

ВІСНИК

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 8

Засновано 1958 року

Затверджено вченою радою
біологічного факультету
29 жовтня 2001 року

Встановлено, що ці процеси в МХ під впливом донора NO 1 mM SNP зумовлені зниженням активності аконітази, але не цитратсинтази і альфакетоглутаратдегідрогенази. Основним моментом цих досліджень вважалося перемикання обміну з аеробної компоненти на гліколіз, який встановлений за 50 % зростанням продукції лактату [3, 5]. Припускається можливість реалізації ефектів оксиду азоту на мітохондріальне дихання декількома шляхами. Серед них NO-залежне зниження інтенсивності окиснення викликане активацією холінергічних мускаринових M_2 і брадикінінових $ВК_2$ рецепторів у скелетних м'язів, цГМФ-залежними реакціями в ефектах ендогенного NO, посиленням активації NOS у МХ різних типів клітин. Гістохімічними методами показано кореляційний зв'язок між eNOS і сукцинатдегідрогеназою МХ.

Таким чином, аналіз NO-залежних механізмів енергозабезпечення основними субстратами циклу Кребса свідчить про існування регуляторних метаболічних шляхів, пов'язаних з функціонуванням холінергічних і адренергічних механізмів регуляції, переважання котрих у кінцевому підсумку зумовлює високу і низьку резистентність до дії гіпоксичного чинника, і має враховуватись у спрямованій фармакологічній корекції.

1. Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. – 1991. – Т. 56, вып. 3. – С. 388–403. 2. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М., 1973. 3. Andersson U., Leighton B., Young M.E. Inactivation of Aconitase and Oxoglutarate Dehydrogenase in Skeletal Muscle in vitro by Superoxide Anions and/or Nitric Oxide // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – Vol. 249 (2). – P. 512–516. 4. Archer S., Tristani-Firouzi M. Nitric Oxide: Mechanism of Action and Role in Human Pathophysiology // Hypoxia and the brain. – 1995. – P. 171–182. 5. Balon T., Nadler J. Evidence that Nitric Oxide Increases Glucose Transport in Skeletal Muscle // J. Appl. Physiol. – 1997. – Vol. 2 (1). – P. 359–363. 6. Brown G. Nitric Oxide Regulates Mitochondrial Respiration and Cell Functions by Inhibiting Cytochrome Oxidase // FEBS Lett. – 1995. – Vol. 369. – P. 136–139. 7. Farhali. Possible Role of Nitric Oxide in Oxidative Stress Injury: a Study in Perfused Hepatocytes // Int. J. Immunopharmacol. – 1997. – Vol. 19 (9–10). – P. 599–605. 8. Giuffre A., Sarti A., D'Itri E. On the Mechanism of Inhibition of Cytochrome c Oxidase by Nitric Oxide // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 33404–33408. 9. Guilivi C.

Functional Implications of Nitric Oxide Produced by Mitochondria in Mitochondrial Metabolism // Biochem. J. – 1998. – Vol. 15 (332). – P. 673–679. 10. Keelan J., Brand M., Bates T.E. Nitric Oxide and Antioxidant Status in Glucose and Oxygen Deprives Neonatal and Adult Rat Brain Synaptosomes // Comment in Br. J. Anaesth. – 1997. – Vol. 78 (3). – P. 343–344.

Надійшла до редколегії 11 жовтня 2001 р.

УДК: 612.111.11/13:612.419

Т.М.Запорожець, канд. біол. наук

ВПЛИВ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ НА АПОПТОЗ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ПРИ МІЄЛОДЕПРЕСІЇ

Досліджуються процеси апоптозу клітин кісткового мозку в умовах депресії кровотворення цитостатичним препаратом вінбластином та корекції цих порушень пептидним комплексом, отриманим шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну.

The investigation is devoted to the study of the processes of apoptosis of bone marrow cells in conditions of depression of blood production by cytostatic preparation winblastin and correction of these violations by peptide complex by the received way of fermentative hydrolysis of hemoglobin.

