

4. Ерофеева Л.М. Строение и цитоархитектоника тимуса человека в подростковом и юношеском возрастных периодах // Морфология. – 2002. – Т.122, №6. – С.37-40.
5. Киселёва А.Ф., Чернышенко Л.В., Радзиховский А.П., Кейсевич Л.В. Общая морфология и патология иммунитета. – К.: Наукова думка, 1994. – 204с.
6. Кнорре А.Г. Проблема сосудистого зачатка (ангиобласта) и его взаимоотношений с мезенхимой // Морфология человека и животных, антропология. – М.: ВИНТИ, 1980. – Т.9. – С.106-130.
7. Милер И. Иммунитет человеческого плода и новорожденного. – Прага: Авиценум, 1983. – 288 с.
8. Олийнык И.Ю. Изменение тимуса человека в пренатальном онтогенезе при токсикозах беременности // International Journal on Immunorehabilitation. – 2002. – V.4, №2. – P.329.
9. Олійник І.Ю. Морфометричний аналіз міжтканинних взаємовідношень “епітелій-мезенхіма” ротової порожнини людини в ранньому пренатальному періоді онтогенезу // Клін. анат. та опер. хірургія. – 2004. – Т.3, № 4. – С.83-86.
10. Петренко В.М. Лимфоток и развитие лимфатических узлов у плодов человека // Морфология. – 1997. – Т.112, №5. – С.55-58.
11. Сапин М.Р., Этинген Л.Е. Иммунная система человека. – М.: Медицина, 1996. – 304с.
12. Хаитов Р.М., Вербицкий Ю.И. Онтогенез иммунной системы // Итоги науки и техники, серия иммунология. – М.: Наука, 1986. – Т.14. – С. 1-167.

MORFOLOGICAL PRINCIPLES OF LYMPHOCYTE MIGRATION THROUGH THE VASCULAR WALL IN PRENATAL ONTOGENESIS OF THE HUMAN THYMUS

I.Yu.Oliynyk

Abstract. In the course of an examination of the intraorgan blood circulatory bed development during prenatal ontogenesis of the human thymus the morphological principles, possible ways and the time of the beginning of the lymphocyte migration out of the thymus into the lymphoid organs have been studied.

Key words: thymus, prenatal ontogenesis, morphological principles of lymphocyte migration.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. – 2006. – Vol.10, №2. – P.99-102

Надійшла до редакції 3.03.2006 року

УДК 612.8+615.21

T.I.Panova

ВПЛИВ КОМЕНОВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} -АТФ-АЗИ ПЛАЗМАТИЧНИХ НЕЙРОНАЛЬНИХ МЕМБРАН

Кафедра фізіології (зав. – проф. В.М.Казаков) Донецького державного медичного університету ім. М.Горького

Резюме. У плазматичних мембранах спинного мозку щурів за допомогою радіоактивного методу показали відсутність змін активності Ca^{2+} -АТФ-ази при активації опіоїдних рецепторів морфіном та модуляції опіоїдних рецепторів коменовою кислотою. Дійшли

висновку про відсутність прямої взаємодії коменової кислоти з Ca^{2+} -АТФ-азою. Дискутується питання щодо механізму модулювальної дії коменової кислоти.

Ключові слова: Ca^{2+} -АТФ-аза, коменова кислота.

Вступ. Існує багато свідчень про тісні відносини між знеболювальною дією опіатів і змінами концентрації вільного кальцію в різних ділянках ЦНС. Активація опіоїдних рецепторів інгібує потенціалчутливі канали Ca^{2+} і аденілатциклази [9]. Агенти, які збільшують $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах, блокують опіоїдне знеболення [8]. Уведення кальцію в шлуночки мозку блокує знеболювальний ефект морфіну, а кальцієві іонофори Х-537А та А23187, котрі збільшують $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах, також упереджують морфін-індуковане знеболення. У той же час застосування кальцієвих хелаторів (наприклад, ЕГТА) та антагоністів кальцієвих каналів (верапаміл, дилтіазем, дигідропіридин) посилюють актиноцицептивний вплив опіатів. Моделювання розвитку деяких патологічних ста-

