

Слід відмітити, що у групі тварин, яким вводили препарат після впливу стресового фактору, також спостерігалось зниження вмісту цинку, проте не дивлячись на це, вміст мікроелементу у клітинах слизової оболонки шлунка нормалізувався у пізні строки дослідження. Ймовірно, така нормалізація є наслідком активації ядерного апарату клітин омепразолом за умов реепітелізації.

Висновок. Розвиток стрес-індукованих уражень слизової оболонки шлунка супроводжувався зниженням вмісту цинку у клітинах слизової оболонки шлунка. Встановлені порушення можуть зумовлювати тривале, навіть несприятливе протікання хронічної гастродуоденопатії і бути причиною частого рецидивування. Отримані нами результати узгоджуються з наданими іншими вченими даними про згубну дію дефіциту цинку, прискорене одужання пацієнтів з виразкою шлунка за умов введення препаратів цинку, та захисний ефект цих препаратів при різних моделях виразкових уражень з різними патофізіологічними механізмами [5].

1. Авцын А.П. Микроэлементы человека этиология, классификация, органопатология. — М., 1991. — 497 с. 2. Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М. Атомно-адсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях. — М.: "Чувашия", 1997 — С. 48–84. 3. Протасова Н.А. Микроэлементы: биологическая роль, распределение в почвах, влияние на распространение заболеваний человека и животных // СОЖ. — 1998. — № 12. — С. 32–37. 4. Фаёзулина Р.А. Влияние микроэлементных нарушений на состояние перекисного окисления липидов при хроническом гастродуодените у детей // Педиатрия. — 2002. — № 3. — С. 44–48. 5. Barbarino F., Toganel E., Brilinschi C. et al Effects of zinc-aspartate and zinc-glycinate in healthy rats and on reserpine-induced gastric lesions // Biol. Trace Elem. Res. — 1988. — № 3. — P. 253–267. 6. Biswas K., Bandyopadhyay U., Chattopadhyay I., et al. A Novel Antioxidant and Antiapoptotic Role of Omeprazole to Block Gastric Ulcer through Scavenging of Hydroxyl Radical // J. Biol. Chem. — 2003. — 278. — № 13. — P. 10993–11001. 7. Dardenne M. Zinc and immune function // Eur. J. Clin. Nutr. — 2002. — Vol. 56. — № 3. — P. S20–S23. 8. Gerbino A., Hofer A.M., McKay B., et al Divalent cations regulate acidity within the lumen and tubulovesicle compartment of gastric parietal cells // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 126. — № 1. — P. 182–195. 9. Frassinetti S., Bronzetti G., Caltavuturo L. et al. The role of zinc in life: a review // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. — 2006. — Vol. 25. — № 3. — P. 597–610. 10. Hamdan I.I. In vitro study of the interaction between omeprazole and the metal ions Zn(II), Cu(II), and Co(II) // Pharmazie. — 2001. — Vol. 56. — № 11. — P. 877–881. 11. Hara H., Konishi A., Kasai T. Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130. — № 1. — P. 83–89. 12. Koch T.R., Petro A., Darrabie M., Opara E.C. Effect of the H, K-ATPase inhibitor, esomeprazole magnesium, on gut total antioxidant capacity in mice // J. Nutr. Biochem. — 2004. — Vol. 15. — № 9. — P. 522–526.

Надійшла до редколегії 26.04.07

УДК 577.44

Н. Нурищенко, д-р біол. наук, П. Чорноморець, асп.,
Л. Пелюх, пров. інж., М. Мірошніченко, д-р біол. наук

БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ТЕРАПЕВТИЧНОГО УЛЬТРАЗВУКУ РІЗНИХ ІНТЕНСИВНОСТЕЙ

Досліджено вплив ультразвуку з інтенсивностями 0,1 Вт/см² – 1,0 Вт/см² на стійкість мембран еритроцитів до гемолізу, активність мембранних АТФ-аз, а також на стан перекисного окиснення ліпідів та активність ендогенних антиоксидантних ферментів.

The effect of ultrasound with intensity 0,1 W/cm² – 1,0 W/cm² on the stability of erythrocyte membrane, activity of membrane ATP-ases, lipid peroxidation and antioxidant enzymes was studied.

