5. *Іванова А. М.* Вплив застосування препарату «Глутаргін» на перебіг відновних процесів у кваліфікованих спортсменів, що спеціалізуються з академічного веслування / А. М. Іванова // Спортивна медицина. – 2012. – № 2. – С. 102–106.

6. *Гумінська О. Ю.* Перспективи застосування «Квертину» за умов хронічного медикаментозного гепатиту у статевонезрілих щурів / О. Ю. Гумінська, Н. А. Рикало // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2013. – № 2. – С. 76–78.

7. *Особливості* клітинного циклу клітин тимусу щурів після опікового ураження шкіри / Е. В. Черкасов, І. В. Гунас, І. Л. Черешнюк, Д. А. Лисенко // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 109–113.

8. *Adolescent* binge alcohol exposure alters hippocampal progenitor cellproliferation in rats: effects on cell cycle kinetics / J. A. McClain, D. M. Hayes, S. A. Morris, K. Nixon // J. Comp Neurol. – 2011. – Vol. 519 (13). – P. 2697–2710.

9. *Clemens D. L.* Ethanol metabolism activates cell cycle checkpoint kinase, Chk2 / D. L. Clemens, K. J. Mahan Schneider, R. F. Nuss // Alcohol. – 2011. – N 45 (8). – P. 785–793.

УДК 616.36-004:599.323.4:547.495.9:547.814.5:591.81

Н. А. Рикало, Л. О. Яровенко

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАЗ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ЯДЕР ГЕПАТОЦИТІВ У ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ПРИ ХРОНІЧНОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ УШКОДЖЕННІ ПЕЧІНКИ ТА МЕДИКАМЕНТОЗНІЙ КОРЕКЦІЇ КВЕРЦЕТИНОМ І L-АРГІНІНОМ L-ГЛУТАМАТОМ

Алкогольні ушкодження печінки поширені в Україні та мають високу летальність. У статті представлені дані щодо визначення вікових особливостей клітинного циклу гепатоцитів у щурів за умов хронічного алкогольного ушкодження печінки. Установлено, що найбільш чутливі до токсичної дії етанолу при хронічній алкогольній інтоксикації є гепатоцити статевонезрілих і старих щурів. Доведено, що у молодих статевозрілих самок щурів захисні механізми та репаративна регенерація печінки є найвищими, тимчасом як у старих щурів відмічено достовірне зниження мітотичної активності.

Ключові слова: етанол, алкогольне ушкодження печінки, клітинний цикл, вікові особливості.

UDC 616.36-004:599.323.4:547.495.9:547.814.5:591.81

N. A. Rykalo, L. O. Yarovenko

STUDYING THE PHASE OF THE HEPATOCYTES NUCLEI CELL CYCLE IN RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS WITH CHRONIC ALCOHOLIC LIVER DAMAGE AND QUERCETIN AND L-ARGININE L-GLUTAMATE PHARMACOLOGICAL THERAPY

Alcoholic liver damage is common in Ukraine and has a high mortality rate. The paper presents the data to determine the age characteristics of the hepatocytes cell cycle in rats under chronic alcoholic liver damage. It was found that immature and old rats are the most sensitive to the toxic effects of ethanol in chronic alcohol intoxication hepatocytes. It is proved that young females mature rats have the highest defense mechanisms and reparative regeneration of the liver, while in old rats there is noted a significant decrease in mitotic activity.

Key words: ethanol, alcohol liver damage, cell cycle, age features.

УДК 616.314.17-002.2-092:616.017.1-0764

М. М. Стешенко, *канд. біол. наук,*
О. О. Гончар, *канд. біол. наук,*
І. М. Маньковська, *д-р мед. наук*

ДИНАМІКА ЗМІН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ В МІТОХОНДРІЯХ МІОКАРДА ТА МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ

Вступ

Одна з важливих проблем сучасності — дослідження реакцій організму людини та тварин на стресорні впливи різного походження і процесів адаптації до них. Причиною стресу можуть бути різноманітні фактори: біль, переохолодження, психологічне або соціальне напруження тощо. Однак усі вони запускають подібні механізми відповіді на стрес, що спрямовані на підтримання сталості внутрішнього середовища організму [1]. Однією з ендогенних стрес-лімітуючих систем, що модулює стрес-реакцію та забезпечує адаптацію, є антиоксидантна система організму.

