

**Ключові слова:** кріоконсервування, дріжджоподібні гриби, кріопротектори, життєздатність, реактивні форми кисню.

**UDC** 579:57.043

**The CONTENT of REACTIVE OXYGEN SPECIES in *Candida albicans* cells after CRYOPRESERVATION of the VARIOUS PROGRAMS**

**Artuyants A.Yu., Martsenyuk V.F., Vysekantsev I.P.**

**Summary.** The cells viability and content of reactive oxygen species in yeast-like fungi *Candida albicans* ATCC 885 were studied after cryopreservation. It has been shown that maximum level of survival of yeast-like fungi has been provided by freezing with the rate of 7°C/min down to -70°C with further plunging into liquid nitrogen and adding of 5% DMSO. It has been found that indicators of elevated ROS in frozen samples correlated with the loss of cell viability after cryopreservation. It has been proved that ROS are accumulated in cells, which lost the ability to colony formation, i.e. in cells subjected during cryopreservation to lethal and conditionally lethal damages.

**Key words:** cryopreservation, yeast-like fungi, cryoprotectants, viability, reactive oxygen species.

Стаття надійшла 19.11.2010 р.

**УДК** 616.34-002-02

**Г.Ю. Підпружнікова, В.М. Кухарський, Н.В. Дзюбенко, Г.М. Толстанова**

**ЕФЕКТИВНІСТЬ АГОНІСТІВ D<sub>2</sub> ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ**

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)**

Робота виконана в рамках НДР біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Дослідження ролі дофаміну та D<sub>2</sub> дофамінових рецепторів в патогенезі запальних захворювань кишечника з огляду на його роль в VEGF/NPF-викликаній проникності судин товстої кишки», № держреєстрації №09ДП036-05.

**Вступ.** Запальні захворювання кишечника, до яких належать виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона є однією з найбільш серйозних та невирішених проблем сучасної гастроентерології та колопроктології [1]. Ангіогенез (утворення нових кровоносних судин) є новим критичним компонентом патогенезу запальних захворювань кишечника [3, 9, 14]. Його блокада значно покращує клінічні та морфологічні ознаки хвороби [4, 6]. В наших попередніх дослідженнях нейтралізація активності фактора росту кровоносних судин (VEGF/VPF), що є найпотужнішим проангіогенним фактором та фактором проникності кровоносних судин, сприяла загоєнню виразок при йодоацетамід-викликаному ВК [11]. Аналогічні дані були отримані іншими дослідниками [14].

Нейротрансмітер дофамін через взаємодію з D<sub>2</sub> дофаміновими рецепторами (D<sub>2</sub>R) справляє потужний вибірково пригнічуючий вплив на VEGF/VPF-викликану проникність кровоносних судин, проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин на моделях пухлин яєчників [13], раку молочної залози і товстої кишки [7] та пригнічує ріст пухлин. В ендотеліальних клітинах пухлин мишей з дефіцитом D<sub>2</sub>R та мишей з фармакологічно-зниженим рівнем дофаміну, значно підвищений рівень фосфорилування VEGF рецептора-2, що має вирішальне значення для ангіогенезу та проникності судин [8]. Більш того, клінічні та експериментальні дослідження показали зменшення рівня дофаміну, L-ДОФА (його попередника) [5, 10], а також тирозин гідроксилази (фермент, що бере участь в синтезі дофаміну) [2] при запальних захворюваннях кишечника.

**Метою даної роботи** було дослідити терапевтичну ефективність агоністів D<sub>2</sub>R в патогенезі експериментального ВК у щурів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені на щурах самицях лінії Вістар масою 180-230 (n=29). Йодоацетамід-викликаний ВК моделювали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma,

США) розчиненому в 1%-ному розчині метилцелюлози (Sigma, США) (7 см від анального отвору, використовуючи гумовий катетер S8 (Rüsch, Німеччина)).

