. – **50**, №6. – P.1288–1293.
 42. Nieuwdorp M., Meuwese M.C., Mooij H.L. van Lieshout M.H., Hayden A., Levi M., Meiers J.C., Ince C., Kastelein J.J. Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation//*Atherosclerosis.* – 2009. – **202**, №1. – P.296–303.
 43. Nishimura M., Ookawara T., Eguchi H., Fujiwara N., Yoshihara D., Yasuda D., Mimura O., Suzuki K. Inhibition of gene expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor by extracellular superoxide dismutase in rat aortic smooth muscle cells//*Free Radic. Res.* – 2006. – **40**, №6. – P.589–595.
 44. Potter D.R., Damiano E.R. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro//*Circulat. Res.* – 2008. – **102**, №7. – P.747–748.
 45. Qui G., Hill J.S. Endothelial lipase promotes apolipoprotein AI-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophages//*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – **29**, №1. – P.84–91.
 46. Ranjbaran H., Wang Y., Manes T.D., Yakimov A.O., Akhtar S., Kluger M.S., Pober J.S., Tellides G. Heparin displaces interferon-gamma-inducible chemokines (IP-10, I-TAC, and Mig) sequestered in the vasculature and inhibits the transendothelial migration and arterial recruitment of T cells//*Circulation.* – 2006. – **114**, №12. – P.1293–1300.
 47. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease// *N. Engl. J. Med.* – 1999. – **340**. – P.115–126.
 48. Sakr S.W., Potter-Perigo S., Kinsella M.G., Johnson P.Y., Braun K.R., Goueffic Y., Rosenfeld M.E., Wight T.N. Hyaluronan accumulation is elevated in cultures of low density lipoprotein receptor-deficient cells and is altered by manipulation of cell cholesterol content// *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**, №52. – P.36195–36204.
 49. Seike M., Ikeda M., Matsumoto M., Hamada R., Takeya M., Kodama H. Hyaluronan forms complexes with low density lipoprotein while also inducing foam cell infiltration in the dermis// *J. Dermatol. Sci.* – 2006. – **41**, №3. – P.197–204.
 50. Slevin M., Krupinski J., Gaffney J., Matou S., West D., Delisser H., Savani R.C, Kumar S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways// *Matrix Biol.* – 2007. – **26**, № 1. – P.58–68.
 51. Stoll G., Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization//*Stroke.* – 2006. – **37**, №7. – P.1923–1932.
 52. Tabata T., Mine S., Okada Y., Tanaka Y. Low molecular weight hyaluronan increases the uptaking of oxidized LDL into monocytes// *Endocr. J.* – 2007. – **54**, №5. – P.685–693.
 53. Tasaki H., Yamashita K., Tsutsui M., Kamezaki F., Kubara T., Tanaka S., Sasaguri Y., Adachi T., Nakashima Y. Heparin-released extracellular superoxide dismutase is reduced in patients with coronary artery atherosclerosis// *Atherosclerosis.* – 2006. – **187**, №1. – P.131–138.
 54. Theocharis A.D., Tsolakis I., Tzanakakis G.N., Karamanos N.K. Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression// *Adv. Pharmacol.* – 2006. – **53**. – P.281–295.
 55. Tollefsen D.M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – **27**, №3. – P.454–460.
 56. Tovar A.M., Peely I.M., Rangel E.P., Melo-Filho N.M., Mourro P.A., Leite M. Jr. Experimentally induced metabolic acidosis in rabbits modulates the interaction of aortic glycosaminoglycan with plasma low-density lipoprotein – an interesting observation about the association of acidosis and atherosclerosis// *Atherosclerosis.* – 2007. – **192**, № 1. – P.33–39.
 57. Vicente C.P., He L., Tollefsen D.M. Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II deficient mice//*Blood.* – 2007. – **110**, №13. – P.4261–4267.
 58. Vigetti D., Viola M., Karousou E., Rizzi M., Moretto P., Genasetti A., Clerici M., Hascall V.C., De Luca G., Passi A. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging//*J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**, № 7. – P.4448–4458.
 59. Wong K.S., Chen C., Ng P.W., Tsoi T.H., Li H.L., Fong W.C. Low-molecular-weight heparin compared with aspirin for the treatment of acute ischaemic stroke in Asian patients with large artery occlusive disease: a randomized study//*Lancet Neurol.* – 2007. – **6**, №5. – P.407–413.
 60. Yao Y., Rabodzey A., Dewey C.F. Jr. Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress// *Amer. J. Physiol., Heart Circ.Physiol.* – 2007. – **293**. – №2. – P.H1023–1030.
 61. Zhao L., Lee E., Zukas A.M., Middleton M.K., Kinder M., Acharya P.S., Hall J.A., Rader D.J., Purii E. CD44 expressed on both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells promotes atherogenesis in ApoE-deficient mice// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – **28**. – №7. – P.1283–1289.

Одес. держ. аграр. ун-т;

Нац. мед. акад. післядиплом. освіти ім. П.Л.Шурика, Київ;
 Ін-т стоматології АМН України, Одеса

Матеріал надійшов до
 редакції 11.02.2010

Neutrophil apoptosis and hypoxia

Neutrophils are the most abundant population of leukocytes, which constitute the defense against pathogens. Released by neutrophils the proteolytic enzymes and reactive oxygen species help in eliminating infections, but also cause extensive tissue damage. Neutrophil apoptosis plays an essential role in cell homeostasis and resolution of inflammation. It is mediated by a complex network of intracellular apoptotic/survival signaling pathways and can be modulated by a variety of extracellular stimuli such as hypoxia. Here, we review recent studies on the mechanisms of neutrophil death and survival accentuating on neutrophil apoptosis under hypoxic conditions. Neutrophils possess components of both extrinsic and intrinsic apoptotic routes. However, in neutrophils this mechanism has special features. The involvement of death receptors, caspases, mitochondria, and Bcl-2 proteins are discussed. Both the transcription factor NF- κ B and p38MAPK regulate the neutrophil apoptotic program. Despite that reactive oxygen species (ROS) can directly promote and/or adjust apoptosis, there is no consensus about the role of ROS on neutrophil lifespan. Thus both the type of ROS involved and the site of their generation may be important for neutrophil apoptosis. Finally, hypoxia can activate several signaling pathways. The possible differences between the effects of sustained and intermittent hypoxia are also addressed.