нів у тварин, які завжди супроводжуються зростанням $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах, показало, що знеболювальний вплив морфіну в таких тварин знижений. Така ситуація розвивається, наприклад, при моделюванні стрептозототин-індукованого діабету 1-го типу в щурів [7]. Хронічне інгібування метаболічних глутаматних рецепторів і системи фосфатидилінозитулу їх антагоністами значно послаблює розвиток налоксон-індукованої абстиненції у морфін-залежних щурів [6]. Інтравентрикулярні ін'єкції тапсигаргіну (інгібітору Ca^{2+} -АТФази сарко-ендоплазматичного ретикулума, застосування якого збільшує $[Ca^{2+}]_i$ в клітинах) значно зменшує тяжкість налоксон-індукованих абстинентних симптомів у опіат-залежних тварин [7]. Виявлено, що у тварин з індукованою залеж-

ністю від опіатів кількість регуляторного білка кальмодуліну значно підвищено в синапсомальних клітинних фракціях із тканин ЦНС, а активність Ca^{2+} -АТФази зростає при однократному застосуванні морфіну.

З іншого боку, у наших попередніх експериментах отримали раніше невідомі дані про анальгетичний ефект коенової кислоти при внутрішньоочеревинному введенні її морфійзалежним щурам у стані абстинентного синдрому [2, 3]. Про механізм дії коенової кислоти, який би міг пояснити її фізіологічні ефекти, ми не знайшли в науковій літературі ніяких повідомлень. Якщо механізм дії коенової кислоти на мембрану має відношення до опіатної сигналізації, то доречно очікувати наявності будь-якої залежності активності кальцієвих механізмів від коенової кислоти.

Мета дослідження. З'ясувати, чи впливає коенова кислота на активність одного з ключових ферментів кальцієвої сигналізації – Ca^{2+} -АТФази – та порівняти цей вплив із впливом морфіну.

Матеріал і методи. Розроблено метод швидкого виділення плазматичних мембран із тканин спинного мозку, де, як відомо, розвиваються процеси формування больових сигналів, в яких беруть участь опіоїдні рецептори.

Для цього тканини мозку гомогенізували на льоді в тефлон-скляному гомогенізаторі Даунса в 5-кратному об'ємі 20 мМ ТРІС-НСІ буфера (рН 7,3).

Гомогенат центрифугували 5 хв (350 g, 4° С), потім до супернатанту додавали забуферений Перкол з 250 мМ сахарози до 40%, нашаровували Перкол із різною концентрацією (30%, 20%, 10%, 5%, 0%) та центрифугували 30 хв (10000 g, 4° С) [9]. При цьому методи мембрани розділилися на 5 фракцій між шарами з різною щільністю шляхом їх флотації в сходинокковому градієнті Перколу.

Після завершення центрифугування кожную фракцію окремо заморожували при -80°С.

Виходячи з того, що Na,K -АТФаза є визначним маркером саме плазматичних мембран, фракції тестували на наявність у них Na,K -АТФазної активності [1]. Тестування показало, що найбільшу питому активність (20-30%) має 3-тя фракція. Тому саме на препаратах із цієї фракції проводили дослідження.

У подальшому для проведення досліджень АТФ-азної активності аліквоти отриманих препаратів мембран розморожували та преінкубували 45 хв в інкубаційному буфері, який вміщував 120 мМ КСІ, 25 мМ ТРІС-НСІ буфера (рН 7,3), 1 мМ ЕГТА та 1 мМ ЕДТА, коктейль інгібіторів протеаз, 1мМ ДДТ, 2,5 мМ АДФ, 5 мМ NaN_3 , 50 мкг/мл сапоніну, кальмодулін (1 мкг/мл) при 4°С в Thermomixer comfort (Eppendorf). В окремих випадках додавали 10 мкМ морфіну або 250 мкМ коенової кислоти.

До преінкубаційної суміші додавали ще буфер такого ж складу, але з доданням міченого АТФ (250000 розпадів на пробу) і 0,5 мМ німеч-

ного АТФ, а також 1 мМ CaCl_2 (2 мкМ вільного кальцію).

Крім цього, до інкубаційної суміші додавали також високоспецифічний інгібітор кальцієвої АТФ-ази саркоплазматичного ретикулума тапсигаргин (40 мкМ) і високоспецифічний інгібітор натрій-калієвої АТФ-ази убаїн.

