

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ
АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫКА-БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2003 № 2

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2003 № 2

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

ЗАСНАВАЛЬНІК — НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Серия издается с января 2001 года

Выходит четыре раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ

Перцов С. С., Малиновская Н. К., Веттерберг Л., Фриберг И., Вознесенская Л. А., Рапопорт С. И., Комаров Ф. И., Судаков К. В. Водно-иммерсионный эмоциональный стресс изменяет уровень мелатонина в плазме крови у крыс при введении экзогенного мелатонина	5
Янке О., Тшенгке Б., Нихельман М. Влияние высоких температур окружающей среды на образование тепла у зародышей выводковых птиц: второй механизм терморегуляции	10
Наумович Н., Филипович Д., Барак О., Лапетич Б., Иветич В., Боскович К. Особенности ЭЭГ у лиц, страдающих головными болями после частого использования мобильных телефонов	13
Булгак А. А., Гурин А. В. Экспериментальное доказательство существования необратимых реперфузионных повреждений миокарда	17
Жукова И. А., Амвросьев А. П. Состояние компонентов микроциркуляторного русла семенника после гамма облучения 20-суточных плодов крысы на стадии активного органогенеза	24
Сорокина С. Э. Изменения фетоплацентарного комплекса при внутриутробном инфицировании плода: новые перспективы изучения патогенеза	28

НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ

Швалев В. Н., Каргина-Терентьева Р. А. Исследования иннервационных связей надпочечников в возрастном аспекте и при некоторых кардиологических заболеваниях	34
Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С., Мирошниченко И. В., Якунина О. В., Новоселова А. М., Гаркун Ю. С., Мурашко О. Н., Кульчицкий В. А. Модуляция центральной респираторной активности с помощью плазминогена, стрептокиназы и их комплексов с пируваткиназой	40

БИОХИМИЯ И ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

Перцов С. С., Кошлик Е. В., Краузе В., Михаэль Н., Эме П., Судаков К. В. Содержание катехоламинов в надпочечниках крыс Август и Вистар при остром эмоциональном стрессе.....	44
Конопля Е. Ф., Баненкая Н. В., Сечко Л. К., Павленко В. С., Попов Е. Г. Состояние овариальной и гормональной функций яичников крыс при облучении и дисфункции коры надпочечников.....	49
Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И., Тумилович М. К. Изменение активности АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12, вызванные воздействием плазминогена и фактора роста нервов.....	54
Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Винская Н. П., Сторожевых Т. П., Пинелис В. Г. Частичное ингибирование цитохромоксидазы митохондрий в нейронах мозжечка защищает их от повреждений при действии токсических доз глутамата и нитрита.....	59
Семак И. В., Корик Е. О., Наумова М. В., Сломински А. Анализ метаболизма серотонина в коже хомяков с помощью обратnofазной хроматографии и масс-спектрометрии.....	64

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Заводник Л. Б., Заводник И. Б., Мартынич Д. И., Белоновская Е. Б., Кравчук Р. И., Басинский В. Г., Тарасов Ю. А., Зверинский И. В., Буко В. У. Протекторный эффект мелатонина при гепатотоксическом действии четыреххлористого углерода у крыс.....	69
---	----

ВИРУСОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Громов И. Н., Прудников В. С. Иммуноморфогенез у кур, вакцинированных против инфекционного бронхита.....	75
Слизень В., Титов Л. П., Бразнер Д. С., Гал М. Изучение резистентности к метронидазолу изолятов бактериоидов, выделенных от больных с острым парапроктитом.....	80

БИОФИЗИКА И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Стародубцева М. Н., Черенкевич С. Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе.....	86
Сидоренко А. В., Царюк В. В. Анализ биоэлектрической активности мозга методом нелинейной динамики при действии наркотизирующих препаратов.....	91
Лойко Е. Н., Самаль А. Б., Шуляковская С. М. Обратимое ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов перекисью водорода.....	97