Key words: neutrophils, apoptosis, hypoxia.

TAKE-HOME MESSAGES

Neutrophil apoptosis is a central process for homeostasis and successful resolution of inflammation, but in neutrophils it has special features because neutrophils are committed to cell death.

Similar to other cells neutrophil apoptosis possesses components of extrinsic death receptor and intrinsic mitochondrial apoptotic pathways in which NF- κ B and p38MAPK controlled proteins such as Bcl-2 family members and caspases are involved.

ROS generation is involved in neutrophil apoptosis of activated or infected cells but is not absolutely required as a mediator of neutrophil apoptosis under physiological conditions.

In contrast to other cells, in which hypoxia induces apoptosis, in neutrophils hypoxia causes a profound inhibition of apoptosis both in vitro and in vivo. The survival effect of intermittent hypoxia was much more prominent than sustained hypoxia.

AN OVERVIEW OF NEUTROPHIL APOPTOSIS

Neutrophils are the most common type of leukocytes in the circulation which constitute the first line of defense against pathogens. They are bone marrow derived, terminally differentiated, short lived (8-20 hrs) inflammatory cells that are released to the circulation continuously. Senescent neutrophils are cleared from the blood by liver, spleen and bone marrow in direct contact with flowing blood [1]. Neutrophils can exist in the circulation in one of three functional states: quiescent, primed or activated [2]. When quiescent neutrophils encounter a stimulus they are left in a primed state. Upon encountering a second stimulus, they proceed to activation, releasing reactive oxygen species (ROS), proteolytic enzymes and inflammatory mediators, which are implicated in clearance of infections [2]. However, an uncontrolled release of formi-

dable array of toxic substances may inflict damage to surrounding tissues and propagate inflammation. Neutrophil apoptosis (NA) is a fundamental mechanism involved in maintaining a normal level of neutrophils and ensuring the rapid resolution of inflammation [3, 4]. NA triggers the phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages and is vital for limiting of tissue damage in vivo [3]. If neutrophil viability is prolonged, destruction of surrounding cells will take place. When this process, is initiated in the vasculature it is implicated in cardiovascular diseases. Importantly, mature neutrophils can undergo apoptosis even without requiring any apparent inductive stimuli. It suggests that the apoptotic program may already have been initiated in circulating neutrophils [5].

NA is mediated by a complex network of intracellular death/survival signaling pathways and can be modulated by a variety of extracellular stimuli such as cytokines and hypoxia. NA can be initiated by the death receptor (extrinsic) pathway and the mitochondrial (intrinsic) pathway. The last one may play a pivotal role in the control of spontaneous NA [6, 7]. The caspase cascade represents the main mechanism which is activated by both pathways. Caspases are synthesized as inactive zymogens and are activated by proteolysis, leading to enzyme cleavage and nuclear DNA fragmentation. Caspase-8 is the initiator caspase triggered by death receptors, whereas initiator caspase-9 cleavage is the signature of the mitochondrial pathway. Caspase-3, an effector caspase, is activated by the caspases-8 and -9 [8]. Figure 1 illustrates the sequence of events of NA. The data describing NA pathways are summarized in a number of recent reviews [3–6, 9, 10].

THE DEATH RECEPTOR PATHWAY

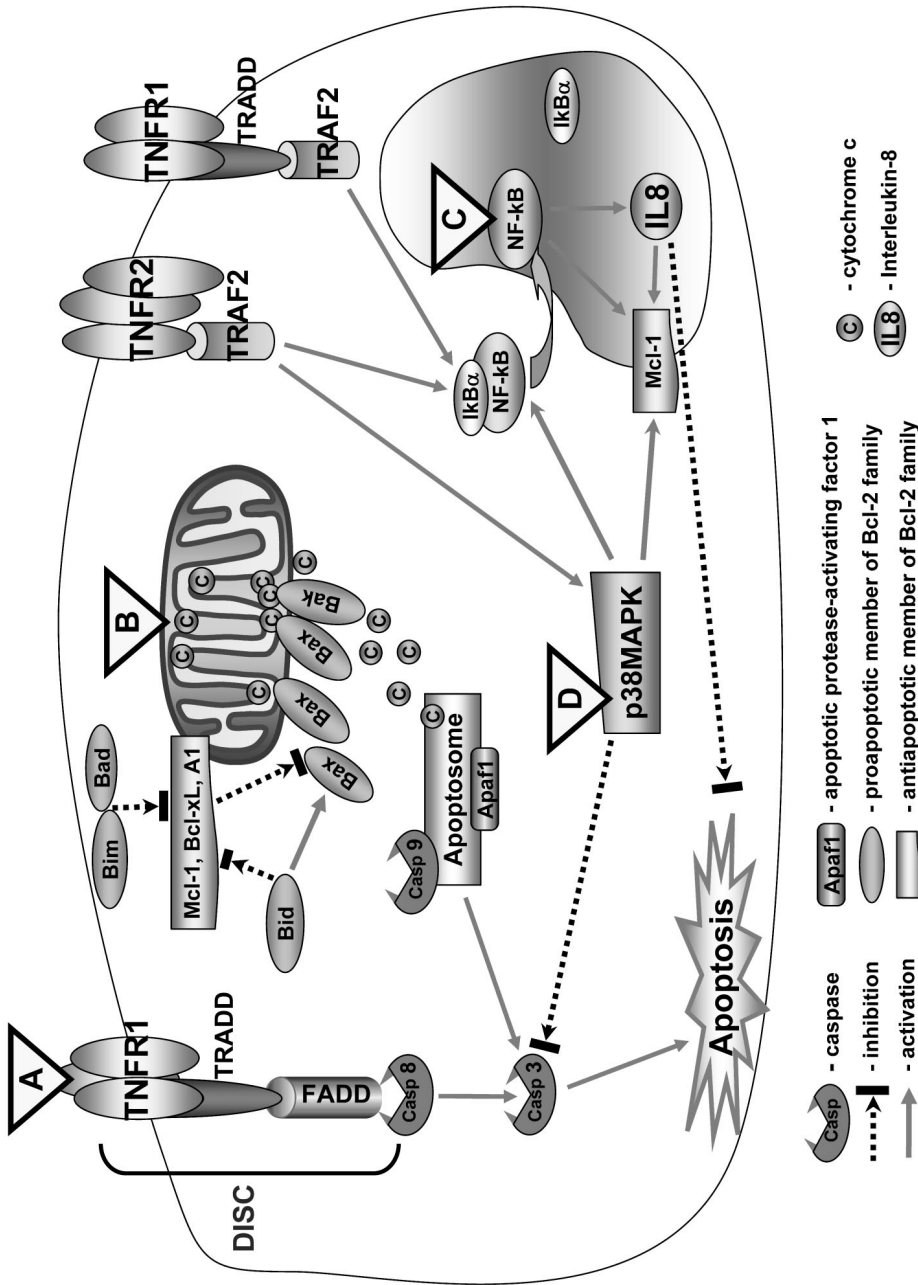
In the extrinsic pathway, ligation of a death receptor such as tumor necrotic factor receptor 1 (TNFR1) or CD95 induces the formation of a death-inducing signaling complex (DISC). DISC consists of the death receptor, TNF receptor associated death domain-con-