Вступ. Одним з визначальних механізмів дії ультразвуку (УЗ) є зміна мікрооточення клітини та порушення проникності клітинних мембран [1]. Серед ефектів, пов'язаних з дією УЗ середніх та високих інтенсивностей на живий організм, можна також виділити генерацію вільних радикалів [2], певна кількість яких завжди існує і необхідна для нормального перебігу метаболічних процесів, а підвищення їх рівня вище фізіологічної межі призводить до деструктивних змін. Загальноприйняте, що механізм дії УЗ високих інтенсивностей включає кавітацію і зв'язане з нею утворення вільних радикалів [3]. Вплив УЗ малих і середніх інтенсивностей, що використовуються з лікувальними цілями, на процеси генерації і нейтралізації вільних радикалів і окисдантів не вивчений. Стимулюючий вплив УЗ на гліколіз, систему аденолових нуклеотидів і ряд інших метаболічних реакцій дозволяє припустити позитивну дію УЗ на ці процеси.

Дія УЗ на біологічний об'єкт, як відомо, визначається як властивостями самого об'єкту, так і параметрами фізичного фактору. Однією з важливих характеристик дії УЗ є інтенсивність. Підбір інтенсивності, при якій низька деструктивна дія сполучається з високою фізико-хімічною і біологічною активністю, є, безумовно, актуальним.

Враховуючи вищевикладене, метою роботи було вивчення впливу різних інтенсивностей ультразвуку на стійкість мембран еритроцитів до гемолізу, активність мембранних АТФ-аз, а також на стан перекисного окиснення ліпідів та активність ендогенних антиоксидантних ферментів.

Матеріали і методи. Дослідження реакцій клітин і тканин на дію УЗ різних інтенсивностей були проведені на 200 білих безпородних статевозрілих щурах вагою 180–200 г.

Тварин дослідних груп (n=6-10) озвучували в області піднебінних дужок. Перед процедурою волоссяний покрив на місці дотику аплікатора видаляли безпечною бритвою. Як джерело УЗ використовували прилад УЗТ-3.04ІЗ. Частота ультразвуку становила 0,88 МГц. При вивченні впливу УЗ на перекисне окиснення ліпідів та активність ендогенних антиоксидантів тварин піддавали 10-хвилинному озвученню. Інтенсивність становила 0,2 Вт/см², 0,3 Вт/см², 0,5 Вт/см² та 1,0 Вт/см². Дослідження проводили через 3 год, 24 год та 48 год після дії ультразвуку.

При дослідженні впливу УЗ на проникність мембран еритроцитів та активність АТФ-аз застосовували УЗ з інтенсивностями 0,1 Вт/см², 0,3 Вт/см², 0,5 Вт/см². Проводили курсове п'ятиразове озвучення (по 10 хвилин через добу протягом десяти діб). Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 3 години після останнього сеансу. В усіх серіях дослідів в якості контрольної використовували групу тварин, яким проводили так зване "вдаване озвучення", що являло собою імітацію процедури озвучення, але при відключеному генераторі ультразвукового сигналу.

Проникність мембран еритроцитів крові визначали за осмотичною резистентністю до розчинів сечовини різної концентрації [4]. Визначення активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази мембран еритроцитів крові проводили за методом [5]. Перекисне окиснення ліпідів оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) [6]. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за методом [7], а каталази – за методом [8]. Білок визначали за Lowry [9]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія).

Результати та обговорення. Встановлено, що застосування УЗ з інтенсивністю 0,2 Вт/см² викликало зни-

ження вмісту МДА в крові дослідних тварин на 32,1% ($p < 0,05$) через 3 год після озвучення (табл. 1). Виявлені зміни можна пояснити активацією ферментативних процесів утилізації кисню таких, як тканинне дихання, окиснювальне фосфорилування. На користь цього також свідчить той факт, що УЗ вищезгаданих інтенсивностей не впливав на активність ферментів антиоксидантного захисту (див. табл. 1). Під впливом УЗ з інтенсивністю 0,3 Вт/см² та 0,5 Вт/см² не спостерігалось достовірних змін досліджених показників. При застосуванні УЗ з інтенсивністю 1,0 Вт/см² через 3 год після озвучення рівень МДА збільшився на 34,9% ($p < 0,05$) порівняно з контролем, але вже через 24 год нормалізувався. При дії УЗ цієї інтенсивності через 3 год спостеріга-

лось підвищення активності СОД на 72,5% ($p < 0,05$) порівняно з контролем, тоді як активність каталази не змінювалась. Через 24 год активність СОД нормалізувалась, а активність каталази підвищувалась на 30,6% ($p < 0,05$). Через 48 год показники активності цих ферментів не відрізнялись від контролю. Встановлене співвідношення активності антиоксидантних ферментів представляється цілком закономірним, оскільки відомо, що при збільшенні концентрації специфічного субстрату активність ферменту спочатку підвищується, а потім, коли запаси субстрату виснажуються, знижується. Враховуючи те, що СОД є першим ферментом в системі антиокиснювального захисту, зміни її активності відбуваються раніше і більш виражені.