Реакцію проводили 30 хв при 37°С в Thermomixer comfort (Eppendorf). Об'єм інкубаційної суміші - 100 мкл. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл суспензії охолодженого активованого вугілля (виробництва Sigma) в 50 мМ розчині одноосновного натрію фосфату. Суспензію осаджали центрифугуванням. Аліквоти супернатанту переносили в сцинтиляційну рідину і аналізували в сцинтиляційному лічильнику Rackbeta (Amersham).

Дані наводяться у вигляді значень ферментативної активності, що представлена у вигляді вивільненого із АТФ ортофосфату на 1 мг білка за 1 хв.

Число проведених досліджень: 12 експериментів.

Коенова кислота надана нам з Інституту фізіології ім. І.П. Павлова (м. Санкт-Петербург). Заявка на винахід №2002107079/14 (007288). Дата пріоритету 19.03.2002 (Росія). До подачі заявки і дати пріоритету ми називали коенову кислоту субстанцією Q-134 [6].

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення активності Ca^{2+} -АТФази 3-ї фракції гомогенату спинного мозку показало, що коенова кислота в концентрації 250 мкМ не впливає на активність як чутливої, так і не чутливої до тапсигаргину Ca^{2+} -АТФази. Активність Ca^{2+} -АТФази 3-ї фракції спинного мозку не змінювалася також і під впливом морфіну.

Оскільки ні коенова кислота, ні морфін не впливали на активність Ca^{2+} -АТФ-ази, то ми з цієї причини припускаємо, що цей фермент не є мішенню дії коенової кислоти і морфіну безпосередньо, хоча вважається, що чинники, які безпосередньою мішенню на мембрані мають кальцієві канали або ж кальцієву АТФ-азу, можуть призводити до антиноцицептивного ефекту.

Отже, помітний анальгетичний ефект коенової кислоти, який спостерігали при її внутрішньоочеревинному введенні морфійзалежним щурам у стані абстинентного синдрому [2, 3], а також добре відомі анальгетичні ефекти морфіну [5] не можуть бути пов'язані з активацією кальцієвої АТФ-ази.

Такий висновок відносно морфіну на перший погляд може здаватися парадоксальним, адже зв'язок опіатів із мембранними кальцієвими механізмами добре відомий [6-8]. Але невідповідності тут немає, адже активність мембранних чинників (Ca^{2+} -АТФ-ази, Ca^{2+} -каналів) змінюється лише після взаємодії опіатів з опіоїдними рецепторами опосередковано – через активацію внутрішньоклітинних кальцієвих механізмів (кальмодуліну, протеїнази тощо). Про безпо-

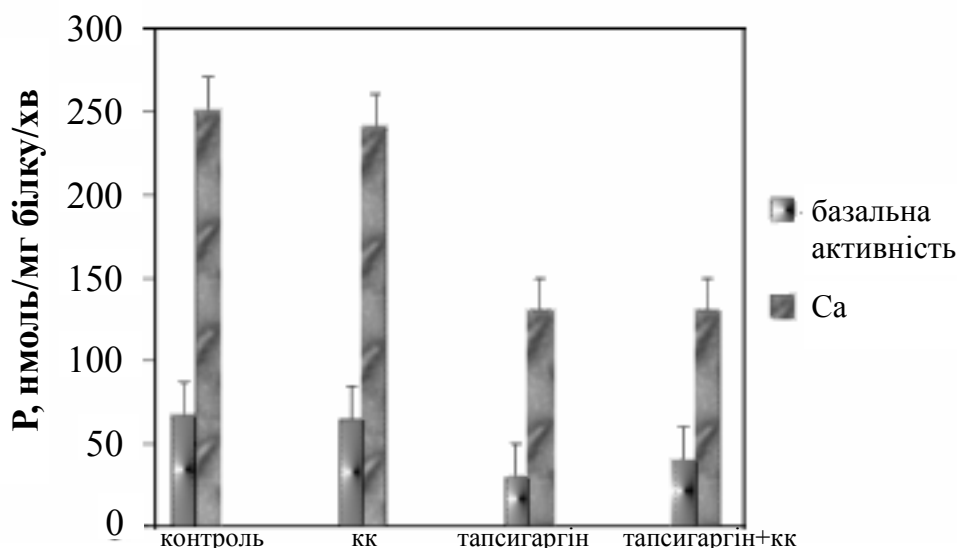


Рис. Активність плазматичної Ca^{2+} -АТФ-ази

P_i – кількість неорганічного фосфату, вивільненого з АТФ ортофосфату на 1 мг білка за 1 хв;
кк – коенова к-та