taining proteins (TRADD), Fas-associated death domain (FADD) adaptor protein, and an initial caspases (A in Fig.1). Clustering of death receptors following ligation promotes aggregation of pro-caspase-8 molecules within the DISC, inducing their autoproteolysis and generation of active caspase-8, which activates the downstream caspase-3, that are the terminal effectors of apoptosis [5, 6, 9]. Importantly, in human neutrophils DISC may form spontaneously [5]. TNFR1 signaling is also known to promote neutrophil survival through the nuclear transcription factor (NF- κ B) activation, which can be induced by recruitment of TNF receptor associated factor 2 (TRAF2). In both signals the TRADD may act as a platform adaptor that recruits TRAF2 or FADD and thus activate distinct signaling cascades including activation of NF- κ B-induced survival pathway or caspase-dependent proapoptotic route. In contrast to TNFR1, TNFR2 does not contain a TRADD motif [4, 11] and recruits TRAF2 in NF- κ B activation directly. Additionally, TNFR2 may promote survival by mitogenactivated protein kinases (MAPK) activation.

THE MITOCHONDRIAL PATHWAY

Mitochondria are the site of oxidative phosphorylation in the cells and classically defined as organelles highly specialized in ATP generation [12]. It is now generally assumed that alteration of mitochondrial function is an early feature of NA [4–7]. In viable cells, these organelles are organized as a diffuse tubular network that clusters during apoptosis. Critically, the mitochondrial route of apoptosis connects caspases and Bcl-2 proteins pathways (B in Fig.1).

As is summarized by [4, 6, 9], Bcl-2 is the prototype for a family of mammalian genes and the proteins they produce. They govern mitochondrial outer membrane permeabilization and can be either pro-apoptotic (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad) or anti-apoptotic (Mcl-1, Bcl-X_L, A1/Bfl-1). In most cell types, the ex-



(A) The extrinsic pathway of NA is initiated upon ligation of death receptor TNFR1, which induces formation of a death-inducing signaling complex (DISC) consisting of the death receptor, TNF receptor associated death domain-containing proteins (TRADD), Fas-associated death domain (FADD), and an initiator caspase-8, which activates the terminal effector of apoptosis caspase-3. (B) The intrinsic pathway involves mitochondria. Under normal condition neutrophils express high levels of the pro-apoptotic molecules of Bcl-2 family (Bax, Bak, Bim, Bid and Bad) and low levels of anti-apoptotic members (A1, Bcl-xL, Mcl-1). During apoptosis cytosolic Bax and Bak are translocated into the outer membrane of mitochondria and induced cytochrome c release. In the cytoplasm, cytochrome c complexes with apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) and procaspase-9 to form a protein complex the 'apoptosome', which is involved in caspase-3 activation. (C) Neutrophil survival pathway induced by NF-κB activation. In the cytoplasm NF-κB is held by inhibitory proteins IκBα. The release of IκBα from the NF-κB complex allows active NF-κB translocate into the nucleus. TNFR1 and TNFR2 are involved in NF-κB activation by recruitment of TNF receptor associated factor 2 (TRAF2). NF-κB regulates the synthesis of IL-8 and activates the anti-apoptotic Mcl-1 proteins. (D) Involvement of the p38MAPK in NA. p38MAPK may induce NF-κB activation, activate the anti-apoptotic Mcl-1 proteins and can directly phosphorylate and inhibit caspase-3 activity, thereby hinder NA.

pression and activity of protective Bcl-2 members is higher than pro-apoptotic members. In contrast, mature neutrophils constitutively express pro-apoptotic proteins, whereas the expression of anti-apoptotic Bcl-2 members is very low or undetectable in resting cells [3, 13]. However, anti-apoptotic proteins are highly and transiently expressed when neutrophils are exposed to survival factors, such as heme, IL-8, GM-CSF or hypoxia. The balance between pro- and antiapoptotic members determines the fate of the cells [14]. Under physiological conditions, the mitochondrial membrane is polarized and has a membrane potential, the maintenance of which keeps proteins such as cytochrome c and ROS within the confines of the mitochondria. Proapoptotic Bcl-2 proteins exert their effects by activation of an inner mitochondrial permeability transition pore and by induction of apoptogenic factor cytochrome c release. In the cytosol cytochrome c is involved in the assembly of a multimolecular complex known as "apoptosome", which consists of cytochrome c, apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf 1), and caspase-9 (Fig.1, B). In the presence of ATP this complex induces the proteolytic cleavage and activation of procaspase-3 that triggers a downstream cascade of caspase-3 activity.

