

5. Clarke H, Dhillon W, Jayasena C. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab* 2015;30:124–41.

6. Hong J-S, Kim S, Lee S, Jo E, Lee B, Yoon J, et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* 2014;8:349–62.

7. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010;151:722–30.

8. Asare N, Instanes C, Sandberg W, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 2012;291:65–72.

9. Austin C, Umbreit T, Brown K, Barber D, Dair B, Francke-Carroll S, et al. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. *Nanotoxicology* 2011;6:912–22.

10. Zande M, Vandebriel R, Doren E, Kramer E, Rivera Z, Serrano-Rojero C, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012;6:7427–42.

11. Ordzhonikidze CG, Ramaiyya LK, Egorova EM, Rubanovich AV. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo. *Acta Naturae* 2009;1:99–101.

12. Grachev P, Li X, Lin Y, Hu M, Elsamani L, Paterson S, et al. GPR54-Dependent Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by Neurokinin B in Prepubertal Rats. *Plos One* 2012;7.

13. Thakur M, Gupta H, Singh D, Mohanty I, Maheswari U, Vanage G, et al. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *J Nanobiotechnology* 2014;12:42.

14. Lan Z, Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Nanomedicine-Uk* 2012;7:579–96.

15. Han J, Jeong J-K, Gurunathan S, Choi Y-J, Das J, Kwon D-N, et al. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* 2015:1–13.

16. Matvienko MG, Pustovalov AS, Dzerzhynsky ME. Variety of functions and effects of kisspeptin. *Biopolymers and Cell* 2013;29:11–20.

17. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego: Elsevier Academic Press;2007.

18. Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic Pathology* 2012;40:40S–121S.

19. Sanchez-Garrido M, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav* 2013;64:187–94.

20. Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil K-H, et al. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2012;7:1120–30.

21. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett* 2012;214:251–8.

22. Skorupskaite K, George J, Anderson R. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update* 2014;20:485–500.

23. Melnik E, Buzulukov Y, Demin V, Demin V, Gmshinski I, Tyshko N, et al. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* 2013;5:107–15.

Надійшла до редколегії 29.02.16

В. Калиновский, асп., А. Пустовалов, канд. биол. наук, М. Держинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Г. Гродзюк, канд. хим. наук, Н. Андришина, канд. хим. наук
ООО "Наномедтех", Киев

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА КИСПЕПТИН-ОПОСРЕДОВАННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕМЕННИКОВ КРЫС

Показано, что наночастицы серебра подавляют функционирование репродуктивной системы самцов крыс. При этом активация гипоталамического центра регуляции половой функции не имела стимулирующего воздействия на семенник. Полученные данные позволяют предположить, что токсическое действие наночастиц серебра связано с их непосредственным действием на семенники.
Ключевые слова: Наночастицы, серебро, kisspeptin, семенник.

V. Kalynovskyi, PhDstud., A. Pustovalov, PhD, M. Dzerzhynsky, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
G. Grodzyuk, PhD, N. Andriushina, PhD
Nanomedtech-LLC, Kyiv

KISSPEPTIN-MEDIATED REGULATION OF THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE RAT TESTICLES UNDER THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES

It was shown that silver nanoparticles downregulate reproductive system of male rats. At the same time, activation of the hypothalamic sex-function regulatory center did not result in any stimulatory effect on testes. We suppose that toxicity of silver nanoparticles is due to their direct action on the testicles.
Key words: Nanoparticles, silver, kisspeptin, testis.

УДК 577.353.3

П. Вірич, асп., О. Шелюк, канд. біол. наук,
В. Мартинюк, д-р біол. наук, С. Чумаков, інж.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОПТИЧНАЯ СИСТЕМА РЕЕСТРАЦИИ СКОРОЧЕНИЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В ІЗОМЕТРИЧНОМУ РЕЖИМІ

Була розроблена оптична система реєстрації скорочення гладеньких м'язів в ізометричному режимі. Тестування системи проводили на гладеньком'язових смужках шлунку та саесит щура. Було перевірено можливість реєстрування розробленою оптичною системою спонтанної активності гладеньких м'язів. Отримані параметри м'язових скорочень відповідають літературним даним. Таким чином, розроблений оптико-механічний метод реєстрації сили та швидкості можна використовувати для запису ізометричних скорочень гладеньких м'язів шлунку та саесит щурів і, відповідно, для вивчення впливу різних ефекторів на їхню механокінетику.

