

*break off. Autoimmune damage mechanisms and beta-cells necrosis developed. The process of inflammation caused decreasing of Insulin and C-peptide levels on 60<sup>th</sup> days.*

**Key words:** *experimental diabetes, Streptozotocin, Insulin, C-peptide, Glucagon.*

Стаття надійшла до редакції 25.04.2014 р.

*Зяблицев Сергій Володимирович* - професор кафедри патологічної фізіології ДонНМУ ім. М. Горького, завідувач відділом молекулярно-генетичних досліджень ЦНДЛ, доктор медичних наук; +38 062 295-03-26  
*Ролінська Лариса Михайлівна* - лікар Донецької обласної клінічної лікарні.

© Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Іваненко Т.В., Жулінський В.О.

УДК: 616-008.922.1"735"

**Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Іваненко Т.В., Жулінський В.О.**

Запорізький державний медичний університет, кафедра патофізіології (м.Запоріжжя, просп. Маяковського, 26, 69035, Україна)

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ VCL-2, P53 ТА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ В ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦЯХ ПІД ВПЛИВОМ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТУ

**Резюме.** *В останній час зберігається цікавість до використання немедикаментозних методів профілактики і лікування хвороб. До них відноситься, в тому числі, і переривчаста гіпоксія як природний стимул неспецифічної резистентності організму людини. Одним із примітних, але мало вивчених ефектів дозованої гіпоксії, є її вплив на ендокринний апарат підшлункової залози. У статті проводиться аналіз експресії маркерів апоптоза і проліферативної активності бета-клітин у щурів після багатоденних гіпоксичних тренувань. Отримані результати свідчать про стимулюючу дію переривчастої гіпоксії на деякі молекулярні механізми бета-ендокриноцитів.*

**Ключові слова:** *переривчаста гіпоксія, апоптоз, проліферативна активність, бета-клітини підшлункової залози.*

### Вступ

В останній час зберігається цікавість до використання немедикаментозних методів профілактики і лікування хвороб. До них можна віднести фітотерапію, лікувальне голодування, детоксикацію, магнітно-лазеротерапію, галотерапію в соляних печерах, ряд інших методів і підходів. У це коло вписується і переривчаста гіпоксія (ПГ) як природний стимул неспецифічної резистентності організму людини. На сьогоднішній день відомо, що наслідком дозованого впливу гіпоксичного фактора є не тільки розвиток типового патологічного процесу, скільки прояв саногенних ефектів [Холден, Пристли, 1935, Караш і др., 1988, Belaidi et al., 2009, Katayama et al., 2009]. На практиці дозувати дію гіпоксії можливо не тільки в умовах середньогір'я, але і шляхом моделювання високогірних умов у барокамерах. За допомогою такого роду технічних пристроїв, представляється можливим використання штучно створеної переривчастої гіпоксії.

Переривчаста гіпоксія - це немедикаментозний метод підвищення неспецифічної резистентності організму до пошкоджень чинників зовнішнього та внутрішнього середовища, який забезпечує розвиток в організмі дозованої за глибиною і часом гіпоксії. Досягнення ефекту гіпоксичного впливу визначається сумарною тривалістю сеансу, величиною і швидкістю зниження парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі. Важливо, що при різкому падінні  $pO_2$ , виникає гострий розвиток важких гіпоксичних станів, тоді як при повільному падінні  $pO_2$  ефект переривчастої гіпоксії і компенсація гіпоксичного стану поширюються не тільки на мо-

мент сеансу гіпоксичних тренувань (у нашому випадку це 6 годин), але і в постгіпоксичний період, котрий у нашому випадку є періодом повної відсутності гіпоксичних впливів.

Висока ефективність ПГ обумовлена оптимальним поєднанням безпосередніх реакцій основних систем організму на дозовану гіпоксію з довготривалою адаптацією. Гіпоксичний вплив при цьому не виходить за рамки фізіологічного, а механізм реалізації підвищення енергозабезпечення організму має генетично обумовлений характер. ПГ не вступає в протиріччя з іншими способами профілактики і лікування, включаючи медикаментозні, хірургічні тощо. Більш того, має здатність нейтралізувати побічні ефекти останніх. Вивчення побічних ефектів показало, що в основі саногенної дії ПГ лежить стимуляція функціонального стану органів і систем, відповідальних за транспорт і утилізацію кисню в організмі, тобто серцево-судинну та дихальну системи, еритроцити. Поряд із цим ПГ активує функціональний стан нейроендокринної системи, формуючи необхідний гормональний базис розвитку адаптаційних процесів в організмі [Колесник, Абрамов, 1992, 1993, Колесник і др., 2004].