середній вплив морфіну на кальцеві канали або на мембранну кальцеву АТФ-азу не відомо. Дані, отримані в цьому дослідженні, це підтвердили. Крім того, у науковій літературі ми зустріли свідчення про те, що активація не всіх типів опіоїдних рецепторів пов'язана зі змінами концентрації внутрішньоклітинного кальцію і проникливості кальцевих каналів. Наприклад, активація дельта-рецепторів енкефалінами не супроводжується змінами концентрації внутрішньоклітинного кальцію [10].

Щодо відсутності безпосереднього впливу коенової кислоти на активність кальцевої АТФ-ази, то тут також можна припустити, що її фізіологічні ефекти пов'язані з модулювальною дією коенової кислоти саме на опіоїдні рецептори. Про можливість такої дії на мю- та дельта-опіоїдні рецептори було вказано в наших попередніх дослідженнях [4].

Висновок

Коенова кислота не впливає безпосередньо на активність плазматичної Ca^{2+} -АТФази.

Робота виконана за кошти гранта Президента України № 34 на 2005 р.

Література

1. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У.Г. Эванза.- М.: Мир, 1990.- 424 с.
2. Казаков В.Н., Панова Т.И., Крылов Б.В., Панова Л.Е. Субстанция Q-134. Анальгетический эффект // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія.- 2002.- № 4 (21).- С. 7-13.
3. Казаков В.Н., Панова Т.И., Крылов Б.В., Панов Ю.Е. Зависимость степени анальгетического эффекта коеновой кислоты от её дозы // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія.- 2003.- №3 (24).- С. 2-13.
4. Казаков В.Н., Панова Т.И., Цывкин В.Н., Прудников И.М. Влияние коеновой кислоты на активацию G-белков агонистами опиатных рецепторов в плазматических мембранах из мозга крысы //Нейрофизиология/ Neurophysiology. - 2004.-Т.36, №1.-С.13-19.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. Т.1.- М.: Новая волна, 2002.- 540 с.
6. Fundutus M.E., Coderre T.J. Chronic inhibition of intracellular Ca^{2+} release or protein kinase C activation significantly reduces the development of morphine dependence // Eur. J. Pharmacol.- 1996.- Vol. 300, No 3.- P. 173-181.
7. Ohsawa M., Kamei J. Role of intracellular calcium on the modulation of naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice by diabetes // Brain Res.- 1999.- Vol. 815, No 2.- P. 424-430.
8. Percoll. Methodology and applications.- Amersham Bioscience, 2001.-84 p.
9. Samways D.S., Henderson G. Opioid elevation of intracellular free calcium: Possible mechanisms and physiological relevance // Cell. Signal.- 2005.- No.6.- P.642-649.
10. Yeo A., Samways D.S., Fowler C.E., Gunn-Moore F., Henderson G. Coincident signalling between the G_i/G_o -coupled delta-opioid receptor and the G_q -coupled m3 muscarinic receptor at the level of intracellular free calcium in SH-SY5Y cells // J.Neurochem.- 2001.- Vol. 76, No 6.- P. 1688-1700.

INFLUENCE OF THE COMENIC ACID ON THE Ca^{2+} -ATP-ASA ACTIVITY
OF THE PLASMATIC NEURONAL MEMBRANES

T.I.Panova

Abstract. The absence of changes of the Ca^{2+} -ATP-ase activity has been demonstrated in the plasmatic membranes of the rat spinal cord by means of the radioactive method, with the activation of opioid receptors by morphine in case of the modulation of opioid receptors by the comenic acid. A conclusion has been arrived at to the effect of the absence of direct interaction of the comenic acid with Ca^{2+} -ATP-ase. A question pertaining the mechanism of a modulated action of this acid is discussed.