Таблиця 1. Вміст малонового діальдегіду, активність супероксиддисмутази та каталази в крові щурів під впливом ультразвуку різних інтенсивностей

Строк спостереження	Показник			
	Вміст МДА, нмоль/л ($M \pm m$)			
Контроль	145,2 $\pm$ 5,4; n=10			
	Інтенсивність УЗ, Вт/см ²			
	0,2	0,3	0,5	1,0
3 год	98,6 $\pm$ 3,4* n=9	134,5 $\pm$ 8,3 n=8	163,4 $\pm$ 16,1 n=8	195,8 $\pm$ 10,5* n=7
24 год	126,4 $\pm$ 9,5 n=10	137,6 $\pm$ 9,3 n=9	155,8 $\pm$ 8,9 n=10	181,0 $\pm$ 15,6 n=9

Продовження табл. 1

48 год	138,0 $\pm$ 4,9 n=8	150,0 $\pm$ 9,1 n=10	154,0 $\pm$ 10,5 n=9	165,4 $\pm$ 9,1 n=8
	Активність СОД, од/хв на 1 мг білка ($M \pm m$)			
Контроль	10,52 $\pm$ 1,12; n=10			
	Інтенсивність УЗ			
	0,2 Вт/см ²	0,3 Вт/см ²	0,5 Вт/см ²	1,0 Вт/см ²
3 год	10,15 $\pm$ 0,85 n=9	11,94 $\pm$ 1,95 n=8	9,46 $\pm$ 0,50 n=8	18,15 $\pm$ 0,91* n=7
24 год	10,16 $\pm$ 0,50 n=10	9,35 $\pm$ 0,90 n=9	9,67 $\pm$ 0,43 n=10	11,16 $\pm$ 1,02 n=9
48 год	10,84 $\pm$ 0,48 n=8	9,11 $\pm$ 0,61 n=10	8,17 $\pm$ 0,91 n=9	9,18 $\pm$ 0,57 n=8
	Активність каталази, од/хв на 1 мг білка ($M \pm m$)			
Контроль	39,35 $\pm$ 2,15; n=10			
	Інтенсивність УЗ			
	0,2 Вт/см ²	0,3 Вт/см ²	0,5 Вт/см ²	1,0 Вт/см ²
3 год	36,15 $\pm$ 3,42 n=9	38,80 $\pm$ 3,26 n=8	39,14 $\pm$ 4,86 n=8	41,40 $\pm$ 4,86 n=7
24 год	36,77 $\pm$ 1,45 n=10	39,39 $\pm$ 2,05 n=9	31,96 $\pm$ 4,41 n=10	51,40 $\pm$ 2,10* n=9
48 год	38,95 $\pm$ 5,82 n=8	37,17 $\pm$ 4,13 n=10	35,16 $\pm$ 2,85 n=9	37,50 $\pm$ 4,10 n=8

* – достовірна різниця досліджуваних величин відносно групи тварин з вдаванням озвучуванням при $p > 0,95$

З метою визначення мембранних механізмів дії було проведено дослідження впливу різних інтенсивностей ультразвуку на проникність еритроцитарних мембран та активність внутрішньомембранного ферменту – Na⁺,K⁺-АТФ-ази.

Показано, що дія УЗ з інтенсивностями 0,1 Вт/см² і 0,3 Вт/см² не призводила до значних змін проникності мембран еритроцитів, про що свідчить відсутність помітного зростання виходу гемоглобіну в умовах озвучення. При застосуванні ультразвуку з інтенсивністю 0,5 Вт/см² процент гемолізу еритроцитів підвищувався в 2,2 рази ($p < 0,05$) і становив 32,14 $\pm$ 2,17% порівняно з 14,40 $\pm$ 2,40% в контролі.