Bax is the best known pro-apoptotic soluble protein. In freshly isolated neutrophils Bax is found in the cytoplasm in a phosphorylated closed state, heterodimerized to Mcl-1. Under apoptosis Mcl-1 levels are markedly decreased by proteasome-mediated degradation. Waning levels of Mcl-1 release Bax from the heterocomplex Bax:Mcl-1 and allow Bax to translocate to the mitochondria where it is thought to form oligomers and exercise its pro-apoptotic function [15, 16]. Whereas the activated Bax and Bak would act as ion channels and adaptor proteins and mediate the release of cytochrome c, the anti-apoptotic Bcl-2 would block NA through inhibition of Bax and/or Bak, by promoting the stability of mitochon-

drial outer membrane and/or impairing insertion of pro-apoptotic proteins. Additionally, the second groups of pro-apoptotic proteins Bad and Bid can modulate negatively the anti-apoptotic Bcl-2 proteins and positively the pro-apoptotic ones.

Mcl-1 is represented a key anti-apoptotic protein. It is only member of anti-apoptotic Bcl-2 family that has been reliably and reproducibly measured at both the mRNA and protein level in human neutrophils [17]. It's well documented that spontaneous apoptosis is accompanied by degradation of Mcl-1, but not other anti-apoptotic molecules [18]. Anti-apoptotic Mcl-1 transcripts are extremely unstable (near 3 hours half-life) [19]. Moreover, Mcl-1 is a subject to rapid turnover [20]. Such rapid changes in Mcl-1 function permit neutrophils to switch cell fate very rapidly from survival to death in response to external signals. Importantly, Mcl-1 is up-regulated in response to survival stimuli, thereby having a marked effect on NA [21].

INVOLVEMENT OF NF- κ B AND P38MAPK IN NA

Both the transcription factor NF- κ B [3, 12, 22, 23] and p38MAPK [12, 24, 25] regulate the NA program (C and D in Fig.1).

NF- κ B comprises a family of transcription factors that act as regulators of genes involved in NA and its regulation is highly cell specific and redox sensitive. NF- κ B is normally found in the cytoplasm held by inhibitory proteins called I κ B α and is activated by various stimuli, which converge at the IKK (I κ B kinase) complex. IKK phosphorylates I κ B α leading to its ubiquitination, followed by proteosomal degradation. The release of I κ B α from the NF- κ B complex allows active NF- κ B translocation into the nucleus and bind to consensus sites in the DNA of responsive genes. NF- κ B activity in neutrophils is regulated by mechanisms clearly different from those in other cells. The most important

difference is that the newly synthesized I κ B α can enter the nucleus, remove NF- κ B from gene promoters and transport it back to the cytoplasm. Thus, nuclear accumulation of I κ B α is associated with inhibition of NF- κ B activity and the induction of NA [26, 27]. Using different NF- κ B inhibitors it was shown that inhibition of NF- κ B is a powerful inducer of NA [22], in contrast activators of NF- κ B provides a strong survival signal [23]. NF- κ B controls the expression of survival genes such as the Bcl-2 family members and regulates the synthesis of IL-8 [28], known as one of the most important survival proteins [29]. Anti-IL-8: IL-8 complex suppresses spontaneous NA. The survival effect is correlated with a decline in caspase-3 and caspase-9 activity, increase in anti-apoptotic protein (Bcl-XL) and decreased pro-apoptotic proteins (Bax, Bak) expressions [30].

The p38MAPK activation is part of a general stress response that mediates survival in neutrophils [24, 31]. Given the observation that p38MAPK is implicated in the activation of NF- κ B [32] it is conceivable that this might lead to expression of survival genes of the Bcl-2 family and IL-8. Moreover, p38MAPK can directly phosphorylate and inhibit the activities of caspases-8 and caspase-3 and thereby hinder neutrophil apoptosis [24].

ROS AS INTRACELLULAR MEDIATORS OF NEUTROPHIL APOPTOSIS

During the last decade, ROS molecules (superoxide anion - O $_2^{\cdot-}$, hydrogen peroxide - H $_2$ O $_2$, and the hydroxyl radicals - OH \cdot) moved from a category of merely unwanted side products of oxidative metabolism to important messenger molecules. Among all cell types neutrophil possess the most powerful system of ROS [33]. ROS are generated in cells as a consequence of normal mitochondrial oxidative metabolism and also as part of the respiratory burst, that participate in microbial killing [34]. The mitochondria serve as the pri-

mary source in the quiescent state whereas in activated neutrophils the primary ROS generated by the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPHox) system [6, 7, 35, 36]. The latter is a multi-enzymatic complex responsible for the generation of high amounts of O $_2^{\cdot-}$ – through the reduction of molecular oxygen. In resting neutrophils, about 95% of the inactive NADPHox is found in the membranes of subcellular granules and vesicles, and the rest resides in the plasma membrane or distributed among cytosol. The cell activation results in phosphorylation of NADPHox cytosolic subunit and translocation of the granule pool to plasma or phagosomal membrane. The activation of the granule pool of NADPHox induces intracellular ROS production, while the stimulation of the membranebound oxidase mainly generates extracellular release of ROS. Importantly, intracellular generation, but not extracellular release of ROS, leads to NA [29].