Відомо, що депресія кровотворення може бути різного генезу: унаслідок дії на клітини гемопоезу токсинів, бактерій, радіації, антибіотиків, імунних комплексів, цитостатичних препаратів. Нами було обрано модель цитостатичної депресії кровотворення, тому що мієлодепресивна дозозалежна дія цитостатиків чітко розкривається в кістковому мозку. Високодозна хіміотерапія різними цитостатиками і кортикостероїдами супроводжується сильним пригніченням кровотворення, розвитком нейтрофілопенії, що супроводжується різким послабленням антимікробної резистентності, високим ризиком інфекцій. Негативним є те, що цитостатики діють не вибірково до лейкозного клітинного клону, а тільки переважно до нього й одночасно з руйнуванням злоякісних клітин токсично впливають на кровотворні клітини кісткового мозку [2]. Розробка нових методів корекції порушень, які виникають у системі крові при лікуванні цитостатичними препаратами є актуальним і сьогодні [4].

У дослідженні ми використовували алкалоїд барвінку рожевого – вінбластин, який денатуруюче впливає на тубулін цитоскелета, викликаючи К-мітоз, чинить розрив та непрохідність мембранних каналів, що сприяє апоптозу, тому використовується як протипухлинний засіб.

Процеси депресії кровотворення і загибелі клітин тісно пов'язані одне з одним. Тому нам було цікаво дослідити особливості процесів апоптозу, зокрема експресії його головних маркерів bcl-2 та p53 в умовах депресії кровотворення, викликаній введенням цитостатику, і оцінити вплив пептидних фрагментів, отриманих за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну, на процеси фізіологічної загибелі клітин у кістковому мозку.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені на 21 щурі обох статей масою 180 г. Тварини було поділено на три групи:

1) інтактна;

2) контрольна – тваринам одноразово внутрішньоочеревинно вводили вінбластин у дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла [7] і паралельно вводили 0,2 мл апірогенного 0,9 % фізіологічного розчину натрію хлориду упродовж 7 днів;

3) дослідна – щурам після введення вінбластину в дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла вводили пептидний комплекс, добутий з гемоглобіну, у дозі 1 мг/кг маси тіла на добу в 0,2 мл фізіологічного розчину упродовж 7 днів.

Маркери апоптозу онкопротеїни bcl-2 і p53 визначали універсальним імуногістохімічним стрептавідін-пероксидазним методом [3] на парафінових зрізах кісткового мозку. Як перші антитіла використовували моноклональні антитіла до bcl-2 ("Dako" N-Series Mouse ANTI-HUMAN bcl-2 oncoprotein, 124), до p53 (Mouse ANTI-HUMAN p53 protein, DO-7). Як другі антитіла до bcl-2 і p53 використовували біотильовані антитіла козла до імуноглобулінів миші ("Sigma" Anti-Mouse Immunoglobulins Biotin Conjugate). Для зв'язування біотину користувались третіми антитілами (однакові для bcl-2 та p53) ExtrAvidin Peroxidase Conjugate "Sigma". Для цитохімічного визначення активності пероксидази отримані зрізи кісткового мозку відмивали та інкубували в розчині хромогену діамінобензидину, поміщали в бальзам. У контрольних реакціях

на зрізи замість перших антитіл наносили Negative Control "Dako". Ураховували інтенсивність (за середнім цитохімічним коефіцієнтом СЦК) і розповсюдженість (за процентом клітин-носіїв маркерів апоптозу p53 і bcl-2) зафарбованого продукту реакції, який проявляли діамінобензидином тетрахлоридом. Статистичну оцінку результатів проводили за допомогою критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

На сьому добу після одноразового введення вінбластину в нашому досліді загинуло 70 відсотків тварин, причому відмічено численні спайки та перфорації стінок кишечника, некротичний стан шкіри й слизових оболонок ротової порожнини, гіпоплазію кісткового мозку.

Отже, введення вінбластину в першу чергу впливало на тканини, клітини яких постійно діляться: бластні клітини червоного мозку, епітелій слизових шлунково-кишкового тракту та шкіри, що відповідає механізму його дії. Відомо, що алкалоїд барвінку рожевого – вінбластин – денатуруюче впливає на тубулін цитоскелета, викликаючи К-мітоз, чинить розрив та непрохідність мембранних каналів, що сприяє апоптозу, тому використовується як протипухлинний засіб [1].

В умовах гемодепресії після введення вінбластину нами виявлено активацію загибелі клітин кісткового мозку шляхом апоптозу за рахунок посилення експресії ядерного білка p53 (рис. 1), що може приводити до блока в точці рестрикції при проходженні клітиною G₁-фази, клітина не вступає в S-фазу клітинного циклу й підлягає самознищенню.