Вивчення активності Na⁺,K⁺-АТФ-ази мембран еритроцитів показало (табл. 2), що під впливом УЗ з інтенсивностями 0,1 Вт/см² і 0,3 Вт/см² активність ферменту підвищувалась в 1,5 рази ($p < 0,05$) і в 1,6 рази ($p < 0,05$), відповідно. УЗ з інтенсивністю 0,5 Вт/см² знижував активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази в 1,8 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Проведені дослідження показали, що ультразвук з інтенсивностями 0,1 Вт/см² і 0,3 Вт/см² не впливає значним чином на стійкість еритроцитарних мембран до ге-

молізу. Підвищення активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази, що спостерігалось при використанні зазначених інтенсивностей ультразвуку, очевидно, здатне компенсувати перерозподіл іонів, що виникає під впливом ультразвуку. Завдяки цьому порушення мембран не розвиваються і не спричиняють значних змін внутріклітинного метаболізму.

Ультразвук з інтенсивністю 0,5 Вт/см² підвищує проникність мембран еритроцитів і, як наслідок, зростання виходу гемоглобіну. При дії ультразвуку з інтенсивністю 0,5 Вт/см² відбувалось, на наш погляд, порушення стеричної взаємодії Na⁺, K⁺-АТФ-ази з мембранними фосфоліпідами, що супроводжувалось зниженням ферментативної активності.

Висновки. 1. Ультразвук з інтенсивностями 0,1 Вт/см² і 0,3 Вт/см² не впливає на стійкість еритроцитарних мембран до гемолізу. Це може бути пов'язане з підвищенням АТФ-азної активності під впливом зазначених інтенсивностей ультразвуку, що очевидно, здатне компенсувати перерозподіл іонів зашкоджуючи порушенню мембран. При дії ультразвуку з інтенсивністю 0,5 Вт/см² відбувається значне зниження стійкості мембран до гемолізу, що супроводжується зниженням АТФ-азної активності.

Таблиця 2. АТФ-азна активність мембран еритроцитів щурів при впливі ультразвуку різних інтенсивностей

Показник	Активність АТФ-ази, нмоль Р _i /хв на 1 мг білка (M±m)		
	Контроль; n=10		
Загальна АТФ-аза	49,8±0,7		
Mg ²⁺ -АТФ-аза	37,4±0,5		
Na ⁺ , K ⁺ -АТФ-аза	12,4±0,3		
	ультразвук, інтенсивність		
	0,1 Вт/см ² ; n=10	0,3 Вт/см ² ; n=9	0,5 Вт/см ² ; n=10
Загальна АТФ-аза	70,4±0,8*	86,5±0,8*	30,8±0,7*
Mg ²⁺ -АТФ-аза	52,6±0,4*	65,6±0,7*	23,6±0,3*
Na ⁺ , K ⁺ -АТФ-аза	18,2±0,2*	20,1±0,3*	6,9±0,1*

* – достовірна різниця досліджуваних величин відносно групи тварин з вдаваним озвучуванням при p>0,95.

2. Ультразвук впливає на процеси перекисного окиснення ліпідів, а також активність основних антиоксидантних ферментів в залежності від інтенсивності. Застосування ультразвуку з інтенсивністю 0,2 Вт/см² призводить до зниження вмісту МДА в крові дослідних тварин. Активність СОД та каталази при такому впливі не змінюється. Під впливом ультразвуку з інтенсивністю 0,3 Вт/см² та 0,5 Вт/см² не спостерігається достовірних змін досліджених показників. При застосуванні УЗ з інтенсивністю 1,0 Вт/см² відмічається посилення перекисного окиснення ліпідів, що проявляється в підвищенні вмісту МДА та змінах активності СОД і каталази.

3. Ультразвук з інтенсивностями 0,1–0,3 Вт/см² прояв-

ляє біологічну ефективність при відсутності негативних деструктивних змін.

1. Nyborg W.L. // Ultrasound in Med. Biol. – 2001. – Vol. 27. – N 3. – P. 301–333. 2. Misik V., Riesz P. // Ann. NY Acad. Sci. – 2000. – Vol. 899. – P. 335–348. 3. Kondo T., Kodaira T., Kano E. // Free Radical Res. Commun. – 1993. – Vol. 19. – S. 193–200. 4. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. // Биохимия. – 1984. – Т. 49. – N. 7. – С. 1089–1094. 5. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. Современные методы исследования. – М.: Наука, 1977. – С. 179–180. 6. Porter N.A., Nixon L. // Biochem. Biophys. Acta – 1976. – Vol. 441. – P. 506–512. 7. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. // Лабораторное дело. – 1983. – N. 10. – С. 30–33. 8. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. // Лабораторное дело. – 1988. – N. 1. – С. 16–18. 9. Lowry Q.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