ОБЗОРЫ

Гурин А. В., Швалев В. Н., Гурин В. Н. Апоптоз в сердце: проблемы резистентности.....	101
Сидоренко Г. И. Сердечная недостаточность — это болезнь или синдром?.....	107
Балашко С. И., Колядко А. Н., Лукашевич В. С., Полукошко Е. Ф., Никандров В. Н., Островский Ю. П. Клеточные технологии в кардиологии.....	113
Самойлович Е. О. Проблемы отмены вакцинации после ликвидации полиомиелита.....	122

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2003 № 2

Серия медико-биологических наук

на русском, белорусском и английском языках

Тэхнічны рэдактар Т. В. Лецьен

Камп'ютарная вёрстка С. М. Касцюк

Здадзена ў набор 26.03.2003. Падпісана ў друк 20.06.2003. Выхад у свет 28.06.2003. Фармат 60×84¹/₈. Папера афсетная. Афсетны друк. Ум. друк. арк. 15,81. Ум. фарб.-адб. 16,27. Ул.-выд. арк. 17,2. Тыраж 150 экз. Заказ 639.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецтва «Беларуская навука». ЛВ № 13 ад 31.12.2002 г. 220141. Мінск, Старабарысаўскі тракт, 40. Пасведчанне 457.

Рэспубліканскае ўнітарнае паліграфічнае прадпрыемства «Баранавіцкая ўзбуўненая друкарня». ЛП № 122 ад 30.12.2002 г. 225320. Баранавічы, Савецкая, 80.

© Выдавецтва «Беларуская навука»
Весці НАН Беларусі, серыя медыка-біялагічных навук, 2003

УДК 612.828 + 577.15

В. Н. НИКАНДРОВ¹, В. Ф. ПЯТИН², А. С. АЛЕКСЕЕВА²,
И. В. МИРОШНИЧЕНКО², О. В. ЯКУНИНА², А. М. НОВОСЕЛОВА¹,
Ю. С. ГАРКУН¹, О. Н. МУРАШКО¹, В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ¹

МОДУЛЯЦИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПЛАЗМИНОГЕНА, СТРЕПТОКИНАЗЫ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ПИРУВАТКИНАЗОЙ

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,

²Самарский государственный медицинский университет, Россия

(Поступила в редакцию 13.01.2003. Принята после рецензирования 14.02.2003)

Биохимические механизмы регуляции функциональной активности различных структур центральной нервной системы, в том числе ствола головного мозга, остаются изученными крайне недостаточно, несмотря на чрезвычайно большую значимость этого аспекта в фундаментальном и прикладном ракурсах.

В последнее десятилетие была установлена важность системы перичеселлюлярного протеолиза и, в частности, звена «плазминоген-плазмин» в гистогенезе и деструкции нервной ткани, миграции ее клеточных элементов и т. п. [12]. Плазминоген обнаружен в ликворе [7], он синтезируется микроглией, а также, например, отдельными большими нейронами гиппокампа [8, 13].

Вполне логично ожидать, что при функциональных и, тем более, патологических перестройках локальный уровень этого зимогена может возрастать. Однако последствия подобных сдвигов для функциональной деятельности центральной нервной системы неясны. Важное место в регуляции звена «плазминоген-плазмин» занимают активаторы плазминогена. Одним из наиболее мощных является стрептокиназа — белок условно патогенных микроорганизмов — β -гемолитических стрептококков. В определенной ситуации (тромбоз сосудов мозга и т. д.) могут возникать показания к инъекциям препаратов стрептокиназы в сосудистое русло, желудочки мозга или, в целом, ликворопроводящую систему (например, см. [7]). Однако последствия таких воздействий для нервной ткани и структур мозга остаются тоже неясными.

