

Исследование чувствительности биомоделей для первичного тестирования потенциально физиологически активных веществ методом кластерного анализа

И. В. Семенюта, Л. А. Метелица, Л. Е. Калашникова, Р. А. Прокопенко

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Ул. Мурманская, 1, 02660, Киев-94, Украина

Исследовали чувствительность клеток крови и функциональную активность гладких мышц к физиологически активным веществам (ФАВ) различной химической природы. Показано, что реакции хемотаксиса и электрофореза нейтрофильных лейкоцитов могут быть использованы для предварительной оценки биологической активности новых химических веществ, а также для дальнейшего изучения механизмов влияния различных ФАВ на иммунокомпетентные клетки. Предложен способ обработки неоднородных и статистически недостоверных данных методом кластерного анализа.

Введение. Ранее нами установлено, что при действии ряда физиологически активных веществ (ФАВ) [1] на процессы Е-розеткообразования Т-лимфоцитов и спонтанной подвижности лейкоцитов полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) наблюдаются существенные функциональные изменения в исследуемых биообъектах. В большинстве случаев отмечен адекватный ответ изучаемых клеточных реакций на воздействие ФАВ двух биорегуляторных классов [2]. При этом необходимо отметить, что в литературе описана значительная чувствительность ко многим физическим и химическим агентам не только различных типов лейкоцитов, но и тромбоцитов, а также препаратов из гладких мышц органов [3–5], которые и были использованы в настоящей работе в качестве биообъектов для изучения влияния ФАВ. В дальнейшем многочисленными исследованиями показано, что при ингибировании ксенобиотиками различной природы аденилатциклазной системы и активации Са-мобилизующей фосфолипидной сигнальной системы (–I/+II) ука-

занных биообъектов адекватно повышаются стимулированная подвижность (хемотаксис) ПМЯЛ [6], скорость агрегации тромбоцитов [7], сократимость гладкой мышцы мочеоточника [8], а также электрофоретическая подвижность нейтрофильных лейкоцитов [9]. Обратная модификация сигнальных систем (+I/–II) вызывает ингибирование вышеуказанных реакций [6–10].

Исходя из вышеизложенного цель настоящей работы состояла в исследовании чувствительности реакций стимулированной подвижности ПМЯЛ, агрегации тромбоцитов, электростимулированной фазной сократимости гладких мышц мочеоточника и электрофоретической подвижности нейтрофильных лейкоцитов к различным ФАВ, а также в определении возможности использования указанных модельных систем для предварительной оценки биологической активности веществ.

Для осуществления качественного и количественного анализа экспериментальных результатов воздействия ФАВ на исследуемые биомодели и выяснения степени информативности биомоделей применяли метод кластерного анализа [11–14].

Таблица 1
Тип взаимодействия исследуемых физиологически активных веществ (ФАВ) с клеточными сигнальными системами и точки их приложения