Одним із примітних, але мало вивчених ефектів ПГ є її вплив на ендокринний апарат підшлункової залози [Колесник, Абрамов, 1992, 1993, Абрамов, 1997, Колесник і др., 2010]. Раніше було показано, що ПГ призводить до збільшення питомої чисельності інсулін-позитивних клітин на 68% у співвідношенні з інтактними щурами [Іваненко, 2011, Іваненко, Кузьо, 2011, Абра-

мов и др., 2011]. Відомо, що зміна чисельності клітинної популяції контролюється процесами клітинної проліферації та клітинної загибелі.

**Мета дослідження:** вивчити експресію маркерів апоптоза і проліферативної активності бета-клітин у щурів після багатоденних гіпоксичних тренувань.

### Матеріали та методи

Дослідження проведені на 30 щурах (самцях) лінії Вістар масою 250-270 г., котрі були розподілені на 3 експериментальні групи по 10 особин в кожній: 1 групу становили інтактні щури; 2 групу щури з 15-денними гіпоксичними тренуваннями; та 3 група з 10-денним постгіпоксичним періодом. ПГ моделювали в барокамері де тварини знаходились по 6 годин щоденно, з 1 по 5 день на висоті 1000-5000 м над рівнем моря, а з 6 дня на висоті 6000 м, що відповідає концентрації кисню в повітрі 9,8% ( $pO_2=74,2$  мм Hg).

Для вивчення проліферативної активності ендокриноцитів всім тваринам щоденно на протязі 7 останніх днів експерименту вводили 5-бромдезоксіуридин (BrdU) в дозі 40 мг/кг внутрішньоочеревинно.

Для оцінки інтегративного показника проліферативної активності ендокриноцитів, ми пропонуємо розрахунковий індекс (BrdU індекс) проліферації за формулою (1):  $BrdU\text{-індекс} = N/I \times 100\%$ , де N - кількість BrdU-імунопозитивних клітин на  $cm^2$ ; I - кількість інсулін-імунопозитивних клітин.

Для оцінки інтенсивності синтезу антиапоптотичних білків в ендокриноцитах, ми запропонували індекс (Bcl-2 індекс) антиапоптотичної активності за формулою (2):  $Bcl2\text{-індекс} = B/I \times 100\%$ , де B - кількість Bcl2-імунопозитивних клітин на  $cm^2$ ; I - кількість інсулін-імунопозитивних клітин.

Для оцінки інтенсивності синтезу проапоптотичних білків в ендокриноцитах, ми запропонували індекс (p53 індекс) проапоптотичної активності за формулою (3):  $p53\text{-індекс} = P/I \times 100\%$ , де P - кількість p53-імунопозитивних клітин на  $cm^2$ ; I - кількість інсулін-імунопозитивних клітин.

Для інтегральної оцінки про- і анти-апоптотичних процесів в ендокриноцитах ми пропонуємо індекс апоптоза за формулою (4):  $Індекс\ апоптоза = P/B \times 100\%$ , де P - кількість p53-імунопозитивних клітин на  $cm^2$ ; B - кількість Bcl2-імунопозитивних клітин на  $cm^2$ .

Щурів виводили з експерименту декапітацією під наркозом. Підшлункову залозу фіксували в розчині Буена і після стандартної гістологічної обробки заключали в парапласт (MkCormick, США). На мікротомі Microm H235 (Німеччина) готували 5 мікронні зрізи з різних частин підшлункової залози, котрі після депарафінізації і регідратації оброблювали антитілами до інсуліну (Peninsula Lab. Inc., Великобританія), білку Bcl-2 (Santa Cruz, США), білку p53 (Santa Cruz, США), антитілами до BrdU (Sigma, США). В якості вторинних антитіл використовували IgG коньюгований з FITC (Sigma,

США). Аналіз імунофлюоресцентної реакції проводили на системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Contron Elektronik, Німеччина) за допомогою флюоресцентного мікроскопа Axioskop з високоімерсійним світлофільтром 38HE та відеокамери Axiosam HRm (Zeiss, Німеччина). Дані отримані в експерименті обробляли пакетом прикладних та статистичних програм VIDAS-2,5 (Contron Elektronik, Німеччина) та Excell-2003 (США). Для оцінки достовірності відмінностей в групах використовували t-критерій Стьюдента (Pst).