Ключові слова: гладенькі м'язи, ізометричне скорочення, механокінетичні параметри.

Вступ. На сьогодні існують значні досягнення в з'ясуванні механізмів (іонних, молекулярних і мембранних) скоротливої активності м'язів, зокрема гладеньких [4-6]. Проте вивчення феноменологічних властивостей інтактного ГМ, зокрема кінетичних закономірностей процесу скорочення-розслаблення в ізометричному режимі, залишається вкрай необхідним [1, 2, 3]. По-перше, від-

стеження зміни напруження м'язового препарату в часі робить можливим визначення об'єктивних параметрів скоротливої відповіді (наприклад, амплітуда f_m та час t_m , за який досягається амплітудне значення сили скорочення, а також швидкості скорочення та розслаблення). Це, в свою чергу, створює підґрунтя для з'ясування особливостей впливу на скоротливу відповідь різнома-

нітних фізико-хімічних факторів, а також для об'єктивного кількісного порівняння динамічних властивостей різних м'язів, зокрема у випадку використання різноманітних біологічно-активних речовин (ацетилхоліну, оксиду азоту, норадреналіну, простагландинів, нейропептидів, АТФ, тромбоксану А₂, вазоактивного пептиду, субстанції Р, гістаміну тощо). По-друге, для вирішення однієї із фундаментальних проблем біофізики ГМ, яка стосується механізмів електро- та фармако механічного спряження, є важливим створення стабільної системи реєстрації скорочення гладеньких м'язів. У зв'язку з цим, основною метою даної роботи було розробити нову систему реєстрації на основі оптичного датчика сили скорочення.

Матеріали та методи. Тензометричні досліди проводили на препаратах гладеньких м'язів шлунку нелінійних білих щурів-самців, які перебували у стандартних умовах утримання та годівлі у віварії ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження". Середня вага тварин становила 240–260 г. Щурів декапітували, вилучали шлунок та саесит, промивали розчином Кребса. У ході приготування препаратів шар м'язів звільняли від серозної та слизової оболонки і нарізали гладеньком'язові смужки (середній розмір – 1,5-2 × 10 мм). Такі процедури, що проводилися при кімнатній температурі, дозволяють вилучити нервові пейсмейкери, що здатні впливати на скорочення. Крім того, не важливо з якого відділу шлунок було відібрано матеріал, так як основні нем'язові пейсмейкери видалено, а клітини Кахалія розміщені рівномірно по всьому м'язовому шару.

У роботі використовували наступні розчини:

– фізіологічний розчин Кребса (мМ/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5 (рН 7,4);

– гіперкалієвий розчин містив K⁺ у концентрації 80 мМ. Його готували шляхом заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів натрію на еквімолярну кількість K⁺ (рН 7,4);

– розчин карбахоліну (10 мкМ), для чого початково готували його концентрований водний розчин (з розрахунку додавання 1% розчину речовини до кінцевого об'єму), аліквоту якого вносили в розчин Кребса до одержання необхідної концентрації.

Реєстрацію механокінетичних кривих скорочення-розслаблення проводили за допомогою модуля збору даних m-DAQ12 (HoliDataSystemsLtd., Україна) та програмного забезпечення PowerGraph Professional 3.3, статистична обробка здійснювалась програмою Origin 8.

Результати та обговорення. Сучасні технології дозволяють розробляти сенсори мініатюрних розмірів для реєстрації ряду величин, що включають силу, переміщення, прискорення, вологість, тиск, та інші з надзвичайною точністю. На основі таких приладів можливо розробити системи реєстрації сили скорочень гладеньких м'язів, які б мали компактні розміри та відповідали встановленим нормам.

Розрізняють два типи м'язового скорочення – ізотонічне, для реєстрації сили скорочення при фіксованій довжині, та ізометричне – лінійного переміщення м'язу за сталої сили скорочення.

Основною проблемою систем реєстрації сили скорочень, або тензометрії гладеньких м'язів є їх жорстка фіксація. В реальних експериментах повного знерухолення не можливо досягти і присутнє зміщення коливається в межах 10-50 мкм, що порівняно з довжиною

м'язової смужки (10-15 мм), не є суттєвим. Перші подібні системи базувались на механотронах та тензорезисторній технології.