Among the ROS activated molecular targets are the caspases, the phosphoinositol PI3K/Akt pathway molecules and NF- κ B [13]. Moreover, ROS can mediate death receptor clustering [37] and rapidly (during minutes) activate p38MAPK systems [34]. As was discussed by [38], ROS may be involved in NA by various ways as direct oxidation of DNA or/and modification of proteins and enzymes. Additionally, lipid peroxidation by ROS may contribute to membrane rupture, eliciting release of the contents of intracellular compartments [39]. Finally, H $_2$ O $_2$ could be an intermediate in the intracellular signaling mechanism of NA, and its oxidized products, such as OH \cdot (the most toxic of the oxygen intermediates resulting in DNA damage), may be crucial for NA [38].

The functional role of ROS in NA is controversial and the precise signal transduction pathways are not fully understood. However, most reports affirm that ROS directly cause NA [35]. Increased production of H $_2$ O $_2$ was noted in neutrophils cultured for 4 hours

in the absence of any external stimulus [40]. The neutrophil incubation with H_2O_2 resulted in concentration-dependent increase in the rate of NA [41]. Both ionizing and ultraviolet radiation are capable of inducing NA, and both generate ROS. Catalase, which decreases the intracellular H_2O_2 levels in cultured neutrophils, inhibits NA [38, 42] and increases IL-8 expression [36]. Similarly, prolonged survival of neutrophils was detected in patients with chronic granulomatous disease with hereditary defect in ROS production [42], which was associated with enhanced IL-8 levels [43]. In contrast, it was shown that ROS is also associated with activation of survival signaling routes, in which NF- κ B activation could be involved [12]. Critically, the type of ROS molecules involved could be important for NA. For instance, increased intracellular levels of superoxide in neutrophils lead to activation of NF- κ B, whereas exposure of neutrophils to hydrogen peroxide inhibits nuclear translocation of NF- κ B [44]. All these data, however, do not imply that ROS are absolutely required as mediators of NA, especially under physiologic conditions [45] and the apparent contradictory ROS effects on NA could be as a result of the activation status of cells [13]. Thus, several groups have demonstrated that ROS generation does not affect the rate of spontaneous [45, 46] and Fas/APO-1 triggered NA [37] or underlie the pro-apoptotic effect of TNF- α , but promote apoptosis in PMA-activated neutrophils [45]. H_2O_2 does not affect nuclear translocation of NF- κ B in resting cells, but decrease it in LPS or TNF stimulated neutrophils [28, 40]. Moreover, the types of activating stimuli (different cytokines, infection and phagocytosis, PMA or LPS activation and hypoxia) may be crucial for ROS effects on NA. For example, NADPHox-derived intracellular ROS that is generated during phagocytosis induces NA via caspase activation, whereas treatment of the same neutrophils with fMLP results in oxidative burst that is almost entirely extracellular, and

apoptosis in these cells is slightly reduced [39].

Finally, NA could be partially related to the different levels and types of cellular antioxidant defenses. Thus, the toxic potential of ROS can be limited by intracellular powerful antioxidant, such as glutathione [5, 37]. Apparently, changes in redox status are the earliest event in NA. The intracellular antioxidant defenses of neutrophils may rapidly degrade H_2O_2 , thus preventing the formation of by-products such as $HO\cdot$.

HYPOXIA-INDUCED NEUTROPHIL SURVIVAL

Hypoxia, i.e. decreased availability of oxygen occurs under a variety of physiologic and pathologic conditions. Hypoxia activates a number of genes which are important in the cellular adaptation to low oxygen environment. Generally hypoxia induces apoptosis in different cell types. However, in contrast to other cells in neutrophils hypoxia causes a profound concentration-dependent and reversible inhibition of apoptosis in vitro [41, 47]. Also in vivo work [48], demonstrated prolonged neutrophil survival in healthy subjects exposed to acute hypoxemia.

The hypoxic survival effect was associated with marked stabilization of hypoxia-inducible factor (HIF-1) [22, 47], a master regulator of oxygen homeostasis that controls more than 70 target genes including erythropoietin, VEGF, and proteins associated with glucose and energy metabolism [49]. The ability of hypoxia to increase NF- κ B p65 transcript abundance and activity, the ablation of hypoxic survival by the NF- κ B inhibitors (gliotoxin and parthenolide), and the inhibition of hypoxic induction of NF- κ B in HIF-1 α knockout murine neutrophils suggests HIF-1 α -dependent regulation of the NF- κ B pathway in NA [22]. Additionally, it was documented that hypoxia activates p38MAPK, leading to Mcl-1 activation and a subsequent

delay in NA [21]. Similar to many antiapoptotic stimuli, long exposure to hypoxia decreases ROS generation in neutrophils [41]. Interestingly, short hypoxemia in vivo appears to effects the primed state of the neutrophils for ROS production without significant effect on the stimulated/activated state [48].

EFFECTS OF INTERMITTENT HYPOXIA ON NA

While some diseases involve episodes of sustained hypoxia (SH), diseases like vascularized tumors or Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS) are associated with intermittent hypoxic (IH) events. OSAS, in particular, is characterized by intermittent and recurrent pauses in respiration during sleep. The various signaling pathways, caspase-mediated with IH and caspase-independent with SH, were described for PC-12 cells [50]. Moreover, IH leads to HIF-1 α accumulation that persists significantly during re-oxygenation. In contrast HIF-1 α levels in PC-12 cells exposed to SH were markedly reduced immediately after re-oxygenation [49]. It was also showed that in endothelial cells, IH induced a modification in HIF-1 α phosphorylation pattern with progressive increase in HIF-1 α phosphorylated form during hypoxic period, which could lead to cell survival and adaptation to hypoxia [51]. In contrast, Ryan et al. using HeLa cells found that HIF-1 α is more sensitive to activation by SH than IH and that NF- κ B is more sensitive to activation by IH than SH [52]. Using endothelial cell models they also found that IH activates NF- κ B at least in part via p38 MAPK activation [53]. However what kind of response is true for neutrophils is unknown.