Рис. 1. Експресія онкопротеїну p53 у клітинах кісткового мозку в щурів при депресії кровотворення, викликаній введенням вінбластину

Паралельно зі збільшенням експресії білка p53 зменшувалась експресія білка bcl-2, що також приводило до загибелі клітин, але за рахунок інших механізмів: bcl-2 є антиоксидантом і зменшення його експресії супроводжується активацією діоксидного окиснення ліпідів, яке, у свою чергу, є одним із пускових механізмів апоптозу. Крім цього, пригнічення активності bcl-2 зумовлює збільшення концентрації

внутрішньоклітинного кальцію, що також запускає загибель клітин.

У таблиці показано інтенсивність (за середнім цитохімічним коефіцієнтом (СЦК)) та розповсюдженість (за процентом клітин з маркерами апоптозу) протеїнів bcl-2 та p53 при депресії кровотворення, викликаній введенням вінбластину та застосуванні пептидних фрагментів гемоглобіну.

Таблиця

Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на експресію онкопротеїнів bcl-2 і p53 у клітинах кісткового мозку в щурів при депресії кровотворення, викликаній введенням вінбластину

Маркери апоптозу, що вивчалися		Статистичні показники	Групи тварин		
			Інтактні тварини, n=10	Контрольні тварини, які отримували вінбластин + фізіологічний розчин, n=4	Піддослідні тварини, які отримували вінбластин + пептид, n=7
bcl-2	% клітин, з експресією маркера апоптозу	M ±m	29,80 3,02	15,40** 1,21	37,80** 4,16
	СЦК	M ±m	0,54 0,07	0,31* 0,04	0,91** 0,11
p53	% клітин, з експресією маркера апоптозу	M ±m	14,0 6,82	21,20* 22,4	15,40* 1,36
	СЦК	M ±m	0,28 0,04	0,72** 0,13	0,47 0,13

Примітка: (p < 0,05)*, (p < 0,01)**. Достовірність відмінностей показників між інтактною і контрольною, між контрольною та досліджуваною групою тварин.

Як свідчать дані таблиці, у тварин, які отримували вінбластин, кількість клітин з антиапоптичним маркером bcl-2, знизилася в 1,93 рази (p < 0,01) щодо інтактної групи тварин, а середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) зменшився у 1,74 рази (p < 0,05). Кількість клітин з проапоптичним маркером p53, навпаки, збільшилася в 1,5 рази (p < 0,05) порівняно з інтактом, а СЦК зріс у 2,57 рази (p < 0,01).

Останніми роками значний прогрес при лікуванні хіміотерапевтичних міелосупресій пов'язаний із застосуванням рекомбінантних гемопоетичних колонієстимулюючих факторів (КСФ) людини, особливо гранулоцитарного (Г-КСФ) і гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСФ) [8].

Попередніми дослідженнями [5, 6] було показано, що пептидний комплекс гемоглобіну, як і названі вище цитокіни, здатен стимулювати процеси проліферації та диференціювання клітин-попередників міелоїдного та еритроїдного ростків, збільшувати кількість поліморфноядерних лейкоцитів у периферійній крові та посилювати реакцію респіраторного вибуху нейтрофілів.

Застосування пептидного комплексу гемоглобіну щурам, що отримували вінбластин, приводило до зниження летальності на 20 % порівнюючи з контрольною групою. У піддослідних тварин зберігалась вага та координація рухів, відмічалось незначне випадіння шерсті. Отже, візуальні симптоми отруєння вінбластином були виражені дещо менше.

У тварин піддослідної групи, які поряд з вінбластином отримували пептидні фрагменти гемоглобіну, кількість bcl-2 позитивних клітин зростала у 2,45 рази (p < 0,01) відносно контролю, а СЦК збільшився у 2,93 рази (p < 0,01). Рівень експресії p53 протеїну (рис. 2) в клітинах кісткового мозку тварин, які одержували внутрішньом'язово пептидний комплекс гемоглобіну знизився у 1,38 рази (p < 0,05), а СЦК клітин зменшився в 1,53 рази у порівнянні з контрольною групою тварин.