Альтернативою даним системам є використання оптичної техніки, так званих оптичних пар, або оптоотронів. В основі конструкції лежить джерело світла з приймачем, що можуть працювати в різних діапазонах електромагнітного випромінювання – від інфрачервоного до короткохвильового спектру видимої області. Дана система володіє високою швидкодією, низьким температурним дрейфом, проста у застосуванні та має низьку вартість. На основі даного елемента є можливим розробка системи реєстрації надмалих переміщень затвору, який перекиватиме світловий потік між джерелом світла та фотоприймачем.

Виходячи з вищесказаного нами була розроблена оптична система реєстрації скорочення – розслаблення гладеньких м'язів в ізометричному режимі. В основі принципу її вимірювання сили скорочення лежить реєстрація надмалого (порядку десятка мікрон) відхилення пружної сталеві пластина (або стрижня), яке спостерігається у відповідь на силу, що розвивається при скороченні гладеньком'язової смужки. Остання фіксується за допомогою двох гачків – перший на пластині датчика, другий – на камері, адовжина препарату та сила його натягу контролюється за допомогою повзунків. Камера виготовлена з нейтрального органічного скла для уникнення вимивання в інкубуючий розчин побічних речовин.

Оптична система реєстрації базується на оптоотронній технології, що складається з джерела світла (білий світлодіод), і фотоприймача (фотодіод з максимумом чутливості до жовтого світла). Металева пружна пластина (або стрижень) у стані безсилового навантаження екранує потік світла від світлодіоду, на фотодіоді-приймачі в цей час реєструється темновий фотострум. Силове навантаження в діапазоні від 0 до 98 мН (10 г) призводить до відхилення пластинки і зміну світлового потоку від світлодіоду до фотодіоду. Фотострум, що виникає на фотоприймачі, підсилюється операційним підсилювачем з крутизною перетворення 1В/19,6 мН. Інтенсивність падаючого світла лінійно залежить від силового навантаження на пластину в діапазоні 0 – 10 г. Навантаження більше 100 мН призводить до нелінійної відповіді фотоприймача, що пов'язано з особливостями використовуваного матеріалу. Дана властивість вводить обмеження використання датчика лише у даному діапазоні. Погрішність вимірювання тестового навантаження 20 мН складає ± 0,02 мН (n=10), що становить 1 % від величини, що вимірюється. Дрейф темнового струму протягом 60 хвилин не перевищує 10 мВ, що відповідає навантаженню 0,3 мН. Реєстраційна система обладнана потенціометром, який дозволяє корегувати темновий фотострум до положення "нуль". Після зняття тестового навантаження в 20 мН (2 г) базова лінія повністю відновлюється. Інерційність системи реєстрації, що встановлюється по виходу фотоструму на стаціонарний рівень після прикладення тестового навантаження, складає порядку 5 мс, що є достатнім для вимірювання динаміки сили скорочення гладеньких м'язів. Проте, дана система є чутливою до температури навколишнього середовища. Але в діапазоні 19-25°С похибка вимірювань не перевищує 5%.

Матеріал використаний для кріплення голок та для основи датчика – стрижень з високолегованої сталі, яка крім карбону має в своєму складі атоми вольфраму, молібдену, ванадію та кобальту, що забезпечує незмінну пружність та твердість в широкому діапазоні температур (до 200 °С). Основний внесок в температурний

дрейф вносять оптрон та допоміжні компоненти – резистори, конденсатори, підсилювачі та ін.

Камера для інкубування має розміри 70x70x70 мм з водним термостатом об'ємом 170 мл, над яким знаходиться камера реєстрації з розмірами 30x60x5 мм з гачками для фіксації смужок гладеньких м'язів на рівні 1 мм від дна та системою контролю їх натягу. Експери-

ментальна камера має вхідний та вихідний отвори для руху омиваючого розчину (37°C) зі швидкістю протікання 1,5 мл/хв. До порожнини, яка знаходилась під робочою камерою подавали нагріту воду від рідинного термостату. Схематичне представлення робочої установки для тензометричних досліджень подано на рис. 1.