We compared the effects of IH and SH on NA using a unique computer-controlled incubation chamber which is attached to an external O₂-CO₂ computer-driven controller (BioSpherix OxyCycler C42 system, Redfield, NY). Chamber O₂, N₂, and CO₂ levels were

continuously monitored and adjusted according to the desired programmed profile. Additionally a fiber-optic dissolved oxygen electrode was immersed below medium level to accomplish identical specific experimental profiles and to monitor dissolved oxygen concentrations. Using several IH cycles (3-6 and 10 cycles) and oxygen profiles ranging from 5 to 0.1% O₂ we established that the effects of IH were dose- and time-dependent. Importantly, NA was already significantly decreased after three cycles of IH at 5% oxygen concentrations as compared with normoxia, indicative of a relatively fast neutrophil activation over a period of 3 hours. Moreover, under all IH conditions NA was significantly lower compared to SH both in whole blood and in purified neutrophil cultures [54]. This trend was seen in each subject individually, but values were slightly higher in purified neutrophils compared with whole blood, due to neutrophil purification. Also in patients with OSAS NA was significantly attenuated [54]. This was verified by flow cytometry, morphological features of apoptosis as nuclear and chromatin condensation and a significant reduction in caspase-3 activity. Critically, the percentage of apoptotic neutrophils was negatively correlated with the severity of hypoxia [54]. Whether SH and IH trigger a common signaling pathway in NA is currently unclear. We found that similar to SH the anti-apoptotic effects of IH are mediated via p38MAPK signaling pathway, since the survival effects of hypoxia are lost with inhibition of p38MAPK (unpublished observations). We also determined that NF- κ B activity is required for IH survival (article in preparation). Thus, treatment of neutrophils with structurally and mechanistically discrete NF- κ B inhibitors gliotoxin, parthenolide, and IMD-0354 under IH resulted in significant increase of NA. Such increased NA was caspase-3 dependent and was accompanied with decreased IL-8 expression. NF- κ B activity was found increase in nuclear fractions of neutrophils

treated with IH in vitro. Similar, IH activates NF- κ B in neutrophils of OSAS patients [55].

Does ROS also mediate IH-induced decrease in NA? Similar to SH [41], we found that cytoplasmatic ROS generation was decreased by 90-92% in neutrophils exposed to IH as compared to neutrophils maintained in normoxia. Interestingly, the same levels of basal ROS production were detected in resting neutrophils of both OSAS patients and control subjects [56]. In contrast, after PMA stimulation significant increases in ROS generation were detected in OSAS patients compared to control [56]. This suggests that IH may induce neutrophil priming for ROS production after challenge, which is critical for the clearance of infections but may be dangerous to surrounding tissues. Onset of apoptosis in neutrophils is much more complex than the simple mechanisms we have presented here and the role of ROS molecules and oxidative stress needs to be further elucidated in NA.

Acknowledgments: We are indebted to Prof. Lena Lavie and to Prof. Peretz Lavie for their encouragement and their fruitful discussions. We are also indebted to Prof. Lena Lavie for here constructive comments and criticism.

Л. Дуговская, А. Поляков

АПОПТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ И ГИПОКСИЯ

В обзоре литературы представлены данные современной литературы о механизмах выживания и гибели нейтрофильных лейкоцитов. Рассматриваются вопросы регуляции активности апоптотической программы для этих клеток и роль в указанных процессах транскрипционных факторов NT- κ B и p38 MAPK. Также дискутируются сегодняшние сведения об участии свободных радикалов в реализации апоптоза нейтрофилов. Особое внимание уделяется анализу роли гипоксии и различиям во влиянии на отдельные звенья апоптоза постоянной и периодической гипоксии. Ключевые слова: нейтрофилы, апоптоз, гипоксия.

Израил. Ин-т технологий, Хайфа

Л. Дуговська, Ф. Поляков

АПОТЕОЗ НЕЙТРОФІЛІВ І ГІПОКСІЯ

В огляді літератури представлені дані сучасної літератури

про механізми виживання і загибелі нейтрофільних лейкоцитів. Розглядаються питання регуляції активності апоптотичної програми цих клітин та роль у зазначених процесах транскрипційних факторів NT- κ B та p38 MAPK. Також дискутуються сьогоденні відомості про участь вільних радикалів у реалізації апоптозу нейтрофілів. Особлива увага приділяється аналізу ролі гіпоксії та відмінностям впливу на окремі ланки апоптозу постійної та періодичної гіпоксії.

Ключові слова: нейтрофіли, апоптоз, гіпоксія.

REFERENCES

1. Akgul C., Moulding D.A., Edwards S.W. Molecular control of neutrophil apoptosis // *FEBS Lett.* – 2001. – **487**, № 3. – P.318–322.
2. Alvarado-Kristensson M., Melander F., Leandersson K., Ronnstrand L., Wernstedt C., Andersson T. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils // *J. Exp. Med.* – 2004. – **199**, № 4. – P.449–458.
3. Arruda M.A., Rossi A.G., de Freitas M.S., Barja-Fidalgo C., Graca-Souza A.V. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB // *J. Immunol.* – 2004. – **173**, № 3. – P.2023–2030.
4. Arruda M.A., Barcellos-de-Souza P., Sampaio A.L., Rossi A.G., Graca-Souza A.V., Barja-Fidalgo C. NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils // *J. Exp. Cell. Res.* – 2006. – **312**, № 19. – P.3939–3948.
5. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – **79**, № 2. – P.303–311.
6. Buttke T.M., Sandstrom P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis // *Immunol. Today.* – 1994. – **15**, № 1. – P.7–10.
7. Castro-Alcaraz S., Miskolci V., Kalasapudi B., Davidson D., Vancurova I. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis // *J. Immunol.* – 2002. – **169**, № 7. – P.3947–3953.
8. Cowburn A.S., Deighton J., Walmsley S.R., Chilvers E.R. The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – **34**, № 6. – P.1733–1743.
9. Dragon S., Saffar A.S., Shan L., Gounni A.S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils // *Mol. Immunol.* – 2008. – **45**, № 1. – P.160–168.
10. Dyugovskaya L., Lavie P., Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxy-