Мітохондрії — головне внутрішньоклітинне джерело активних форм кисню (АФК), вони відіграють особливу роль як у процесах оксидативного ушкодження клітин та їх компонентів за умов стресу, так і в ініціації адаптаційних процесів стрес-відповіді, зокрема шляхом активації генетичних регуляторних механізмів. У літературі є багато даних про вплив тривалого іммобілізаційного стресу на загальний ступінь оксидативного ушкодження та функціональної активності антиоксидантної системи в різних тканинах і плазмі крові [2], однак порушення про- й антиоксидантного балансу (ПАБ) за таких умов на рівні мітохондрій вивчені недостатньо.

Іншим важливим аспектом є динаміка таких порушень за

умов стресу. Відомо, що нейрогуморальна регуляція відповіді на іммобілізаційний стрес значною мірою залежить від тривалості іммобілізації [2]. За класифікацією Сельє, виділяють три послідовні ключові стадії розвитку адаптаційної відповіді на стрес: тривоги, резистентності та виснаження. Логічним видається дослідити зміни в ПАБ мітохондрій, що супроводжують розвиток цих стадій.

Метою нашого дослідження стало виявлення змін ПАБ у мітохондріях міокарда та мозку щурів за умов іммобілізаційного стресу різної тривалості.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200–220 г, які знаходилися на стандартному раціоні віварію. Перед дослідженням тварин розподілили на такі групи: 1-ша — контроль; 2-га, 3-тя, 4-та — тварини, що піддавалися дії тривалого іммобілізаційного стресу (ІС, по 6 год щодня) протягом 3, 7 та 14 діб відповідно. Усі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1986) та положення комітету з біоетики Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України.

Для іммобілізації тварин застосовувалися плексигласові індивідуальні клітки-утримувачі видовженої форми об'ємом близько 320 см^3, у яких тварини знаходилися в горизонтально зафіксованому положенні протягом 6 год щодня. Оцінку ефективності відтворення стресу проводили за зміною концентрації кортикостерону у крові, яку вимірювали за допомогою флуориметричного методу [3].

З тканин міокарда та мозку щурів виділяли мітохондрії методом диференційного центрифугування [4]. Мітохондріальні білки солюбілізували в суспензії шляхом додавання 1 % розчину Triton X-100. Ступінь оксидативного ушкодження мітохондрій оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [5], рівнем окисної модифікації білків (ОМБ) [6] і вмістом супероксидрадикала [7], антиоксидантний захист — за активністю Mn-супероксиддисмутази (Mn-СОД) [8], каталази [9] та глутатіонпероксидази (ГП) [10]. Вміст білка визначали за методом Бредфорда.

Одержані результати обробляли статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження маркерів стресу у щурів при тривалій іммобілізації виявило ознаки розвитку вираженої стрес-реакції, що супроводжувалась інволюцією тимуса та збільшенням маси надниркових залоз. Концентрація кортикостерону у крові збільшувалася з (1,29±0,06) мкмоль/л у контрольній групі до (1,65±±0,09) мкмоль/л на 3-тю добу іммобілізації, через 7 діб — знижувалася до (0,91±0,05) мкмоль/л, а через 14 діб — була майже вдвічі нижчою щодо контролю — (0,69±0,04) нмоль/л. Отже, зміни вмісту кортикостерону у крові щурів відтворюють стадії стресу: тривоги, резистентності та виснаження [1].

При щоденній іммобілізації, на 3-тю добу в мітохондріях міокарда відзначалося підвищення вмісту ТБК-АП на 49 % порівняно з контролем, тимчасом як вміст ОМБ та супероксидрадикала залишався близьким до контрольних значень (рис. 1, *а*). У мітохондріях мозку, на відміну від мітохондрій міокарда, поряд із підвищенням рівня ТБК-