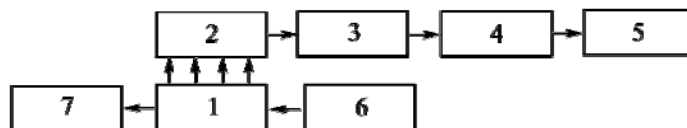


Рис. 1. Блок-схема пристрою для дослідження скоротливої активності гладеньком'язових смужок в ізометричних умовах:

- 1 – робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовим препаратом, який закріплено на сталевих гачках;
- 2 – тензометричний датчик; 3 – підсилювач з електричним потенціометром; 4 – модуль збору даних (АЦП);
- 5 – комп'ютер з програмою-реєстратором PowerGraph 3.3.; 6 – набір робочих розчинів;
- 7 – перистальтичний насос

Фіксацію препарату проводили на хромованих голках, задаючи початкове навантаження близько 10 мН і залишали на 1 годину (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти та скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином та карбахоліном, з постійними механокінетичними параметрами).

Тестування розробленої системи реєстрації скорочення – розслаблення гладеньких м'язів проводили на смужках шлунку та саесит щура. Для цього були зареєстровані скоротливі відповіді гладеньком'язових препаратів шлунку та кишечника (саесит) за умов дії різних активуючих факторів (K^+ -деполяризація (80 мМ), аплікація карбахоліном (10 мМ)).

При проведенні експериментів в однакових умовах (гіперкалієвий розчин 80 мМ), були отримані ізометричні скорочення, які наведено на рис. 2А. Скорочення реєстрували на одному препараті в різні моменти часу протягом першої години після внесення препарату в робочу камеру (так зване "впрацювання" препарату).

Нормована швидкість скорочення гладеньком'язових смужок шлунку за стимуляції гіперкалієвим розчином становила $4,33 \pm 0,21 \text{ c}^{-1}$, амплітуда – $61 \pm 2,56 \text{ мН}$. Аналогічні показники для гладеньком'язових смужок сліпої кишки становили: $4,72 \pm 0,35 \text{ c}^{-1}$ та $65 \pm 4,2 \text{ мН}$.