Более того, белки тканей очень часто формируют межмолекулярные образования типа ассоциатов, комплексов и даже надмолекулярных структур. Все эти образования могут быть гетерогенны по составу. И в любом случае, подобные межбелковые взаимодействия могут изменять свойства исходных молекул. Известно, что плазминоген или стрептокиназа способны образовывать устойчивые эквимоллярные комплексы с рядом энзимов углеводно-энергетического метаболизма [3]. Это сопровождается структурными изменениями ингибируемых в комплексы белков. Вместе с тем, могут наблюдаться и изменения функциональных свойств белковых молекул. Так, в составе эквимоллярного комплекса с пируваткиназой стрептокиназа имеет существенно большую плазминоген-активаторную способность [4, 11]. Между тем, действие подобных комплексов на биологические системы практически не изучено. Учитывая данные наших предыдущих исследований о влиянии плазминогена на электрическую активность бульбарных нейронов [1], цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей генерации дыхательного ритма в условиях перфузии понтобульбоспинальных препаратов новорожденных крыс *in vitro* растворами, содержащими плазминоген, стрептокиназу, пируваткиназу или комплексы пируваткиназы с данными белками.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 20 изолированных понтобульбоспинальных препаратах мозга новорожденных крыс в возрасте от первых секунд после рождения до 3 суток. Для приготовления понтобульбоспинального препарата новорожденных крысят наркотизировали эфиром. Трепанацию черепа и препаровку мозга осуществляли с применением способов, описанных ранее [2, 5]. Ствол мозга пересекали на межколлику-

лярном уровне, а спинной мозг на уровне седьмого шейного сегмента. Во время препаровки мозг орошали искусственной спинномозговой жидкостью с температурой +7 °С. По ее окончании температуру перфузата постепенно повышали до +24—25 °С, после чего препарат помещали вентральной поверхностью вверх в камеру объемом 3 мл. Перфузию препарата в камере проводили со скоростью 3 мл/мин. В экспериментах использовали раствор искусственной спинномозговой жидкости следующего состава (ммоль/л): NaCl — 124.0, KCl — 5.0; CaCl₂ — 2.4; MgSO₄ — 1.3; NaHCO₃ — 26.0; KH₂PO₄ — 1.2; d-глюкоза — 30.0 [5]. Раствор насыщали смесью 5% CO₂ и 95% O₂, pH раствора составлял 7.3—7.4.

Очищенные электрофоретически гомогенные образцы плазминогена человека и стрептокиназы получали методами хроматографии как подробно описано нами ранее [3, 11]. Физико-химические характеристики и активность этих белков не отличались от образцов, использованных нами в предыдущих исследованиях. Пируваткиназа из скелетных мышц кролика была производства фирмы «Reanal» (Венгрия). Концентрацию белков в растворе учитывали по величине абсорбции при 280 нм, принимая значения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ равными 17.0, 8.8 и 5.4 для плазминогена, стрептокиназы и пируваткиназы соответственно. Устойчивые комплексы плазминоген(стрептокиназа)-пируваткиназа готовили, смешивая аликвоты растворов соответствующих белков при комнатной температуре и экспозиции 10 мин [3].

Электрическую активность вентральных корешков сегментов C₃—C₅ спинного мозга (т. е. на уровне диафрагмального ядра, нейроны которого формируют доминирующий инспираторный пул) отводили с помощью всасывающего электрода (внутренний диаметр 100 мкм) и через усилитель переменного тока подавали на входной канал персонального компьютера, где записывали на жесткий диск в файлы *.wav.