Для оцінки терапевтичної ефективності агоністів  $D_2R$  на клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного ВК щурам вводили агоністи  $D_2R$  каберголін (достінекс; Pfizer, США) та бромокриптин (Ріхтер, Угорщина). Водний розчин каберголіну (50 мкг/кг, перорально) вводили на 2-й та 5-й день після модулювання ВК ( $n=10$ ). Водний розчин бромокриптину (50 мкг/кг, перорально) вводили з 2-го по 6-й день після модулювання ВК ( $n=9$ ). Контрольна група, відповідно, отримувала 1 мл води ( $n=10$ ). Щурів умертвляли шляхом інгаляції з  $CO_2$  та наступною цервікальною дислокацією на 7-й день експерименту.

Клінічні ознаки коліту, такі як маса тіла, летаргія (0-3 бали: 0 - норма, 1 - помірно піднята шерсть, 2 - тварина брудна, зменшення спонтанних рухів, 3 - тварина майже не рухається, не реагує на інших тварин), діарея (0-3 бали: 0 - норма; 1 - м'яке чи водянисте випорожнення, волога пляма навколо ануса до 1  $cm^2$ ; 2 - волога пляма навколо ануса більше ніж 1  $cm^2$ , захватє нижню частину живота; 3 - пляма доходить до грудей) оцінювали щоденно. Зважування щурів проводили на 1-й (день введення йодоацетаміду), 3-й, 5-й та 7-й дні експерименту.

Для оцінки макроскопічних уражень товстої кишки, видаляли 7 см товстої кишки (від анального отвору), розрізали з антимезентерального боку, промивали в фізіологічному розчині. Вимірювали: площу ураження ( $mm^2$ ), поперековий переріз стінки товстої кишки (мм), площу ділянки, що втратила складки ( $mm^2$ ), масу 7 см кишки в перерахунок на 100 г маси щура (г/100 г тіла), а також загальний ступінь ураження товстої кишки за шкалою 0-3 (0 - норма, 1 - ураження 1-10% товстої кишки, 2 - уражено 11-30%, 3 - уражено більше ніж 30%).

Отримані дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ ,  $n$  - кількість тварин в групі. Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету математичних програм StatisticSoft 6.0. використовуючи ранговий критерій груп U-тест Мана-Вітні для порівняння двох незалежних вибірок. Статистично значущою вважали різницю при  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для перевірки терапевтичної ефективності агоністів  $D_2R$  при експериментальному ВК, ми застосовували препарати каберголін (достінекс) та бромокриптин в дозах, що на порядок нижчі за ефективні для пригнічення лактації.

В наших дослідженнях введення каберголіну та бромокриптину значно покращувало клінічні ознаки коліту. А саме, виживаємість щурів в експериментальних групах, що отримували досліджувані речовини, становила 100%, тоді, як даний показник у щурів контрольної групи був зменшений на 12,5%. 78% щурів контрольної групи мали діарею на момент закінчення експе-

рименту з середнім показником  $1,44 \pm 1,01$  балів. В групі щурів, що отримували каберголін лише 50% тварин мали діарею з середнім показником на групу  $0,81 \pm 1,13$  балів. Важливо зауважити, що 78% тварин в бромокриптин-групі мали діарею, але середній показник на групу був нижчий у порівнянні з контрольною групою і дорівнював  $1,16 \pm 1,00$  балів. Введення каберголіну та бромокриптину також значно покращувало загальний стан тварин (летаргія), що визначався за шкалою від 0 до 3 балів і становив  $0,68 \pm 0,45$  та  $0,55 \pm 0,52$  балів, відповідно. В контрольній групі щурів цей показник дорівнював  $0,88 \pm 0,60$  балів. Введення каберголіну та бромокриптину не викликало значних змін в масі тіла щурів.