Исследуемые ФАВ	Уровень воздействия ФАВ на клеточные сигнальные системы	Точки приложения ФАВ в пределах рецепторного и субмембранного уровня воздействия	Стереотип действия ФАВ на клеточные сигнальные системы
Атропин	Рецепторный	Блокатор α_2 -, М-рецепторов	+I/-II*
BW-755C	Субмембранный	Ингибитор 5-липоксигеназы	+I/-II
Эмбихин	Субмембранный	Активатор аденилатциклазы, ингибитор PDE-cAMP	+I/-II
Теофиллин	Субмембранный	Ингибитор PDE-cAMP	+I/-II
Кверцетин	Субмембранный	Ингибитор 5-липоксигеназы	+I/-II
Димедрол	Рецепторный	Блокатор H_1 -, М-рецепторов	+I/-II
МКДХЭА***	Субмембранный	Активатор аденилатциклазы, ингибитор PDE-cAMP	+I/-II
Изадрин	Рецепторный	Активатор β -рецепторов	+I/-II
Форидон	Субмембранный	Блокатор хемоуправляемых Ca^{2+} -каналов	+I/-II
Аспирин	Субмембранный	Ингибитор циклооксигеназы	+I/-II
Вольтарен	Субмембранный	Ингибитор синтеза простагландинов и лейкотриенов	+I/-II
Папаверин	Субмембранный	Ингибитор PDE-cAMP	+I/-II
Циклофосфан	Субмембранный	Активатор аденилатциклазы, ингибитор PDE-cAMP	+I/-II
Кофеин	Субмембранный	Ингибитор PDE-cAMP, PDE-cGMP	+I/-II
Сульпирид	Рецепторный	Блокатор D_2 -рецепторов	+I/-II
Нитрендипин	Субмембранный	Блокатор хемоуправляемых Ca^{2+} -каналов	+I/-II
Милдронат	Субмембранный	Ингибитор γ -бутиробетаингидроксилазы	+I/-II
Иохимбин	Рецепторный	Блокатор α_1 -, α_2 -, 5-HT $_2$ -, D_2 -рецепторов	+I/-II
Празозин	Рецепторный	Блокатор α_1 -рецепторов	+I/-II
Галоперидол	Рецепторный	Блокатор α_1 -, D_2 -рецепторов	+I/-II
Фторацизин	Рецепторный	Блокатор М-рецепторов, активатор H_2 -рецепторов	+I/-II
Аминазин	Рецепторный	Блокатор α_1 -, α_2 -, 5-HT $_2$ -, D_1 -, D_2 -рецепторов	+I/-II
Импипрамин	Рецепторный	Блокатор α_1 -, H_1 -, М-, 5-HT $_2$ -, H_2 -, D_2 -рецепторов	+I/-II
Дроперидол	Рецепторный	Блокатор α_1 -, α_2 -, H_1 -, D_2 -рецепторов	+I/-II
Верапамил	Субмембранный	Блокатор хемоуправляемых Ca^{2+} -каналов	+I/-II
fMLP	Рецепторный	Моделирует фрагмент бактериальной оболочки	-I/+II**
Мезатон	Рецепторный	Активатор α_1 -рецепторов	-I/+II
Обзидан	Рецепторный	Блокатор β -рецепторов	-I/+II
Клонидин	Рецепторный	Активатор α_1 -, α_2 -рецепторов	-I/+II

Примечание. *Активация аденилатциклазной и ингибирование Са-мобилизующей фосфолипидной сигнальных систем; **ингибирование аденилатциклазной и активация Са-мобилизующей фосфолипидной сигнальных систем; здесь и в табл. 2, 3 --- ***бис-(β -хлорэтил)-метатолиламин.

Материалы и методы. В работе использовали ФАВ, способные модифицировать клеточные сигнальные системы в двух основных направлениях: +I/-II и -I /+II. При этом отбирали ФАВ, имеющие, прежде всего, два уровня действия на клеточные сигнальные системы: рецепторный и субмембранный.

Рецепторный уровень воздействия препаратов на клеточные сигнальные системы характеризуется

активирующим либо блокирующим их влиянием на внешние рецепторы аденилатциклазной и Са-мобилизующей фосфолипидной систем, которые посредством G-белков передают соответствующий внеклеточный сигнал на ключевые ферменты каскадов [2]. Препараты данного типа, отобранные для проведения исследований и представленные в табл. 1, воздействуют на внешнемембранные рецепторы α_1 , α_2 , H_1 , М, 5-HT $_2$, D_2 , D_1 , H_2 , β , имеющие непо-

средственное отношение к функционированию клеточных сигнальных систем. Кроме того, веществом, принадлежащим к препаратам рецепторного типа действия, является используемый нами трипептид формил-метионил-лейцин-фенилаланин (fMLP), моделирующий фрагмент бактериальной оболочки и широко используемый в качестве стандартного индуктора хемотаксиса [15].

Субмембранный уровень влияния ФАВ предполагает активирующее или блокирующее действие препаратов на клеточные сигнальные системы посредством модификации субмембранных структур, а также влияние на внутриклеточный уровень Ca^{2+} . Среди препаратов указанного типа использовали ФАВ, воздействующие на различные ветви (циклооксигеназную и липоксигеназную) процесса метаболизации арахидоновой кислоты [16] (аспирин, вольтарен, кверцетин, BW-755C), а также ингибирующие ферменты PDE-cAMP и FDE-cGMP (кофеин, теофиллин, папаверин). Отдельно стоит отметить группу препаратов, обладающих противоопухолевой активностью (эмбихин, бис-(β -хлорэтил)-метатолимин, циклофосфан), которые являются непосредственными активаторами аденилатциклазы и ингибиторами ключевого фермента PDE-cAMP [17]. В состав исследуемых препаратов включены также ФАВ (верапамил, нитрендипин, форидон), оказывающие регуляторное воздействие на внутриклеточный уровень Ca^{2+} благодаря блокированию хемотаксиса Ca^{2+} -каналов [18].

Хемотаксис ПМЯЛ изучали на клетках, выделенных из крови крыс с массой тела 200—250 г. ПМЯЛ выделяли дифференциальным центрифугированием цельной крови, полученной после декапитации крыс. В 1 мл суспензии содержалось $(5 \div 8) \cdot 10^5$ клеток.