### Результати. Обговорення

Нами було встановлено, що кількість BrdU-імунопозитивних ендокриноцитів по закінченні ПГ збільшувалася на 64% (Pst<0,05), що практично відповідає приросту питомої чисельності бета-клітин (табл. 1). Після 10 днів постгіпоксичного періоду чисельність BrdU-імунопозитивних ендокриноцитів в панкреатичних острівцях зменшувалася і ставала достовірно нижче на 10% (Pst<0,05), ніж у контрольних щурів.

Як видно з розрахункових показників (табл. 2), ПГ не змінювала індекс проліферативної активності, тоді як через 10 днів після закінчення дії ПГ даний показник достовірно знижувався, порівняно з показником контрольних щурів. Отже, збільшення питомої кількості бета-ендокриноцитів у підшлунковій залозі щурів не можна пояснити стимуляцією їх проліферативної ак-

**Таблиця 1.** Питома кількість імунопозитивних клітин у панкреатичних острівцях ( $M \pm m$ ).

Кількість клітин / $cm^2$ зрізу залози	Здорові (контроль)	Переривчаста гіпоксія	
		По закінченні	Через 10 днів
Інсулін-імунопозитивні	5209±389	8765±484*	6583±400*#
BrdU- імунопозитивні	988±5	1627±6*	904±1*#
Bcl2- імунопозитивні	626±5	707±5*	528±3*#
p53- імунопозитивні	1257±8	885±3*	470±2*#

**Примітки:** (\*) - достовірні (Pst<0,05) відмінності по відношенню до показників у контрольних щурів; (#) - достовірні (Pst<0,05) відмінності по відношенню до показників після закінчення ПГ.

**Таблиця 2.** Індеси активності молекулярних маркерів у панкреатичних острівцях ( $M \pm m$ ).

Індекс	Здорові (контроль)	Переривчаста гіпоксія	
		По закінченні	Через 10 днів
проліферативної активності	18,97±0,10	18,57±0,07	13,73±0,03*#
антиапоптотичної активності	12,02±0,09	8,06±0,05*	8,03±0,04*
проапоптотичної активності	24,12±0,15	10,09±0,03*	7,14±0,03*#
Апоптоза	2,000±0,012	1,253±0,006*	0,890±0,005*#

**Примітки:** (\*) - достовірні (Pst<0,05) відмінності по відношенню до показників у контрольних щурів; (#) - достовірні (Pst<0,05) відмінності по відношенню до показників після закінчення ПГ.

тивності в результаті багатоденної дії переривчастої гіпоксії.

Іншим процесом, який може впливати на чисельність ендокриноцитів, є інтенсивність клітинного апоптоза. Одними з добре вивчених молекулярних маркерів апоптоза є антиапоптотичний білок Bcl-2 та проапоптотичний білок p53.

Ідентифікація маркерів апоптоза імуногістохімічним методом в панкреатичних острівцях показала, що чисельність Bcl2 позитивних ендокриноцитів при закінченні ПГ достовірно збільшилася на 12% ( $P < 0,05$ ) у порівнянні з показником контрольних щурів (див. табл. 1). Проте, після закінчення 10 днів постгіпоксичного періоду, чисельність Bcl2 позитивних ендокриноцитів достовірно знижувалася як в порівнянні з інтактними тваринами так і в групі щурів через 10 днів після закінчення періоду дії ПГ.

Отримані результати показали, що ПГ призводить до істотного зниження індексу антиапоптотичної активності на 23% ( $P < 0,05$ ), порівняно з показником контрольних щурів (див. табл. 2). А в постгіпоксичний період величина індексу антиапоптотичної активності достовірно не змінювалася.

Разом із тим, ПГ призводить до зменшення чисельності p53 імунопозитивних ендокриноцитів на 40% ( $P < 0,05$ ), порівняно з показником контрольних щурів (див. табл. 1). А в постгіпоксичний період кількість p53 імунопозитивних ендокриноцитів знижувалася практично вдвічі.

Отримані результати показали, що ПГ призводить до істотного зниження індексу проапоптотичної активності майже у 2,5 рази у порівнянні з показником контрольних щурів (див. табл. 2). Даний показник продовжував знижуватися і в постгіпоксичний період, знижуючись в 3,5 рази у порівнянні з інтактними щурами.

Таким чином, отримане в нашому попередньому дослідженні підвищення на 68% ( $P < 0,05$ ) питомої чисельності бета-ендокриноцитів під впливом ПГ, вочевидь можна пояснити значним гальмуванням про-

цесів апоптоза в панкреатичних острівцях, що проявляється зменшенням синтезу проапоптотичного білка p53. Отже, можна припустити те, що ПГ оберігає бета-клітини від природної загибелі.