Введення агоністів  $D_2R$  значно покращувало морфологічні ознаки коліта (рис.). Так, площа уражень в контрольній групі щурів дорівнювала  $480,75 \pm 330,87$   $mm^2$ , тоді як після введення каберголіну та бромокриптину цей показник становив  $190,75 \pm 129,99$   $mm^2$  ( $p=0,035$ ) та  $190,33 \pm 108,8$   $mm^2$  ( $p=0,007$ ), відповідно. Введення каберголіну та бромокриптину зменшувало показник поперекового перерізу стінки товстої кишки, хоча ці зміни не досягали статистичної значущості. Так, цей показник дорівнював  $19,25 \pm 4,65$  мм в групі, що отримувала каберголін та  $18,66 \pm 4,41$  мм в групі, що отримувала бромокриптин, тоді як в контрольній групі -  $26,93 \pm 9,75$  мм. Площа ділянки товстої кишки, що втратила складчатість (вказує на площу запалення/набряку) дорівнювала  $684,81 \pm 379,65$   $mm^2$  в контрольній групі, тоді як після введення каберголіну цей показник становив  $400,25 \pm 247,57$   $mm^2$  ( $p=0,11$ ). Бромокриптин зменшував площу ділянки без складок до  $339,22 \pm 230,55$  ( $p=0,034$ ). Маса кишки на 100г тіла щура, також значно зменшувалась під дією каберголіну та бромокриптину і дорівнювала, відповідно  $1,00 \pm 0,34$  г/100 г ( $p=0,035$ ) та  $1,06 \pm 0,32$  г/100г ( $p=0,016$ ) проти  $1,77 \pm 0,84$  мг/100 г в контрольній групі.

Загальний ступінь ураження товстої кишки в контрольній групі досягав максимального значення у 70% щурів за шкалою 0-3 і в середньому дорівнював  $2,75 \pm 0,42$  бали. В групі, що отримувала каберголін цей показник був зменшений до  $1,75 \pm 0,53$  балів ( $p=0,003$ ), а в групі, що отримувала бромокриптин -  $1,83 \pm 0,55$  балів ( $p=0,003$ ).

Як видно з рис., бромокриптин був більш ефективним у порівнянні з каберголіном у прискоренні загоєння виразки, хоча обидві речовини виявляли статистично значущу позитивну дію, що підтверджує наші очікування. Так як в наших попередніх дослідженнях активація  $D_3R$  мала потужний позитивний вплив на морфологічні та клінічні ознаки експериментального ВК [12], ми припустили, що більш значима ефективність бромокриптину пов'язана з його афінністю до  $D_3R$ .

**Висновки.** В результаті проведеного дослідження показано, що щоденне введення агоністів  $D_2R$  статистично значущо покращувало