- gen species in leukocytes of sleep apnea patients // *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2002. – **165**, № 7. – P.934–939.
11. Dyugovskaya L., Polyakov A., Lavie P., Lavie L. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea // *Ibid.* – 2008. – **177**, № 5. – P.544–554.
 12. Ear T., Cloutier A., McDonald P.P. Constitutive nuclear expression of the I kappa B kinase complex and its activation in human neutrophils // *J. Immunol.* – 2005. – **175**, № 3. – P.1834–1842.
 13. Edwards S.W., Derouet M., Howse M., Moots R.J. Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1 // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – **32**, № 3. – P.489–492.
 14. Fadeel B., Ahlin A., Henter J.I., Orrenius S., Hampton M.B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species // *Blood.* – 1998. – **92**, № 12. – P.4808–4818.
 15. Fossati G., Moulding D.A., Spiller D.G., Moots R.J., White M.R., Edwards S.W. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis // *J. Immunol.* – 2003. – **170**, № 4. – P.1964–1972.
 16. Frasch S.C., Nick J.A., Fadok V.A., Bratton D.L., Worthen G.S., Henson P.M. p38 mitogenactivated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**, № 14. – P.8389–8397.
 17. Fudala R., Krupa A., Matthay M.A., Allen T.C., Kurdowska A.K. Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* – 2007. – **293**, № 2. – P.364–374.
 18. Genestier A.L., Michallet M.C., Prevost G., Bellot G., Chalabreysse L., Peyrol S., Thivolet F., Etienne J., Lina G., Vallette F.M., Vandenesch F., Genestier L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* – 2005. – **115**, № 11. – P.3117–3127.
 19. Gozal E., Sachleben L.R., Jr., Rane M.J., Vega C., Gozal D. Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – **288**, № 3. – P.535–542.
 20. Hannah S., Mecklenburgh K., Rahman I., Bellingan G.J., Greening A., Haslett C., Chilvers E.R. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro // *FEBS Lett.* – 1995. – **372**, № 2-3. – P.233–237.
 21. Htoo A.K., Greenberg H., Tongia S., Chen G., Henderson T., Wilson D., Liu S.F. Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation // *Sleep Breath.* – 2006. – **10**, № 1. – P.43–50.
 22. Karlsson A., Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – **4**, № 1. – P.49–60.
 23. Kasahara Y., Iwai K., Yachie A., Ohta K., Konno A., Seki H., Miyawaki T., Taniguchi N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils // *Blood.* – 1997. – **89**, № 5. – P.1748–1753.
 24. Kato T., Kutsuna H., Oshitani N., Kitagawa S. Cyclic AMP delays neutrophil apoptosis via stabilization of Mcl-1 // *FEBS Lett.* – 2006. – **580**, № 19. – P.4582–4586.
 25. Kettritz R., Gaido M.L., Haller H., Luft F.C., Jennette C.J., Falk R.J. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils // *Kidney Int.* – 1998. – **53**, № 1. – P.84–91.
 26. Lekstrom-Himes J.A., Kuhns D.B., Alvord W.G., Gallin J.I. Inhibition of human neutrophil IL-8 production by hydrogen peroxide and dysregulation in chronic granulomatous disease // *J. Immunol.* – 2005. – **174**, № 1. – P.411–417.
 27. Leuenroth S.J., Grutkoski P.S., Ayala A., Simms H.H. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity // *Surgery.* – 2000. – **128**, № 2. – P.171–177.
 28. Leuenroth S.J., Grutkoski P.S., Ayala A., Simms H.H. The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis // *J. Leukoc. Biol.* – 2000. – **68**, № 1. – P.158–166.
 29. Lundqvist-Gustafsson H., Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils // *Ibid.* – 1999. – **65**, № 2. – P.196–204.
 30. Luo H.R., Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation // *Amer. J. Hematol.* – 2008. – **83**, № 4. – P.288–295.
 31. Maianski N.A., Maianski A.N., Kuijpers T.W., Roos D. Apoptosis of neutrophils // *Acta Haematol.* – 2004. – **111**, № 1–2. – P.56–66.
 32. Maianski N.A., Geissler J., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Roos D., Kuijpers T.W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis // *Cell. Death. Differ.* – 2004. – **11**, № 2. – P.143–153.
 33. Mecklenburgh K.I., Walmsley S.R., Cowburn A.S., Wiesener M., Reed B.J., Upton P.D., Deighton J., Greening A.P., Chilvers E.R. Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis // *Blood.* – 2002. – **100**, № 8. – P.3008–3016.
 34. Moulding D.A., Akgul C., Derouet M., White M.R., Edwards S.W. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – **70**, № 5. – P.783–792.
 35. Murray J., Walmsley S.R., Mecklenburgh K.I., Cowburn A.S., White J.F., Rossi A.G., Chilvers E.R.