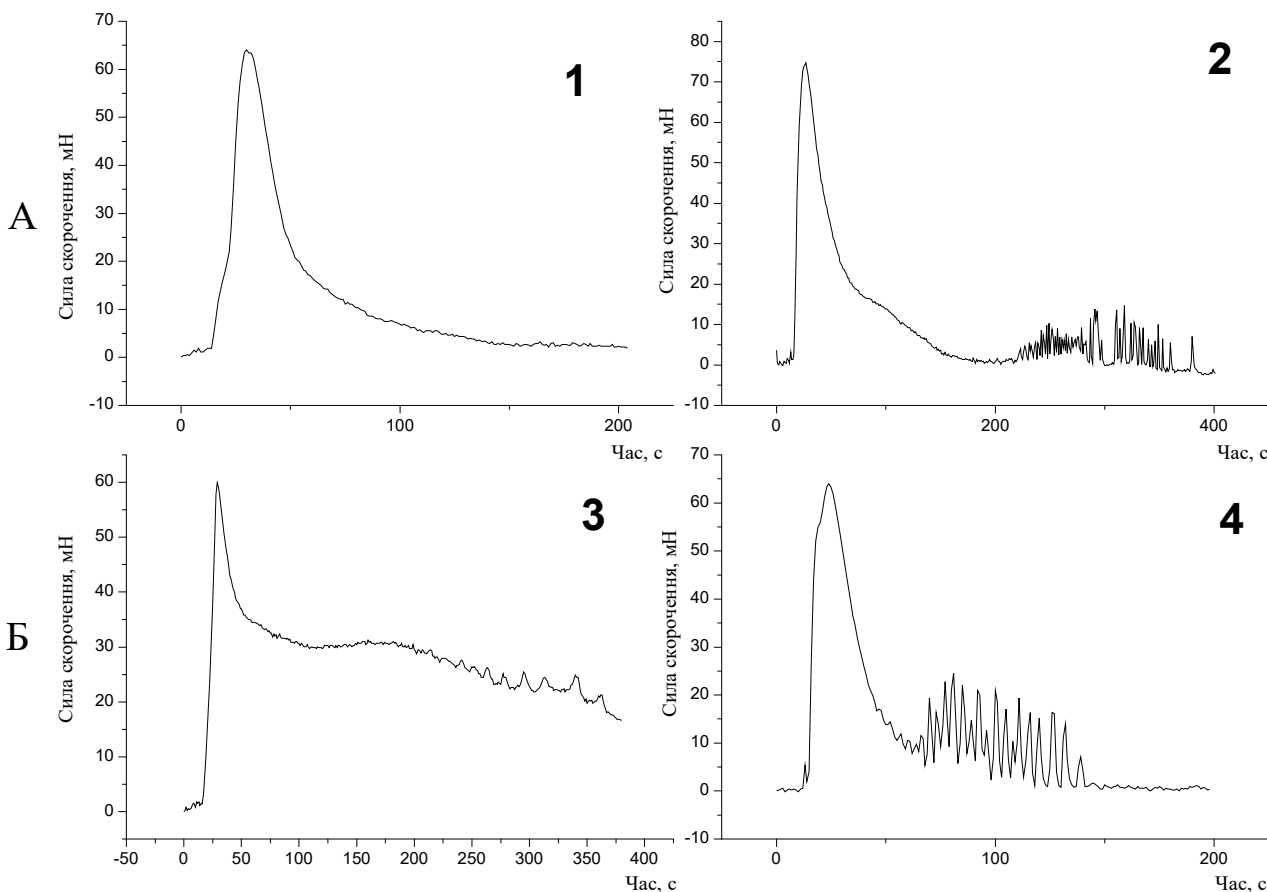


Рис.2. Механокінетика ізометричних скорочень гладеньком'язових препаратів шлунку (1, 3) та саесит (2, 4), що були викликані аплікацією гіперкалієвого розчину (80мМ) (А) та карбахоліну (Б)

З метою подальшого розширення сфери використання вищезазначеного методу реєстрації, були зареєстровані ізометричні скоротливі відповіді, що викликані стимуляцією карбохоліном (Рис. 2Б.). Отримані механокінетичні криві характеризувалися наступними кінетичними параметрами: нормована максимальна швидкість скорочення гладеньком'язових препаратів шлунку складала $5,43 \pm 0,24 \text{ c}^{-1}$, амплітуда $65 \pm 4 \text{ мН}$, для саесум – $6,06 \pm 0,29 \text{ c}^{-1}$ та $71 \pm 4 \text{ мН}$.

Таким чином, отримані параметри скорочень гладеньких м'язів відповідають літературним даним [3, 6, 7], що дозволяє використовувати розроблений метод вимірювання для реєстрації сили та швидкості скорочень гладеньких м'язів різних відділів шлунково-кишкового тракту.

Показником нормальної функціональної активності гладеньких м'язів являється їх спонтанна активність. Саме тому нами було перевірено можливість її реєстрування розробленою оптичною системою (Рис. 3).

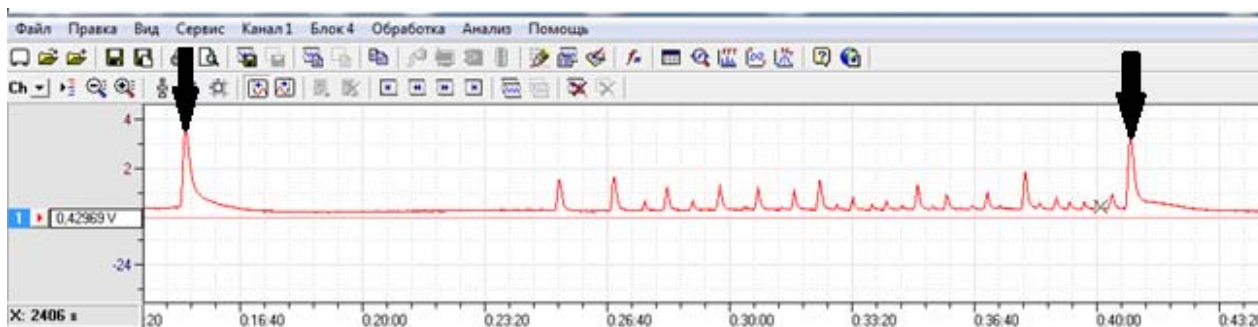


Рис.3. Спонтанна активність гладеньком'язового препарату при стимуляції гіперкалієвим розчином (моменти стимуляції показані стрілками)

Висновки. Таким чином, по-перше, незалежно від природи стимулу, який індукував скорочення (калієва деполаризація, карбохолін), отримані механокінетичні криві дуже добре відтворювалися. По-друге, значення таких механокінетичних параметрів, як нормована максимальна швидкість V_n та амплітуда відповідають літературним даним. Таким чином розроблений оптико-механічний метод реєстрації скорочення гладеньких м'язів є цілком придатним для реєстрації ізометричних скорочень гладеньких м'язів шлунку та саесум щурів і, відповідно, для вивчення впливу різних ефекторів на їхню механокінетику.