Надійшла до редколегії 26.03.07

УДК: 591.463.1+612.616.2:612.014.48

Д. Ватліцов, асп., А. Клепко, канд. біол. наук,
К. Андрейченко, студ., С. Андрейченко, д-р біол. наук

КІЛЬКІСНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РОЗВИТКУ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ В ГАММА-ОПРОМІНЕНИХ СПЕРМАТОЗОЇДАХ ЩУРІВ

Вивчали вплив іонізуючої радіації на рухливість сперматозоїдів, розвиток в них апоптозу та некрозу. Встановлено кількісні закономірності апоптичної та некротичної морталізації сперматозоїдів після опромінення в діапазоні доз 1–100 Гр, а також дозові залежності, що характеризують кількісні зміни в субпопуляціях сперматозоїдів на різних стадіях апоптозу.

The impact of ionizing irradiation on spermatozoa motility as well as apoptosis and necrosis development in male gametes have been studied. The quantitative regulations of apoptic and necrotic mortalization of spermatozoa in the dose range 1–100 Gy were elucidated. Apart from this, dose dependences of quantitative changes in subpopulation of spermatozoa on different stages of apoptosis were found out.

Швидкий розвиток атомної енергетики, безумовно, несе в собі небезпеку непередбаченого опромінення персоналу атомних об'єктів та населення близьких територій іонізуючою радіацією, яскравим прикладом чого є аварія на ЧАЕС. При радіаційному впливі на живий організм репродуктивна система може зазнавати відчутних змін. В цьому зв'язку особливий інтерес викликає вивчення різних етапів розвитку радіаційного синдрому в сперматозоїдах, які відіграють роль клітин, що зберігають та переносять генетичну інформацію при відтворенні потомства [1, 2]. Показано, що іонізуюча радіація викликає пошкодження тканин і, в той же час, сприяє індукції програмованої клітинної загибелі – апоптозу, котрий, відповідно до сучасних уявлень, є основним механізмом, що регулює природне відмирання клітин в тканинах живого організму. Тому будь-яка стимуляція апоптозу обов'язково буде сполучена зі суттєвим зменшенням початкового пулу нормально функціонуючих клітин в загальній популяції [3–5].

Основною метою досліджень було вивчення загальних тенденцій імобілізації та морталізації сперматозоїдів при дії різних доз іонізуючої радіації, а також визначення кількісних аспектів пострадіаційного перерозподілу сперматозоїдів по різних стадіях програмованої клітинної загибелі.

Матеріали та методи. Дослідження проводились на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях масою 250–300 г розведення місцевого віварію. Після декапітації тва-

рин під слабким ефірним наркозом видаляли сім'яні придатки (епідідіміси) та поміщали їх в ізотонічний розчин хлориду натрію. Згодом епідідіміси опромінювали γ-променями ⁶⁰Co на установці "Дослідник" з потужністю дози 1,9 сГр/с в діапазоні доз 1–100 Гр. Залишки тканин епідідімісів відокремлювали шляхом фільтрування за допомогою нейлонового фільтру з діаметром пор 100 мкм.

З метою тестування рухливості сперматозоїдів краплю приготовленої суспензії переносили на предметне скельце термостатованого столика з температурою 37 °C і спостерігали під мікроскопом МБІ-15 на збільшенні х 600.

Кількісне вивчення різних стадій клітинної загибелі в популяції сперматозоїдів проводили на лазерному проточному цитометрі PAS фірми Partec (Германія) при вхідній напрузі лазера 200 мВ та довжині хвилі 488 нм. Для роботи на проточному цитометрі використовували набір "Annexine V apoptosis detection kit I" фірми BD Bioscience (США). Ідентифікацію мічених анексіном V-ФІТЦ (флуоросцеїн ізотіоніонат) та пропідія йодідом (ПІ) сперматозоїдів проводили за допомогою зеленого та червоного світлодетекторів, відповідно [6, 7]. Експериментальні дані обробляли за допомогою програми FlowMax (Partec, Германія).

Нормально функціонуючі клітини ідентифікували як анексіном V-ФІТЦ(-)/ПІ(-). Клітини, що знаходилися на ранній стадії апоптозу, визначали як анексіном V-ФІТЦ(+)/ПІ(-), а клітини на пізній стадії апоптозу чи ті, що загинули в результаті апоптозу визначали як ане-