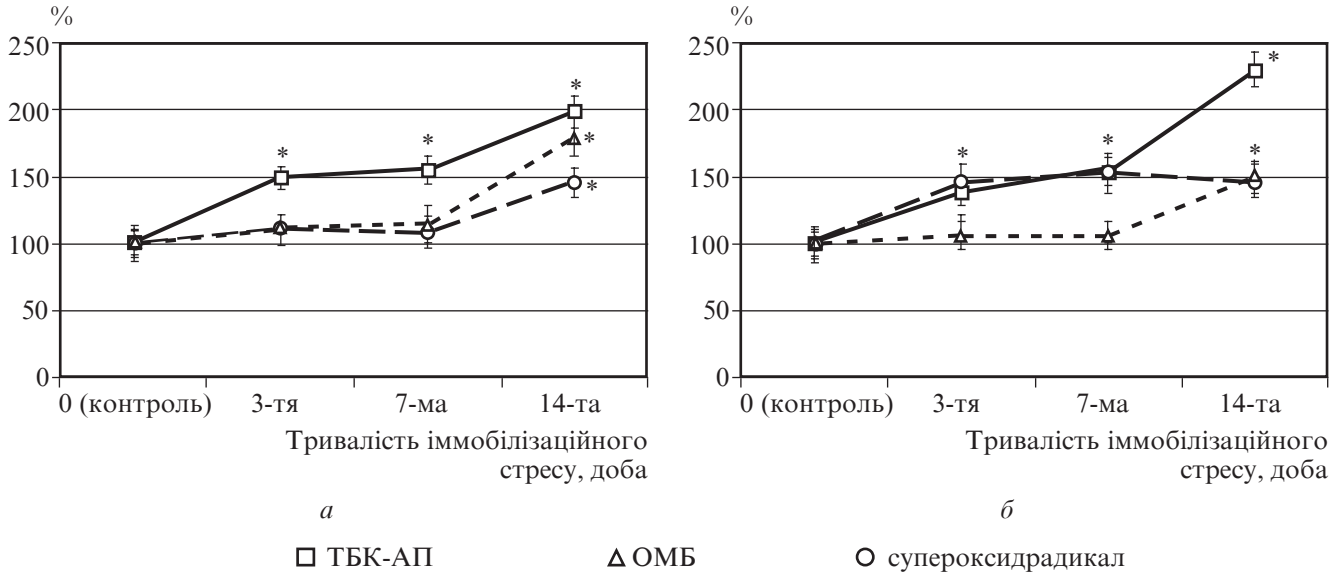

Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів, окисно-модифікованих білків і супероксидрадикала в мітохондріях міокарда *(а)* та мозку *(б)* щурів за умов іммобілізаційного стресу різної тривалості (вміст відповідних метаболітів у мітохондріях тварин контрольної групи прийнято за 100 %): * — $p<0,05$ щодо контролю

АП на 38 %, спостерігалося також зростання вмісту супероксидрадикала на 45 % порівняно з контролем (рис. 1, *б*). На 7-му добу іммобілізації вищезазначені показники оксидативного стресу залишалися без значних змін і знаходилися на рівні відповідних показників 3-ї доби іммобілізації. Таке підвищення вмісту АФК у мітохондріях міокарда та мозку в перші дні іммобілізації можна пояснити посиленням стрес-індукованих адренергічних впливів на ці тканини у відповідь на стрес. Так, відомо, що інтенсифікація утворення АФК за умов стресу може відбуватися внаслідок автоокиснення адреналіну, гіперстимуляції адренорецепторів, стимуляції неспецифічних β- та α-фосфоліпаз і порушення балансу Ca^{2+} з наступним каскадом синтезу простагландинів та утворення АФК у процесі їх метаболізму [2].

При подальшій іммобілізації, на 14-ту добу відзначалося значне підвищення вмісту ТБК-АП, ОМБ та супероксидрадикала як у мітохондріях міокарда (на 98, 79 і 45 % відповідно; див. рис. 1, *а*), так і в мітохондріях мозку (129, 49 і 46 %; див. рис. 1, *б*) порівняно з контрольною групою. Необхідно зазначити значне підвищення рівня ОМБ мітохондрій на 14-ту добу іммобілізації, що може свідчити про некомпенсованість вільнорадикальних процесів з боку антиоксидантної системи.

Посилення оксидативних процесів при тривалій іммобілізації супроводжувалося також змінами в системі антиоксидантного захисту, зокрема активності Mn-СОД, каталази та ГП. Було показано, що після 3 діб щоденної іммобілізації в мітохондріях міокарда спостерігалося зростання активності Mn-СОД — на 40 %, каталази — на 31 %, ГП — на 49 % порівняно з контролем (рис. 2). Подібні зміни реєструвалися в мітохондріях мозку, де активність Mn-СОД збільшувалася на 39 % і ГП — на 53 % щодо контролю. При подальшій іммобілізації, на 7-му добу активність досліджуваних антиоксидантних ферментів залишалася на рівні показників 3-ї доби іммобілізації з деякою тенденцією до зниження, проте була вищою за контрольні значення. Таке підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту у перші 7 діб іммобілізаційного стресу, ймовірно, розвивалось як компенсаторна відповідь на зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів і супероксидрадикала в мітохондріях.