Список використаних джерел

1. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: I. Concentration-effect curves for agonists / [R. Barlow, S. Bond, C. Grant et al.]. // British Journal of Pharmacology. – 2001. – N133. – P. 1081–1086.
2. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: II. Concentration-effect curves for physiological antagonists / [R. Barlow, S. Bond, C. Grant et al.]. // British Journal of Pharmacology. – 2001. – N133. – P. 1087–1095.
3. Burdyga T. V. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / T. V. Burdyga, S. A. Kosterin. // General Physiology and Biophysics – 1991. – N10. – P. 589–598.
4. Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review / Sanders. // Journal of Applied Physiology – 2001. – N91. – P. 1438–1449.

5. Shuba M. F. Mechanisms of the inhibitory action of neurotransmitters on smooth muscles / M. F. Shuba, I. A. Vladimirova, I. B. Philippov. // Neurophysiology. – 2003. – N35. – С. 252–261.
6. Webb R. C. Smooth muscle contraction and relaxation / Webb. // American Physiology Society. – 2003. – N27. – P. 201–206.
7. Механокінетика "скорочення-розслаблення" кільцевого м'язу сліпої кишки (саесум) щурів // – 2006. – Т.14, № 3. – С. 63–75. / О. В. Онуфрійчук, О. В. Цимбалюк, М. С. Мірошніченко, С. О. Костерін. // Фізика живого. – 2006. – №3. – С. 63–75.

References

1. Barlow RB, Bond SM, Grant C, McQueen DC, Yaqoob Z. A comparison of effect measured with isotonic and isometric recording: I. Concentration-effect curves of oragonists. British Journal of Pharmacology 2001;133:1081-5.
2. Barlow RB, Bond SM, Grant C, McQueen DC, Yaqoob Z. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: II. Concentration-effect curves of or physiological antagonists. British Journal of Pharmacology. 2001;133:1087-8.
3. Burdyga TV, Kosterin SA. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. General Physiology and Biophysics. 1991;10:589-9.
4. Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. Journal of Applied Physiology 2001;91:1438-11.
5. Shuba MF, Vladimirova IA, Philippov IB. Mechanisms of the inhibitory action of neurotransmitters on smooth muscles. Neurophysiology. 2003;35:252-9.
6. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. American Physiology Society. 2003;27:201-5.
7. Onufryyuchuk OV, Tsybalyuk OV, Miroshnychenko MS. Kosterin S.O. [Mechanokinetic "contraction-relaxation" circular muscle of caecum rats]. Phizyka Zhivogo. 2006;3:63-12.

Надійшла до редколегії 31.05.16

П. Вирич, асп., О. Шелюк, канд. биол. наук, В. Мартынюк, д-р биол. наук, С. Чумаков, инж. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ В ИЗОМЕТРИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

Была разработана оптическая система регистрации сокращения гладких мышц в изометрическом режиме. Тестирование системы проводили на гладкомышечных полосках желудка и саесит крысы. Было проверено возможность регистрации разработанной оптической системой спонтанной активности гладких мышц. Полученные параметры мышечных сокращений соответствуют литературным данным. Таким образом, разработан оптико-механический метод регистрации силы и скорости можно использовать для записи изометрических сокращений гладких мышц желудка и саесит крыс и, соответственно, для изучения влияния различных эфекторов на их механокинетику.

Ключевые слова: гладкие мышцы, изометрическое сокращение, механокинетические параметры.

P. Virych, PhD Stud., O. Shelyuk, PhD., V. Martynyuk, Dr. of Sci., S. Chumakov, Eng. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE OPTICAL REGISTRATION SYSTEM ISOMETRIC CONTRACTION SMOOTH MUSCLE

The optical system registration of smooth muscle contraction in isometric mode was developed. Testing of system on smooth muscle strips of rat stomach and caecum was performed. It was tested the possibility of recording optical system spontaneous activity of smooth muscle. The resulting muscle contractions parameters correspond to the literature. Thus designed optical-mechanical method for detecting force and speed can be used for recording isometric contractions of smooth muscles of the stomach and caecum of rats and, therefore, to study the effect of different effectors their mechanokinetic.

Keywords: smooth muscle, isometric contractions, mechanokinetic parameters.