- Hypoxic regulation of neutrophil apoptosis role: of reactive oxygen intermediates in constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced cell death // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2003. – **1010**, – P.417–425.
36. Murray J., Barbara J.A., Dunkley S.A., Lopez A.F., Van Ostade X., Condliffe A.M., Dransfield I., Haslett C., Chilvers E.R. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro // *Blood.* – 1997. – **90**, № 7. – P.2772–2783.
 37. Narayanan P.K., Ragheb K., Lawler G., Robinson J.P. Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis // *J. Leukoc. Biol.* – 1997. – **61**, № 4. – P.481–488.
 38. Nick J.A., Avdi N.J., Young S.K., Lehman L.A., McDonald P.P., Frasch S.C., Billstrom M.A., Henson P.M., Johnson G.L., Worthen G.S. Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils // *J. Clin. Invest.* – 1999. – **103**, № 6. – P.851–858.
 39. Peng S.L. Neutrophil apoptosis in autoimmunity // *J. Mol. Med.* – 2006. – **84**, № 2. – P.122–125.
 40. Rollet-Labelle E., Grange M.J., Elbim C., Marquetty C., Gougerot-Pocidallo M.A., Pasquier C. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* – 1998. – **24**, № 4. – P.563–572.
 41. Ryan S., Taylor C.T., McNicholas W.T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome // *Circulation.* – 2005. – **112**, № 17. – P.2660–2667.
 42. Ryan S., McNicholas W.T., Taylor C.T. A critical role for p38 map kinase in NF-kappaB signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **355**, № 3. – P.728–733.
 43. Scheel-Toellner D., Wang K.Q., Webb P.R., Wong S.H., Craddock R., Assi L.K., Salmon M., Lord J.M. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – **32**, № 3. – P.461–464.
 44. Scheel-Toellner D., Wang K., Craddock R., Webb P.R., McGettrick H.M., Assi L.K., Parkes N., Clough L.E., Gulbins E., Salmon M., Lord J.M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling // *Blood.* – 2004. – **104**, № 8. – P.2557–2564.
 45. Simon H.U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation // *Immunol. Rev.* – 2003. – **193**, – P.101–110.
 46. Strassheim D., Asehnoun K., Park J.S., Kim J.Y., He Q., Richter D., Mitra S., Arcaroli J., Kuhn K., Abraham E. Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H₂O₂: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2004. – **286**, № 3. – P.683–692.
 47. Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – **4**, № 1. – P.69–83.
 48. Tamura D.Y., Moore E.E., Partrick D.A., Johnson J.L., Offner P.J., Silliman C.C. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response // *Shock.* – 2002. – **17**, № 4. – P.269–273.
 49. Toffoli S., Feron O., Raes M., Michiels C. Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1773**, № 10. – P.1558–1571.
 50. Villunger A., O'Reilly L.A., Holler N., Adams J., Strasser A. Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes // *J. Exp. Med.* – 2000. – **192**, № 5. – P.647–658.
 51. Walmsley S.R., Print C., Farahi N., Peyssonnaux C., Johnson R.S., Cramer T., Sobolewski A., Condliffe A.M., Cowburn A.S., Johnson N., Chilvers E.R. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity // *Ibid.* – 2005. – **201**, № 1. – P.105–115.
 52. Ward C., Walker A., Dransfield I., Haslett C., Rossi A.G. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – **32**, № 3. – P.465–467.
 53. Weinmann P., Gaetgens P., Walzog B. Bcl-XL- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3 // *Blood.* – 1999. – **93**, № 9. – P.3106–3115.
 54. Yuan G., Nanduri J., Khan S., Semenza G.L., Prabhakar N.R. Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – **217**, № 3. – P.674–685.
 55. Zhang B., Hirahashi J., Cullere X., Mayadas T.N. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, № 31. – P.28443–28454.
 56. Zmijewski J.W., Zhao X., Xu Z., Abraham E. Exposure to hydrogen peroxide diminishes NFkappaB activation, IkappaB-alpha degradation, and proteasome activity in neutrophils // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2007. – **293**, № 1. – P.255–266.

CONTENTS

T.V. Shimanskaya, Y.V.Goshovska, V.F. Sagach. Nitric oxide as the main mediator of adaptation to physical training	3
O.I. Voitychuk, V.S. Asmol'kova, N.M. Gula, M.Oz, Y.M. Shuba. The effects of N-stearoyl- and N-oleoylethanolamine on cardiac voltage-dependent sodium channels	13
A. M. Talnov. Correlations of hippocampal theta frequency with conditioned stimuli, motor latency and moving time in rats	23
I.V. Melnick. Electrically silent neurons in substantia gelatinosa of the rat spinal cord	34
T.V. Beregova, Y.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko. Zinc and the secretory material content in blood granulocytes and in basal parts of intestine crypts during stress	40
N.E. Lapovets. Cytokines spectrum of blood serum during inflammatory processes in abdominal cavity	45
L.D. Popova, I.M. Vasyl'eva. Testosterone and thyroid hormones levels in rats with submissive and aggressive behavior types	49
S.M. Voronych, B.M Pavlykivs'ka, N.M. Voronych-Semchenko. Physiological aspects of analysis of the indexes of the variability of cardiac rhythm in adolescents with latent hypothyroidism	53
Yu. Koryak. Static stretch training in conditions of simulated microgravity maintains contractile properties of muscles	62
I.V. Brodyak, A.R. Hnatysh, N.O. Sybirna. Effect of L-arginine and aminoguanidine system on morphological and physiological characteristics of plasma membranes of blood lymphocytes during experimental diabetes mellitus	77
E.N. Chujan, E.A. Birukova, M.U. Ravaeva. The influence of individually chosen controlled breathing frequency on the heart rate variability indexes	86
REVIEW	
O.A. Fedorenko and S.M. Marchenko. Spontaneously active ion channels of the nuclear envelope membrane	95
O.I. Sukmanskyy, M.S. Drogomiretska, O.V. Den'ga, I.O. Sukmanskyy. The glycosaminoglycans role in pathogenesis of atherosclerosis	106
L. Dyugovskaya, A. Polyakov. Neutrophil apoptosis and hypoxia	115