При обработке нейрограмм измеряли продолжительность цикла респираторной активности, время и амплитуду респираторных разрядов. Спектральный анализ электрических разрядов проводили с использованием алгоритма быстрого преобразования Фурье. Для построения спектрограмм использовали 1024-точечный формат при частоте дискретизации 500 Гц. Показатели спектрограмм рассчитывали на основании данных, полученных от 10 последовательных респираторных разрядов. Полученные данные представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки ($M \pm m$). Анализ статистических различий производился с помощью *t*-теста Стьюдента для средних величин. Различия считались достоверными при $P < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Через 1—2 мин после начала перфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим 0.2 мл стрептокиназы (0.3 мг/мл) в 20 мл искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦЖ), частота генерации респираторных залпов возрастала на 50—55%, а амплитуда низко- и среднечастотных пиков разрядов снижалась, в среднем, на 15—20% (рис. 1). Прекращение перфузии мозга раствором, содержащим стрептокиназу (т. е. перфузия только ИЦЖ), приводило к восстановлению исходной частоты и амплитуды респираторных разрядов.

Аналогичная картина в изменении респираторных залпов зарегистрирована в условиях перфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим 0.1 мл плазминогена (0.4 мг/мл) в 10 мл ИЦЖ. В этих опытах частота генерации респираторных залпов возрастала на 40—45%, а амплитуда залпа снижалась, в среднем, на 10% (рис. 2). Таким образом, при одинаковой направленности сдвигов респираторной активности обращала внимание менее выраженная степень изменений частоты и амплитуды респираторных залпов в условиях аппликации плазминогена по сравнению со стрептокиназой. Еще одной отличительной чертой в паттерне респираторных залпов в условиях перфузии понтобульбоспинального препарата

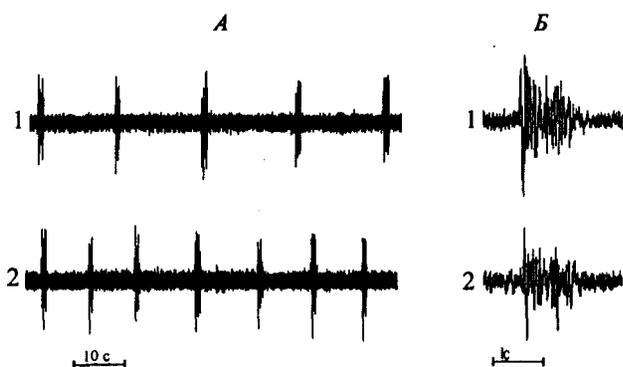


Рис. 1. Респираторная электрическая активность в вентральном корешке спинного мозга С4 (А), и отдельные инспираторные залпы (Б) в бульбоспинальном препарате новорожденной крысы: 1 — при перфузии препарата раствором искусственной цереброспинальной жидкости; 2 — при перфузии препарата раствором, содержащим стрептокиназу (0.2 мл в 20 мл искусственной цереброспинальной жидкости)

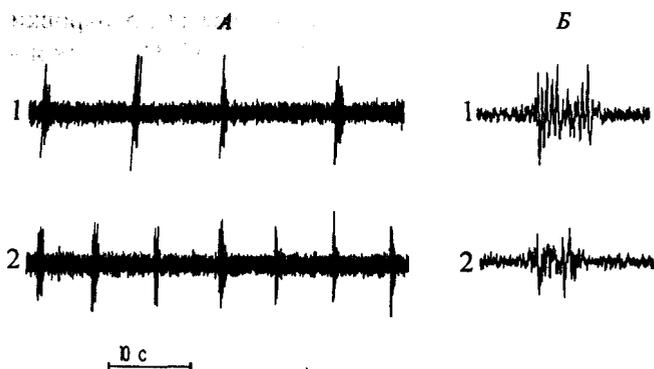


Рис. 2. Респираторная электрическая активность в вентральном корешке спинного мозга С4 (А) и отдельные инспираторные залпы (Б) в бульбоспинальном препарате новорожденной крысы: 1 — при перфузии препарата раствором искусственной цереброспинальной жидкости; 2 — при перфузии препарата раствором, содержащим плазминоген (0.1 мл в 10 мл искусственной цереброспинальной жидкости)

раствором, содержащим плазминоген, являлось укорочение инспираторного залпа с 1.00 ± 0.07 до 0.77 ± 0.09 с ($P < 0.05$), что не зарегистрировано в опытах с применением стрептокиназы. При продолжении перфузии мозга раствором, содержащим плазминоген, примерно, через 10 мин отмечалось резкое возрастание частоты генерации инспираторных залпов (на 150—175%), с последующей необратимой блокадой респираторной активности.