Для оценки миграционных свойств ПМЯЛ использована тест-система по [19]. В нижнюю камеру вносили стандартный хемотаксис fMLP в концентрации 10^{-7} моль/л, а в верхнюю камеру тест-системы — 0,5 мл взвеси интактных клеток (контроль) или 0,5 мл взвеси клеток, предварительно проинкубированных в течение 30 мин в присутствии исследуемых веществ. ФАВ вносили до конечной концентрации 10^{-4} — 10^{-6} моль/л. Тест-систему инкубировали при $t = 37,0 \pm 0,5$ °C в течение 2 ч.

Агрегацию тромбоцитов изучали на клетках, выделенных из крови крыс с массой тела 200—250 г по методике [20]. Кровь получали после декапитации крыс, центрифугировали ее при 200 г

в течение 20 мин и отбирали плазму, обогащенную тромбоцитами (ПОТ). ПОТ загружали в предварительно силиконизированную термостатированную кювету фотоэлектро-колориметра КФК-2 (длина оптического пути 5 мм). Инкубировали при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C и перемешивании со скоростью 1100 мин^{-1} . Суспензию клеток преинкубировали в течение 2 мин, затем добавляли 0,02 мл раствора исследуемого ФАВ в 0,9 %-м NaCl. Через 1 мин в качестве инициатора агрегации добавляли 0,02 мл раствора тромбина до конечной концентрации 0,25 NIH/мл. Концентрация клеток в 1 мл в суспензии составляла $(1,2 \div 1,5) \cdot 10^5$, что соответствовало оптической плотности $0,45 \div 0,60$ при длине волны 590 нм. Калибровка показала, что при избранной концентрации клеток оптическая плотность суспензии тромбоцитов линейно снижается по мере уменьшения концентрации клеток. В эксперименте использовали 2 мл ПОТ.

Воздействие препаратов на электростимулируемую сократимость гладкой мышцы мочеочника проводили на изолированных отрезках мочеочника морской свинки длиной 10 мм и диаметром около 1 мм. Для регистрации сократительной активности использовали методику «непрерывного быстрого потока» [21]. Объем камеры составлял 0,15 мл при длине 20 мм и диаметре 3 мм. Омывающий раствор подавали с помощью перистальтического насоса со скоростью 1 мл/мин. Полоску стимулировали, проводя ее через хлоросеребряные электроды. Параметры стимуляции: амплитуда импульсов — 5 В, длительность импульса — 0,004 с, период стимуляции — 0,02 с, длительность серии — 0,5 с, форма импульсов — прямоугольная. Полученное механическое сокращение преобразовывали в электрический сигнал с помощью механотрона 6MX1C в изометрическом режиме. Сократительные ответы регистрировали на двухканальном самописце TZ 4620.

Электрофоретическую подвижность лейкоцитов исследовали по известной методике [22] на крысах-самцах линии Вистар с массой тела 150—200 г. Нейтрофильные лейкоциты получали из гепаринизированной крови крыс центрифугированием в градиенте плотности фиколл:верографин ($d = 1,095 \text{ г/см}^3$). Измерения проводили в камере, представляющей собой стеклянную цилиндрическую трубку диаметром 1,5 мм и длиной 120 мм с прямоугольным отверстием в верхней части размером $1,5 \times 18$ мм. Напряжение к концам камеры подводили от УИП-1 с помощью хлоросеребряных

электродов. Все измерения осуществляли при температуре 20 °С.

Скорость передвижения клеток определяли в нижнем стационарном слое, измеряя время пробега клеткой дистанции 50—100 мкм при разной полярности электрического поля. При проведении эксперимента использовали раствор следующего состава (ммоль/л): KCl — 2,5, CaCl₂ — 2, глюкоза — 280, трис-HCl — 10,0; pH 7,4±0,1 при t = 20 °С. Электрофорез лейкоцитов проводили в течение 10 мин, исследуемые соединения (конечная концентрация 10⁻⁴ моль/л) вносили в суспензию клеток (концентрация 2,5·10⁶ клеток/мл) за 5 мин до помещения ее в камеру.

Материалы исследований обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее ошибки. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента [23].

Для анализа полученных экспериментальных данных использовали метод кластерного анализа из пакета программ «Statsoft Statistica 6.0», основанный на иерархической классификации с использованием евклидовой метрики. Результаты кластерного анализа представляли в виде дендрограмм [24, 25].