На 14-ту добу іммобілізаційного стресу в мітохондріях міокарда відзначалося зниження активності Mn-СОД на 19 %,

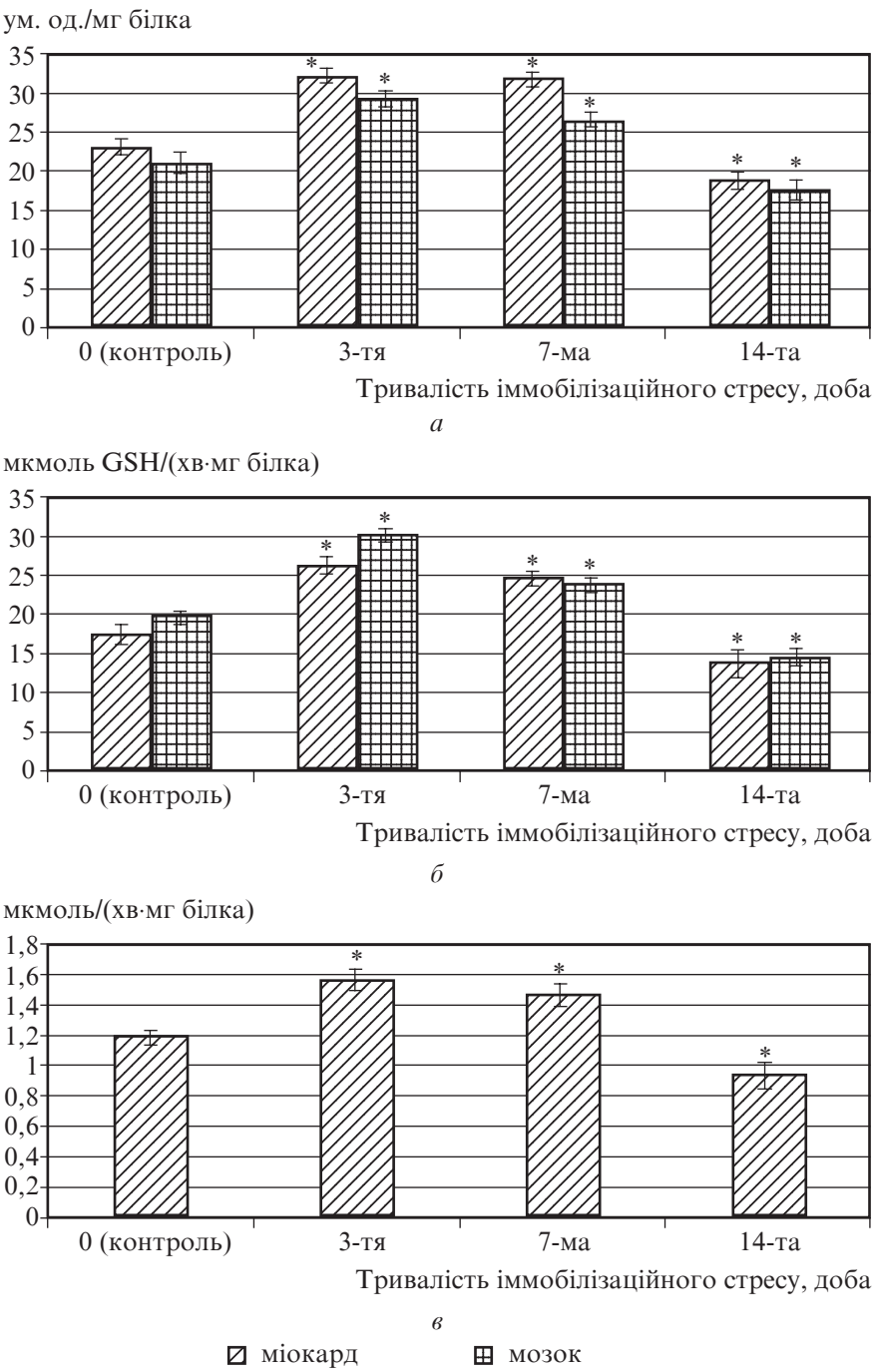

Рис. 2. Активність антиоксидантних ферментів (*а* — супероксиддисмутази; *б* — глутатіонпероксидази; *в* — каталази) у мітохондріях міокарда та мозку щурів за умов іммобілізаційного стресу різної тривалості: * — $p<0,05$ щодо контролю

ГП — на 23 % і каталази — на 21 % щодо контролю (див. рис. 2). У мітохондріях мозку активність Mn-СОД і ГП також знижувалася на 17 і 26 % відповідно. Ці дані корелюють зі змінами рівня кортикостерону й узгоджуються з результатами інших дослідників, що показали подібну динаміку змін при тривалому хронічному стресі різного походження [2]. Зниження активності основних ферментів антиоксидантного захисту, що супроводжувалось інтенсифікацією оксидативних процесів, може бути наслідком виснаження стрес-лімітуючих систем організму в результаті тривалої дії іммобілізаційного стресу. Так, згідно з моделлю адаптивної відповіді на стрес, при довготривалому впливі патогенного подразника адаптаційні можливості організму можуть вичерпуватися, що викликає втрату резистентності та розвиток наступної стадії стрес-відповіді — виснаження [1].