В условиях перфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим 0.2 мл пируваткиназы (1.8 мг/мл) в 10 мл ИЦЖ, зарегистрировано возрастание низкочастотного пика мощности спектра респираторных разрядов с 4.6 ± 0.7 до 6.8 ± 0.8 Гц ($P < 0.05$). Примечательно, что для пируваткиназы характерным являлась атипичная трансформация респираторных залпов, картина которых начинала напоминать инспираторную активность крыс в неонатальном периоде развития. «Неонатальные» респираторные разряды исчезали после прекращения перфузии мозга раствором, содержащим пируваткиназу.

При перфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим 0.2 мл комплекса стрептокиназы и пируваткиназы в 20 мл ИЦЖ (1.6 мг/мл), наблюдалось достоверное уменьшение продолжительности инспираторного залпа с 0.89 ± 0.03 до 0.77 ± 0.04 с ($P < 0.05$) и респираторного цикла с 11.5 ± 0.4 до 8.5 ± 0.5 с ($P < 0.01$). Эти сдвиги дыхательного паттерна приводили к увеличению частоты генерации респираторных залпов, в среднем на 35%, что напоминало картину изменений электрической активности в вентральных корешках С₃—С₅ спинного мозга при перфузии мозга раствором, содержащим лишь стрептокиназу, однако, в несколько ослабленном варианте.

В условиях перфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим 0.1 мл комплекса плазминогена и пируваткиназы в 20 мл ИЦЖ (1.3 мг/мл), зарегистрирована инверсия частоты генерации инспираторных залпов по сравнению с картиной электрической активности в вентральных корешках С₃—С₅ спинного мозга при перфузии мозга раствором, содержащим лишь плазминоген. Если при аппликации плазминогена частота генерации респираторных залпов возрастала на 40—45%, то при аппликации на мозг комплекса плазминогена и пируваткиназы частота генерации инспираторной активности снижалась на 25—30% ($P < 0.05$). При увеличении в два раза концентрации раствора, содержащего комплекс плазминогена и пируваткиназы, через несколько секунд после начала перфузии мозга наблюдалась блокада респираторной активности (рис. 3). Последующая перфузия мозга только ИЦЖ восстанавливала спонтанную активность в вентральных корешках С₃—С₅ спинного мозга.

Представленные экспериментальные данные фактически являются первым свидетельством сложного взаимодействия изучаемых белков с элементами бульбарного дыхательного центра. Это взаимодействие может быть реализовано через хеморецептивные структуры дорсальной и вентральной поверхности продолговатого мозга [2, 5], функционально связанные с

Рис. 3. Респираторная электрическая активность в вентральном корешке спинного мозга С4 бульбоспинального препарата новорожденной крысы: 1 — при перфузии препарата раствором искусственной цереброспинальной жидкости; 2 — при перфузии препарата раствором, содержащим комплекс плазминогена и пируваткиназы (0.1 мл в 20 мл искусственной цереброспинальной жидкости)



нейронами дыхательного центра. Нельзя исключить вероятности и прямого влияния белков на респираторные нейроны, так как на мембранах клеток мозга обнаружены рецепторы плазминогена [6, 14]. В экспериментах установлено, что при аппликации плазминогена на поверхность понтобульбоспинального препарата может наступить необратимая блокада инспираторной активности. Факт весьма примечательный, особенно в аспекте анализа клинических ситуаций, когда при кровоизлиянии в экстрабульбарные участки мозга, удаленные от дыхательного центра, наступает нарушение ритмической генерации дыхательной активности невыясненной этиологии. Еще более впечатляющей экспериментальной находкой является факт восстановления инспираторной активности после добавления пируваткиназы к раствору, содержащему плазминоген, и последующей перфузии понтобульбоспинального препарата ИЦЖ.