Результаты и обсуждение. При воздействии ФАВ на соответствующие биообъекты наблюдаются значительные изменения в реакциях хемотаксиса ПМЯЛ, агрегации тромбоцитов, сократимости гладкой мышцы мочеточника и электрофореза нейтрофилов. Из результатов, приведенных в табл. 2, 3, оценить как стереотип действия ФАВ на клеточные сигнальные системы, так и информативность используемых биомоделей достаточно сложно, поскольку ряд ФАВ при различных концентрациях имеет противоположную направленность действия. Например, эмбихин в концентрации 10⁻⁴ моль/л угнетает процесс хемотаксиса ПМЯЛ, однако в концентрации 10⁻⁶ моль/л достоверно активирует эту реакцию, при этом в концентрации 10⁻⁵ моль/л он не вызывает достоверных изменений. Здесь необходимо также учесть большое количество статистически недостоверных (0,05 < *p* < 0,1) результатов. По этой причине целесообразно провести кластерный анализ полученных экспериментальных данных, для чего их, прежде всего, нужно нормализовать по формуле

$$C = A_1/A_2,$$

где *C* — нормализованный результат; *A*₁ — резуль-

тат, полученный в опыте; *A*₂ — результат, контрольного эксперимента.

Стандартизованные таким образом результаты использовали для кластерного анализа. Дендрограммы кластерного анализа стимулированной подвижности ПМЯЛ, агрегации тромбоцитов и электростимулированного сокращения гладких мышц органа представлены на рисунке. Для повышения информативности данные по электрофорезу нейтрофильных лейкоцитов проанализированы в комбинации с результатами по стимулированной подвижности ПМЯЛ и показаны на рисунке, 2

Информативность биомоделей оценивали по корректному объединению ФАВ в два кластера, в соответствии со стереотипом действия этих веществ на аденилатциклазную и Са-мобилизующую фосфолипидную сигнальные системы (табл. 1). Так, на дендрограмме (рисунок, 2) кластерного анализа комбинированных данных по электрофорезу ПМЯЛ и стимулированной подвижности ПМЯЛ на начальном этапе кластеризации необходимо отметить разделение исходного множества ФАВ на два кластера. В одном из них находятся мезатон, обзидан, клонидин и fMLP, а в другом — оставшиеся ФАВ. Данное распределение ФАВ полностью соответствует их стереотипу действия на клеточные сигнальные системы (табл. 1).

Объединение ФАВ в кластеры предполагает наличие у них сходных результатов действия на рассмотренные биомодели, а соответствие результатов кластеризации и стереотипов действия ФАВ на клеточные сигнальные системы позволяет предположить высокую чувствительность биомоделей к различным ксенобиотикам.

Важно отметить, что биомодели на основе электрофореза ПМЯЛ и стимулированной подвижности ПМЯЛ достаточно адекватно реагируют на ФАВ противоположных классов (+I/-II и -I/+II), при этом ФАВ класса +I/-II обладают ингибирующим действием на указанные клеточные реакции, а вещества класса -I/+II — активирующим. Далее при проведении кластерного анализа результатов других биомоделей, в частности, реакции агрегации тромбоцитов и электростимулированных сокращений гладких мышц органа образования двух кластеров в соответствии со стереотипом действия ФАВ не наблюдается, из чего можно сделать вывод о недостаточной чувствительности указанных биомоделей.

Полученные результаты позволяют предложить исследованные модельные системы, т. е. хе-

Таблица 2

Влияние физиологически активных веществ (ФАВ) на стимулированную подвижность полиморфноядерных лимфоцитов (ПМЯЛ) и агрегацию тромбоцитов