Таким чином, тривалий іммобілізаційний стрес викликав порушення ПАБ у мітохондріях міокарда та мозку щурів, фізіологічне значення і вираженість яких змінювалися залежно від його тривалості. У перші 7 діб іммобілізація тварин призводила до значної активації антиоксидантної системи мітохондрій у відповідь на посилення перекисного окиснення ліпідів і продукції супероксидрадикала, тимчасом як при більш тривалій іммобілізації (14 діб) такої активації не відбувалося, і навпаки, активність досліджуваних антиоксидантних ферментів знижувалася. Це, у свою чергу, призводило до ще більшого нагромадження активних кисневих радикалів і значного підвищення вмісту окисномодифікованих білків у мітохондріях міокарда та мозку.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Барабой В. А.* Фізіологія, біохімія і психологія стресу : монографія / В. А. Барабой, О. Г. Резніков. – К. : Інтерсервіс, 2013. – 314 с.

2. *Sahin E.* Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system / E. Sahin, S. Gumuslu // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2007. – Vol. 144, N 4. – P. 342–347.

3. *Балашов Ю. Г.* Флюориметрический микрометод определения кортикостерона : сравнение с другими методами / Ю. Г. Балашов // Физиологический журнал СССР. – 1990. – Т. 76, № 2. – С. 280–283.

4. *Mela L.* Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue / L. Mela, S. Seitz // Methods in Enzymology. – 1979. – Vol. 55. – P. 39–46.

5. *Стальная И. Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – 1977. – С. 66–68.

6. *Дубинина Е. Е.* Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина, М. Г. Морозова, Н. В. Леонова // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 4. – С. 42–46.

7. *Kuthan H.* A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems / H. Kuthan, V. Ullrich, R. Estabrook // Biochem. J. – 1982. – Vol. 203. – P. 551–558.

8. *Misra H.* The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay super-oxide dismutase / H. Misra, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, N 10. – P. 3170–3175.

9. *Метод* определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

10. *Магазвіс В. М.* Визначення активності глутатіонпероксидази / В. М. Магазвіс, А. О. Міхєєв, Ю. С. Роговий // Сучасні методи експериментальної та клінічної дослідної центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії. – 2001. – С. 13–15.

УДК 616.314.17-002.2-092:616.017.1-0764

М. М. Стешенко, О. О. Гончар, І. М. Маньковська

ДИНАМІКА ЗМІН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ В МІТОХОНДРІЯХ МІОКАРДА ТА МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Вивчали вплив тривалого іммобілізаційного стресу на розвиток стрес-реакції та зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу мітохондрій міокарда та мозку щурів. Було показано, що в перші 7 днів дії хронічної іммобілізації в мітохондріях відбувалося підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів й супероксидрадикала, що супроводжувалося компенсаторним зростанням активності ферментів антиоксидантного захисту. При збільшенні тривалості іммобілізації спостерігалося виснаження антиоксидантної системи та значне посилення оксидативних процесів. Дані порушення корелювали з динамікою змін концентрації кортикостерону у крові тварин і прояву інших маркерів стресу.

Ключові слова: іммобілізаційний стрес, мітохондрії, прооксидантно-антиоксидантний баланс.

UDC 616.314.17-002.2-092:616.017.1-0764

M. M. Steshenko, O. O. Gonchar, I. M. Mankovska

THE DYNAMICS OF PROOXIDATIVE/ANTIOXIDATIVE BALANCE CHANGES IN MYOCARDIAL AND BRAIN MITOCHONDRIA DURING IMMOBILIZATION STRESS

The influence of prolonged immobilization stress on stress-response development and prooxidative/antioxidative balance in myocardial and brain mitochondria of rats was studied. It has been shown that during the first 7 days of immobilization the intensity of lipid peroxidation and the amount of superoxide in mitochondria increased, which led to consequent rise in antioxidant enzymes activity. Further immobilization exhausted antioxidant defense and caused significant intensification of oxidative processes. This response of antioxidant system was correlated with dynamics of changes in blood corticosterone concentration.

Key words: immobilization stress, mitochondria, prooxidative/antioxidative balance.