Підвищення індексу апоптоза вказує на переважання проапоптотичних процесів у клітинах, тоді як його зниження - на пригнічення апоптоза. Отримані нами результати показали, що ПГ призводить до значного на 37% ( $P < 0,05$ ), зниження індексу апоптоза, а через 10 днів після закінчення ПГ даний показник був на 55% ( $P < 0,05$ ) менше, ніж у контрольних тварин (див. табл. 2).

Таким чином, ми можемо констатувати, що дія переривчастої гіпоксії знижує проапоптотичний потенціал бета-клітин, забезпечуючи їх більшу стійкість до дії проапоптотичних факторів, тим самим забезпечуючи збільшення питомої чисельності бета-ендокриноцитів.

## Висновки та перспективи подальших розробок

1. Отримані в цій статті результати свідчать про стимулюючу дію переривчастої гіпоксії на деякі молекулярні механізми бета-ендокриноцитів. Збільшення чисельності бета-ендокриноцитів пов'язане не стільки зі стимуляцією їх проліферації, скільки викликане пригніченням механізмів апоптоза, що було встановлено при розрахунку запропонованого індексу апоптоза, важливого показника балансу експресії про- і антиапоптотичних білків в ендокринних клітинах.

2. Ще одним важливим результатом проведених досліджень ми вважаємо вперше виявлений факт пролонгованої дії інсулін-стимулюючого ефекту ПГ після закінчення гіпоксичних тренувань, що, головним чином, проявлялося низьким індексом апоптоза.

Перспективи подальших розробок будуть полягати у вивченні особливостей експресії білків Bcl-2, p53 та проліферативної активності в панкреатичних острівцях за умов поєднання переривчастої гіпоксії з експериментальним цукровим діабетом у щурів лінії Вістар.

## Список літератури

- Абрамов А.В. Иммуномодулирующий свойства гипоталамических нейропептидов /А.В.Абрамов, Ю.М.Колесник //Патология.- 2004.- Т.1, №1.- С.14-21.
- Абрамов А.В. Центральні механізми стимулюючого впливу інтервальних гіпоксичних тренувань на ендокринну функцію підшлункової залози щурів /А.В.Абрамов //Фізіол. журнал.- 1997.- Т.43, №5-6.- С.62-69.
- Влияние гипоксических тренировок на функциональное состояние бета-клеток панкреатических островков у крыс /А.В.Абрамов, Ю.М.Колесник, Т.В.Иваненко [и др.] //Физиология и здоровье человека: научн. тр. III съезда физиологов СНГ, 1-6 окт. 2011 г., г.Ялта. - Москва, 2011.- С.163.
- Иваненко Т. В. Влияние гипоксических тренировок на функциональное состояние бета-клеток поджелудочной железы крыс /Т.В.Иваненко, Н.В.Кузьо //Акт. питання фармац. та мед. науки та практики.- Запоріжжя, 2011.- Вип. XXIV, Т.2: матер. Всеукр. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю "Сучасні аспекти медицини і фармації - 2011".- С.22.
- Иваненко Т. В. Влияние гипоксических тренировок на функцию бета-клеток панкреатических островков /Т.В.Иваненко //Акт. проблеми сучасної медицини: Вісник Укр. мед. стомат. академії.- 2011.- Т.11, №4 (ч.2).- С.82-84.
- Караш Ю.М. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации /Ю.М.Караш, Р.Б.Стрелков, Ф.Я.Чижов.- М.: Медицина, 1988.- 353с.
- Колесник Ю.М. Вплив гіпоксичної гіпоксії на стан ендокринної функції підшлункової залози щурів /Ю.М.- Колесник, А.В.Абрамов //Фізіол. журнал.- 1992.- Т.38, №3.- С.60-63.
- Колесник Ю.М. Эндокринная функция поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете у крыс и ее особенности при адаптации к гипоксии /Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов //Пробл. эндокринологии.- 1993.- Т.39, №5.- С.37-39.
- Методи изучения нейроэндокринных взаимодействий в норме и при патологии /Ю.М.Колесник, А.В.Абра-

- мов, А.В.Траилин [и др.] //Запорожский мед. журнал.- 2002.- №3.- С.8-11.
- Нейро-иммунно-эндокринные механизмы регуляции эндокринной функции панкреатических островков /Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов, О.В.Ганчева [и др.] //Загальна патологія і клін. патофізіологія.- 2010.- Т.5, №3.- С.16-20.
- Холден Дж. С. Дыхание /Дж. С.Холден, Дж. Г.Пристли.- М. ; Л.: Гос. изд-во биол. мед. лит., 1935.- 463 с.
- Intermittent Hypoxia and Cardiovascular System /E.Belaidi, A. R. Marie Joyeux-Faure [et al.] //Intermittent hypoxia.- 2009.- Section 1.- 242p.
- Intermittent Hypoxia and Respiratory System /K.Katayama, M.Pokorski, T.V.Serebrovskaya [et al.] //Intermittent hypoxia.- 2009.- Sect.2.- P.245-310.

**Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Иваненко Т.В., Жулинский В.А.**  
**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ BCL-2, P53 И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОКСИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

**Резюме.** В последнее время сохраняется интерес к использованию немедикаментозных методов профилактики и лечения болезней. К ним относится, в том числе, и прерывистая гипоксия как природный стимул неспецифической резистентности организма человека. Одним из примечательных, но мало изученных эффектов дозированной гипоксии является ее влияние на эндокринный аппарат поджелудочной железы. В статье проводится анализ экспрессии маркеров апоптоза и пролиферативной активности бета-клеток у крыс после многодневных гипоксических тренировок. Полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем действии прерывистой гипоксии на некоторые молекулярные механизмы бета-эндокриноцитов.

**Ключевые слова:** прерывистая гипоксия, апоптоз, пролиферативная активность, бета-клетки поджелудочной железы.

**Kolesnyk Y.M., Abramov A.V., Ivanenko T.V., Zhulinskyi V.O.**

**THE FEATURES OF EXPRESSION OF BCL-2 AND P53 PROTEINS AND PROLIFERATIVE ACTIVITY IN PANCREATIC ISLETS UNDER THE INFLUENCE OF INTERMITTENT HYPOXIA IN EXPERIMENTAL CONDITIONS**

**Summary.** The interest of usage of non-pharmacological methods for preventing and treating diseases is retained recently. They are including particularly an intermittent hypoxia as a natural incentive of nonspecific resistance of an organism. One of the notable but little-studied effects of dosage hypoxia is its effect on the endocrine pancreas apparatus. This article analyzes the expression of markers of apoptosis and proliferative activity of beta-cells in rats after multiday hypoxic training. Obtained results show the stimulating effect of intermittent hypoxia on some molecular mechanisms of beta-endocrinocytes.

**Key words:** intermittent hypoxia, apoptosis, proliferative activity, beta cells.

Стаття надійшла до редакції 29.04.2014 р.

Колесник Юрій Михайлович - д. мед. н., ректор ЗДМУ, професор, завідувач кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету; +38 0612 34-35-61; kolesnik@zsmu.zp.ua

Абрамов Андрій Володимирович - д. мед. н., професор кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету; +38 0612 34-35-61; abramov@zsmu.pp.ua

Іваненко Тарас Васильович - к. мед. н., асистент кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету; +38 0612 34-35-61; IvanenkoTV@i.ua

Жулінський Володимир Олександрович - к. мед. н., доцент кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету; +38 0612 34-35-61; zhulj2011@yahoo.com

© Кресюн Н.В., Годлевський Л.С., Нєнова О.М., Полясний В.О.

УДК: 616.4-008.6

**Кресюн Н.В., Годлевський Л.С., Нєнова О.М., Полясний В.О.**

Одеський національний медичний університет (прв.Валіховський, 2, м.Одеса, 65082, Україна)

**МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СІТКІВКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ ЗА УМОВ ВПЛИВУ МІЛІМЕТРОВОГО ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ**

**Резюме.** У щурів лінії Вістар введенням стрептозотоцину (СТЗ) (50,0 мг/кг, в/очер) викликали цукровий діабет (вміст глюкози в крові перевищував 300 ммоль/л). Через 10 місяців з моменту моделювання діабету при гістологічному дослідженні сітківки ока у щурів з СТЗ-діабетом число тіней перипіцитів збільшилось у 3,3 рази, а число ацелюлярних капілярів - в 4,2 рази перевищувало відповідні показники в контролі. Застосування електромагнітного опромінення міліметрового діапазону (7,1 мм) на зону ока зменшувало досліджувані показники порівняно з такими у нелікованих тварин відповідно в 2,19 та в 1,81 рази.

**Ключові слова:** стрептозотонин, цукровий діабет, ретинопатія, міліметрове електромагнітне випромінювання.

**Вступ**

Розвиток гіперглікемії супроводжується виникненням ретинопатії -діабетичної ретинопатії (ДР), в патогенезі якої важливим є механізми активації перекисного

окиснення ліпідів, ремоделювання судинної системи сітківки, а також дегенеративні зміни з боку нейрональних елементів сітківки [Цисельський, 2006; Kowluru et