В последующем представляется целесообразным изучить тонкие механизмы генерации инспираторной активности в условиях изменения состояния звена «плазминоген-плазмин». Эти фундаментальные данные, в частности, помогут обосновать тактику, направленную на предотвращение необратимых нарушений дыхательной функции при применении фибринолитиков при разнообразных заболеваниях.

Литература

1. Кульчицкий В. А., Азев О. А., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44, № 3. С. 67–69.
2. Мирошниченко И. В., Пятин В. Ф., Кульчицкий В. А. // Весці НАН Беларусі. 2002. № 3. С. 22–28.
3. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Мурашко О. Н., Пыжова Н. С. // Докл. АН Беларуси, 1997. Т. 3. С. 69–75.
4. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Мурашко О. Н., Пыжова Н. С., Бореко Е. И. // V симпоз. «Химия протеолитических ферментов». Тез. докл. и стенд. сообщений. М., 2002. С. 96.
5. Пятин В. Ф., Мирошниченко И. В., Кульчицкий В. А. // Бюлл. exper. биол. мед. 2001. Т. 132, № 8. С. 129–132.
6. Hall S. W., Vandenberg S. R., Gonias St. L. // Brain Res., 1989. Vol. 495. P. 373–376.
7. Fletcher A. P. // J. Clin. Invest. 1954. Vol. 33, N 1. P. 69–76.
8. Kohsaka Sh., Hamanoue M., Nakajima K. // Keio J. Med. 1996. Vol. 45, N 3. P. 263–269.
9. Nikandrov V. N. // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24, N 1. P. 47–53.
10. Nikandrov V. N., Vorobyova G. V., Yankovskaya G. S., Demidchik N. V. // Int. J. Biol. Macromol. 1992. Vol. 14, N 8. P. 229–234.
11. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V., Pyzhova N. S., Kvyatkovskaya N. V., Bartalevich O. A. // Letters Pept. Sci. 1997. Vol. 4, N 4–6. P. 497–502.
12. Rosenblatt D. E., Cotman C., Nieto-Sampedro M., Rowe J., Knauer D. J. // Brain Res. 1987. Vol. 415. P. 40–48.
13. Strickland S., Gualandris A., Rogove A. D., Tsirka S. E. // Cold Spring Harbour Sympos. On Quantitative Biology. Vol. LXI. 1996. P. 739–745.
14. Verrall Sh., Seeds N. S. // J. Cell Biol. 1989. Vol. 109. P. 265–271.

V. N. NIKANDROV¹, V. F. PYATIN², A. S. ALEXEYEVA², I. V. MIROSHNICHENKO², O. V. YAKUNINA²,
A. M. NOVOSELOVA¹, Y. S. GARKUN¹, O. N. MURASHKO¹, V. A. KULCHITSKY¹

MODULATION OF THE CENTRAL RESPIRATORY ACTIVITY BY PLASMINOGEN, STREPTOKYNASE AND THEIR COMPLEXES WITH PYRUVATKYNASE

¹Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

²State Medical University, Samara, Russia

Summary

During electrophysiological researches in brainstem-spinal cord preparations of newborn rats change inspiratory volleys and respiratory electric activity in ventral roots a cervical part of a spinal cord is revealed at perfusion of preparations with solutions containing plasminogen, streptokynase, pyruvatkynase or complexes pyruvatkynase with these proteins. Plasminogen application on a brainstem surface there may come irreversible blockade of inspiratory activity. It is shown, that after addition pyruvatkynase to a solution containing plasminogen, and the subsequent perfusion of brainstem-spinal cord preparations with artificial cerebrospinal liquid, inspiratory activity is restored. The assumption that the received experimental facts will help to prove tactics directed on prevention of irreversible infringements of respiratory function at application these proteins at various diseases is stated.