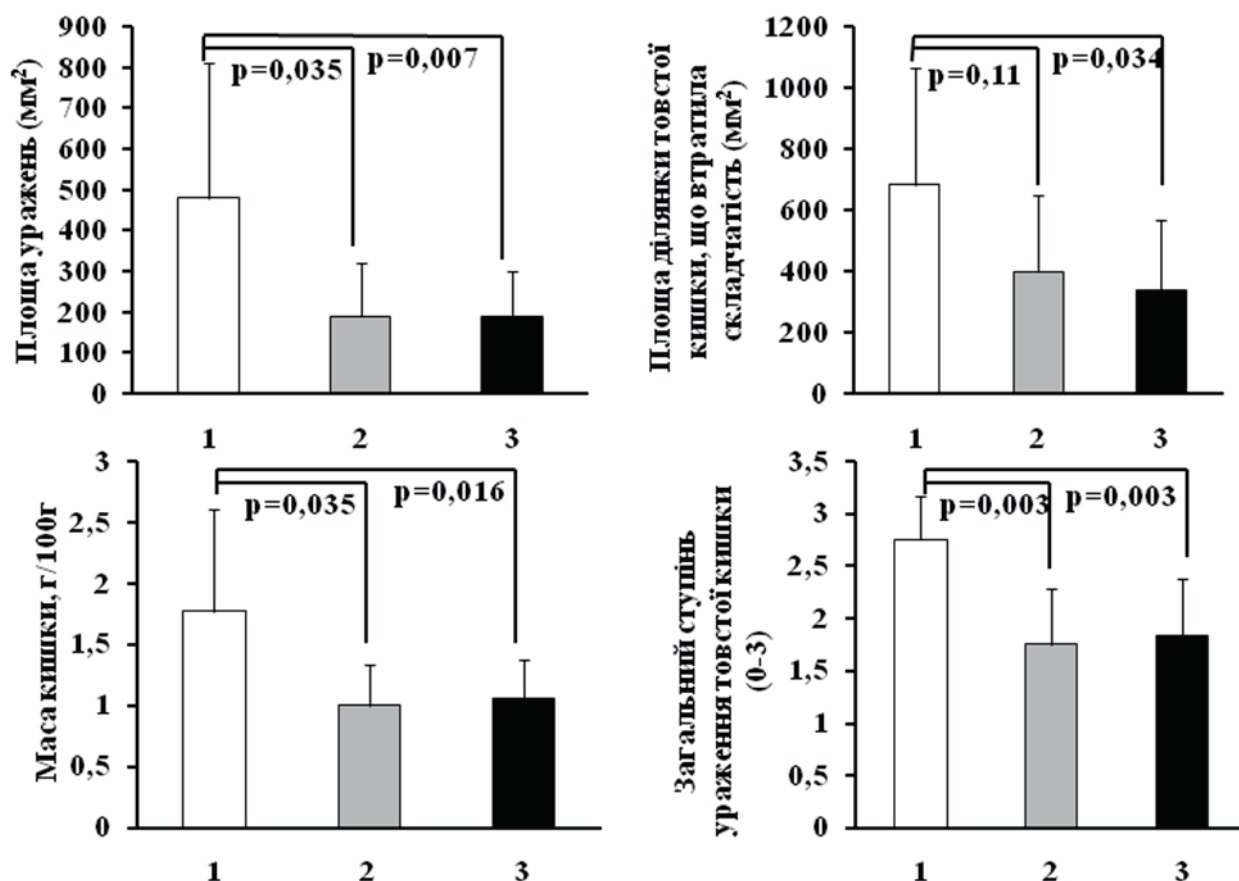


Рис. Вплив агоністів D<sub>2</sub>R каберголіну (2) та бромокриптину (3) на морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного коліта у щурів. 1-контрольна група.

клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного ВК.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні доза-ефект для даних препаратів, а також дослідженні механізмів терапевтичної ефективності агоністів D<sub>2</sub>R в патогенезі експериментального ВК.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона // Белоусова Е.А. - М.: Триада, 2002. - 127с.
- ТолстANOва Г.М. Роль D2 дофамінових рецепторів в механізмах проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті / Г.М. ТолстANOва, Л.І. Остапченко // Доповіді Національної академії наук України. - 2010. - №7. - С. 158-162.
- Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis / S. Danese, M. Sans, CDL. Motte [et al.] // Gastroenterology. - 2006. - Vol.130, №7. - P. 2060-2073.
- An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease / E.A. Vasiluskas, L.Y. Kam, M.T. Abreu-Martin [et al.] // Gastroenterology. - 1999. - Vol.117, №6. - P. 1278-1287.
- Decreased availability of intestinal dopamine in transmur colitis may relate to inhibitory effects of interferon- upon L-DOPA uptake / F. Margo, S. Fraga, T. Ribero [et al.] // Acta. Physiol. Scand. - 2003. - Vol. 180. - P. 379-386.
- Differential angiogenic regulation of experimental colitis / J.H. Jr. Chidlow, W. Langston, J.J. Greer [et al.] // American Journal of Pathology. - 2006. - Vol.169, №6. - P. 2014-2006.
- Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models / S. Sarkar, D. Chakroborty, U.R. Chowdhury [et al.] // Clin Cancer Res. - 2008. - Vol. 8. - P. 2502-2510.
- Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells / S. Sarkar, D. Chakroborty, R.B. Mitra [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2004. - Vol.4. - P. 1554-1560.
- Doppler US in patients with Crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity / J. Spalinger, H. Patriquin, M.C. Miron [et al.] // Radiology. - 2000. - Vol. 217, №3. - P. 787-791.
- Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease / F. Magro, M.A. Vieira-Coelho, S. Fraga [et al.] // Dig. Dis. Sci. - 2002. -Vol. 47, №1. - P. 216-224.
- Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: Direct evidence for the pathogenic role of VEGF / G. TolstANOva, T. Khomenko, X. Deng [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics - 2009. - Vol. 328, №3. - P. 749-757.
- Pidpruzhnykova G., Kuharskiy V., TolstANOva G. Role of D2 and D3 dopamine receptors in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis: Programme and abstracts [Young physiologists' symposium], (Manchester, England, 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> June 2010). - P. 37-38.
- The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor / S. Basu, J.A. Nagy, S. Pal [et al.] // Nat. Med. - 2001. - Vol. 7, №5. - P. 569-74.
- VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis / F. Scaldaferrri, S. Vetrano, M. Sans [et al.] // Gastroenterology. - 2009. - Vol.136, №2. - P. 585-595.