Key words: Ca^{2+} -ATP-ase, comenic acid.

M.Gorky State Medical University (Donets'k)

Buk. Med. Herald. – 2006. – Vol.10, №2. – P.102-105

Надійшла до редакції 19.12.2005 року

УДК 616.15:577.1] – 071

В.П.Пішак, С.Г.Ярмольчук

АКТИВНІСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ ТА ВІДСТРОЧЕНИЙ СПОСІБ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЙІ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

Кафедра медичної біології, генетики та гістології (зав. – чл.-кор. АПН України, проф. В.П.Пішак)
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Фенол (карболова кислота) є антимікробним біохімічним стабілізатором сироватки крові та ферменту церулоплазміну і в концентрації 50 ммоль/л стабілізує їх. При цьому активність досліджуваного ензиму не змінювалася протягом 30 діб зберігання стабілізованої сироватки крові при кімнатній температурі.

Це дозволяє використати дану сироватку як референтний матеріал для контролю та відстроченого визначення показника біохімічними лабораторіями.

Ключові слова: церулоплазмін, сироватка крові, фенол, референтні матеріали, відстрочене визначення активності.

Вступ. Нині на порядку денному медичної науки гостро встало питання про точність виконання біохімічних аналізів. Основним шляхом досягнення поставленої мети є контроль якості виконання лабораторних досліджень, який потребує референтних (контрольних, еталонних) матеріалів. В Україні референтні матеріали не виробляються [10]. На міжнародному ринку набір контрольних матеріалів коштує 150-400 доларів США [9], а 1 мл тестованого контрольного матеріалу, виготовленого з біологічних рідин і тканин людини, коштує 1,6-2,4 долара США [5].

Мета дослідження. Знайти загальнодоступний біохімічний стабілізатор сироватки крові і з його допомогою розробити еталонний матеріал для контролю якості визначення активності церулоплазміну, а також спосіб відстроченого визначення даного показника.

Матеріал і методи. Первинний скринінг антимікробного біохімічного стабілізатора провели серед медичних антисептиків [4] за їх здатністю запобігати росту гриба *Aspergillus niger* на 0,1 М розчині α -D,L-аланіну [8]. У роботі використали сироватки крові донорів, які обстежені на предмет відсутності в їх крові збудників сифілісу, СНІДу та гепатитів. Активність церулоплазміну визначали за методом Н.А.Равін. У результаті проведеного скринінгу встановлено, що з числа вивчених сполук фенол (карболова кислота) [4,12] відповідає всім вимогам до антимікробних

біохімічних стабілізаторів, і в концентрації 50 ммоль/л стабілізує біологічні проби та їх біохімічні показники протягом 50 діб зберігання при кімнатній температурі [8].

Реактиви та обладнання. 1. Вода, насичена фенолом, містить при 20°C 863 ммоль/л карболової кислоти [2]. 2. 0,1 М ацетатний буферний розчин з $\text{pH}=6,0\pm0,05$. 3. 0,5% водний розчин п-фенілендіаміну хлориду. 4. 0,5% водний розчин натрію азиду. 5. 3% розчин натрію хлориду.

У свіжозабраних сироватках крові донорів визначали активність церулоплазміну (мідьоксидаза, залізо (II): кисень-оксидоредуктаза [КФ 1.16.3.1]). Після цього досліджували сироватки крові інтенсивно перемішували на магнітній мішалці та приливали до них воду, насичену фенолом, з розрахунку 6,2 мл на 100 мл біологічної рідини, герметично закупорювали і зберігали при кімнатній температурі. Активність мідьоксидази визначали до стабілізації, через 2 год після додавання фенолу, а також у терміни, вказані в табл. 1. З цієї метою в хімічні пробірки доливали 2 мл буферного розчину, 0,1 мл сироватки крові та 1 мл розчину п-фенілендіаміну хлориду. Суміш перемішували, поміщали на 1 год у водяний ультратермостат з температурою $37\pm0,1^\circ\text{C}$, після чого доливали 1 мл розчину натрію азиду та 10 мл розчину натрію хлориду, перемішували і колориметрували в кюветах із довжиною оптичного шляху 30 мм при довжині світлової хвилі