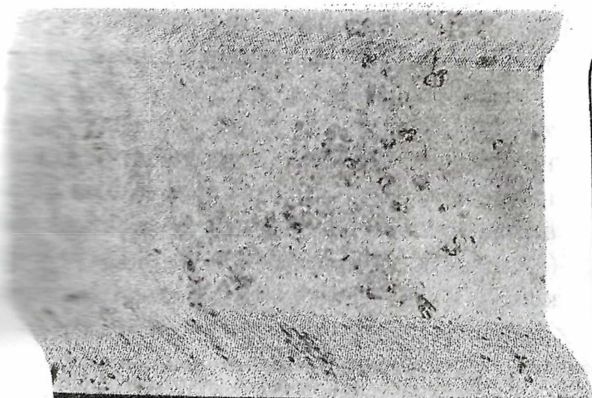


Рис. 2. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на експресію онкопротеїну p53 у клітинах кісткового мозку в щурів при депресії кровотворення, викликаній уведенням вінбластину

Таким чином, дія пептидного комплексу гемоглобіну гальмувала процеси апоптозу за рахунок зниження експресії ядерного протеїну p53 і збільшення експресія онкопротеїну bcl-2. Зниження експресії онкопротеїну p53 сприяло проходженню клітиною S-фази та здійсненню процесів реплікації та репарації ДНК. Можливо пептидний комплекс гемоглобіну інгібує активність ендонуклеаз у ядрі, які каталізують початкову стадію деградації ДНК. Мабуть пептиди гемоглобіну інгібували експресію Вах (співвідношення bcl-2 до вах визначає чи буде жити клітина чи загине). Ці данні дозволяють розглядати пептидний комплекс гемоглобіну як pfcс, який підвищує резистентність клітин до ініціаторів апоптозу та відновлює вміст клітин крові після хімотерапії, зменшуючи побічні властивості цитостатиків.

1. Булкина З.П. Противоопухолевые препараты: Справочник. – Киев, 1991. – С. 44–48. 2. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев, 1998. 3. Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Склярченко Л.М. Иммуноцитохимическая диагностика злокачественных экссудатов / Киев, 1993. – С. 133–140. 4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Механизмы гемостимулирующего эффекта грануцитарного колониестимулирующего фактора при цитостатическом воздействии // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 8. – С. 194–199. 5. Запорожець Т.М., Нагорная Т.С. Еременко А.В. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники крові та кісткового мозку за умов фенілгідразинової анемії // Проблеми екології та медицини. – 1999. – Т. 70, № 1–2. – С. 13–14. 6. Запорожець Т.М., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. Зміни експресії мано-зомішуючих мембранних структур лейкоцитів

під впливом пептидного комплексу гемоглобіну у здорових тварин та за умов гемолітичної анемії // Проблеми екології та медицини. – 1999. – Т. 70, № 1–2. – С. 132–135. 7. Торубарова Н.А. О взаимоотношении миелоидных и стромальных элементов костного мозга при острой экспериментальной аплазии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 1977. – № 2. – С. 211–214. 8. Cacciola E., Diessererth A.B., Guistolisi R. Hemo-poietic Growth Factors, Oncogenes and Cytokines in Clinical Hematology – Basel, 1994– P. 234.

Надійшла до редколегії 1 жовтня 2000 р.

УДК 612.821

І.Г.Зима, канд. біол. наук,
С.А.Крижановський, асп.,
А.О.Чернінський, асп.

ДИНАМІКА ПАРАМЕТРІВ ВИБІРКОВОЇ УВАГИ ПІД ВПЛИВОМ ОДОРИЗАЦІЇ ЕФІРНОЮ ОЛІЄЮ МЕЛІСИ

Досліджувався вплив одоризації ефірної олії меліси на динаміку вибіркової уваги людини при виконанні тесту "коректурна проба". Показано, що під час виконання завдання на фоні одоризації в обстежуваних відбувалось значне зростання стійкості уваги. Виділено дві групи індивідів, що відрізняються результативністю діяльності та характером психоемоційного реагування на одоростимуляцію. Виявлено обернений зв'язок між вихідними значеннями концентрації уваги та напрямом її змін під впливом одоростимуляції.

Influence of Melissa officinalis ether oil odorization upon human selective attention dynamics during execution of Burdon-test was investigated. It is shown that execution of the test against a background odorization resulted in a considerable increase in attention resistance. There were two groups of individuals with different activity efficiency and pattern of psycho-emotional reaction. There was revealed reciprocal relation between basic data on attention concentration and character of it shifting under odorization.

Пошук методів, за допомогою яких можна було б знизити коливання працездатності людини під час роботи та підвищувати ефективність її відпочинку, завжди був актуальним у психофізіології. Досить популярним нині є застосування методів сенсорної стимуляції, що дозволяє коригувати мотиваційно-емоційний фон поведінки та впливати на

© І.Г.Зима, С.А.Крижановський,
А.О.Чернінський, 2002