**УДК 616.34-002-02****ЭФЕКТИВНОСТЬ АГОНИСТОВ D<sub>2</sub> ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА****Подпружникова Г.Ю., Кухарский В.М., Дзюбенко Н.В., Толстанова А.Н.**

**Резюме.** Впервые установлено, что пероральное введение агонистов D<sub>2</sub> дофаминовых рецепторов каберголина (50 мкг/кг) и бромокриптина (50 мкг/кг) значительно улучшает клинические и морфологические показатели йодоацетамид-вызванного язвенного колита у крыс.

**Ключевые слова:** D<sub>2</sub> дофаминовые рецепторы, язвенный колит, каберголин, бромокриптин.

**УДК 616.34-002-02****ЕФЕКТИВНІСТЬ АГОНІСТІВ D<sub>2</sub> ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ****Підпружникова Г.Ю., Кухарський В.М., Дзюбенко Н.В., Толстанова Г.М.**

**Резюме.** Вперше встановлено, що пероральне введення агоністів D<sub>2</sub> дофамінових рецепторів каберголіну (50 мкг/кг) та бромокриптину (50 мкг/кг) значно покращує клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного виразкового коліту у щурів.

**Ключові слова:** D<sub>2</sub> дофамінові рецептори, виразковий коліт, каберголін, бромокриптин.

**UDC 616.34-002-02****EFFICACY of D<sub>2</sub> DOPAMINE RECEPTOR AGONISTS in EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS TREATMENT****Pidpruzhnykova G.J., Kuharskiy V.M., Dzubenko N.V., Tolstanova G.M.**

**Summary.** We showed for the first time that treatment with D<sub>2</sub> dopamine receptor agonists cabergoline (50 mkg/kg, per.os.) and bromocriptine (50 mkg/kg, per.os.) significantly improves clinical and morphologic signs of iodoacetamide-induced ulcerative colitis in rats.

**Key words:** D<sub>2</sub> dopamine receptor, ulcerative colitis, cabergoline, bromocriptine.

Стаття надійшла 15.10.2010 р.

**УДК 616.34-002-02+616.34:611.13/14****Г.М. Толстанова****РОЛЬ МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-9 В ГЕНЕРАЦІЇ ЕНДОСТАТИНУ В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТА****Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)**

Робота виконана в рамках НДР біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції», № держреєстрації 0106U005755.

**Вступ.** Ендостатин – потужний анти-ангіогенний фактор, який пригнічує абнормальний/патологічний ангіогенез, що спостерігається при злоякісних пухлинах та хронічних запальних захворюваннях [5, 7]. Підвищення рівня ендостатину було показано у хворих на виразковий коліт [2] та на експериментальних моделях даної патології [1, 13].

Ендостатин – 20 кДа фрагмент СООН-кінця NC1 домена колагену XVIII α1-ланцюга, який був

вікритий та виділений з лінії клітин гемангіоендотеліоми мишей [6]. Ендостатин утворюється в результаті протеолітичної деградації колагену XVIII під дією різних протеїназ, в тому числі матрикс металопротеїнази-9 (ММР-9) [11].

Підвищення активності та експресії ММР-9 було показано у хворих на виразковий коліт [10], а також в наших дослідженнях на моделі йодоацетамід-викликаного коліта у щурів та у мишей з спонтанно-виникаючим колітом, в результаті дефіцита інтерлейкіна-10 [13]. Більш того, клінічні та експериментальні дослідження показали домінування матрикс металопротеїназ в слизовій оболонці кишечника в патогенезі виразкового коліта [4, 16].