Исследуемые ФАВ	Хемотаксис ПМЯЛ			Агрегация тромбоцитов		
	Количество клеток, проникших в поры фильтра, при концентрации ФАВ (моль/л, М±m, n = 4)			Скорость изменения оптической плотности при концентрации ФАВ (моль/л, М±m, n = 6)		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Атропин	30,0±1,5*	13,9±2,6*	16,5±1,0*	9,5±0,3*	7,8±0,2*	8,9±0,3
BW-755C	17,0±0,5*	14,5±1,1*	20,8±0,5*	7,0±0,2*	9,9±0,6	10,7±0,5
Эмбихин	8,0±1,0*	11,8±0,9	21,1±1,5*	9,7±0,8	10,0±0,4	11,2±0,2
Теофиллин	17,8±1,0*	29,5±1,0*	29,2±1,5*	8,6±0,7	10,1±0,2	10,9±0,4
Кверцетин	12,0±0,5*	13,2±1,5*	13,0±2,0*	9,1±0,4	9,8±0,4	11,9±0,3
Димедрол	9,0±1,0	9,2±1,0	9,6±1,0	9,8±0,4	6,5±0,3*	7,6±0,4*
МКДХЭА***	11,0±0,5	11,0±2,0	12,0±1,5	5,8±0,6*	7,6±0,3*	7,7±0,6*
Изадрин	17,5±0,5*	11,2±0,5	24,5±1,5*	8,3±0,3	10,1±0,2	9,8±0,4
Форидон	9,0±0,5*	8,5±1,0*	6,5±0,5*	8,5±0,2	9,6±0,4	9,0±0,4
Аспирин	24,0±0,5*	24,5±1,0*	25,0±1,0*	6,3±0,2*	6,0±0,6*	6,8±0,1*
Вольтарен	6,0±0,5*	7,3±1,0*	19,5±0,6*	0,3±0,04*	6,0±0,4*	7,2±0,5*
Папаверин	24,3±1,0*	24,5±0,5*	26,0±1,0*	4,0±0,2*	6,0±0,3*	9,2±0,1
Циклофосфан	21,5±0,5	17,5±0,5*	17,0±0,5*	8,5±0,3	9,0±0,2	9,5±0,4
Кофеин	29,5±0,5*	35,5±1,5*	23,5±0,5*	3,4±0,3*	7,0±0,6*	10,1±0,4
Сульпирид	21,0±1,0*	21,5±1,5*	21,0±0,5*	13,5±0,5*	9,5±0,2	12,5±0,3*
Нитрендипин	15,5±0,5*	13,4±1,5*	21,0±0,5*	3,9±0,1*	9,8±0,3	9,3±0,2
Милдронат	24,3±0,5*	22,5±2,0*	22,0±0,5*	7,9±0,3*	8,4±0,5	8,4±0,2
Иохимбин	17,0±1,0*	18,5±0,5*	25,5±1,0*	5,5±0,3*	7,2±0,1*	13,0±0,1*
Празозин	26,5±1,0*	26,5±1,0*	27,0±0,5*	6,1±0,2*	16,2±0,3*	10,8±0,1
Галоперидол	14,1±1,5*	20,0±0,5*	27,5±1,0*	5,0±0,2*	5,0±0,1*	9,8±0,2
Фторацизин	26,0±1,5*	23,0±0,5*	24,0±1,0*	9,9±0,1	9,6±0,2	9,5±0,2
Аминазин	28,5±1,5*	29,5±0,5*	28,0±1,0*	1,6±0,1*	2,3±0,1*	11,9±0,3
Имипрамин	16,0±1,5*	14,0±1,0*	20,8±1,5*	10,9±0,2	14,9±0,1*	14,2±0,2*
Дроперидол	18,0±1,5*	13,6±1,5*	19,6±1,0*	3,3±0,2*	1,3±0,1*	5,6±0,2*
Верапамил	15,5±1,5*	26,0±2,0*	25,6±1,0*	10,6±0,2	8,6±0,1	8,1±0,2
fMLP	19,0±1,5*	20,0±2,0*	24,0±2,5*	0,5±0,1*	3,9±0,2*	9,9±0,3
Мезатон	48,6±1,5*	50,4±1,5*	19,9±1,0*	8,8±0,7	9,1±0,4	10,5±0,3
Обзидан	25,5±1,5*	26,6±2,0*	24,0±1,0*	7,4±0,5*	9,9±0,1	7,4±0,6*
Клонидин	33,0±1,5*	36,5±0,5*	26,0±0,5*	8,1±0,4	10,2±0,7	10,5±0,4
Контроль	11,3±1,5	11,3±1,5	11,3±1,5	10,1±0,9	10,1±0,9	10,1±0,9

Примечание. *Показатель достоверно ($p < 0,05$) отличается от контроля.

мотаксис ПМЯЛ и электрофорез нейтрофильных лейкоцитов, для предварительной оценки биологической активности химических соединений. При этом достаточно модифицировать новым химическим соединением клетки вышеуказанных клеточных реакций, а полученные результаты в составе массива данных подвергнуть кластерному анализу.

На дендрограммах будет определена принадлежность нового химического соединения к одному из классов ФАВ (+I/-II или -I/+II). Исходя из этого можно прогнозировать для исследуемого вещества определенные виды биологической активности. В частности, первоначальное отнесение вещества к классу +I/-II позволяет предположить у него нали-

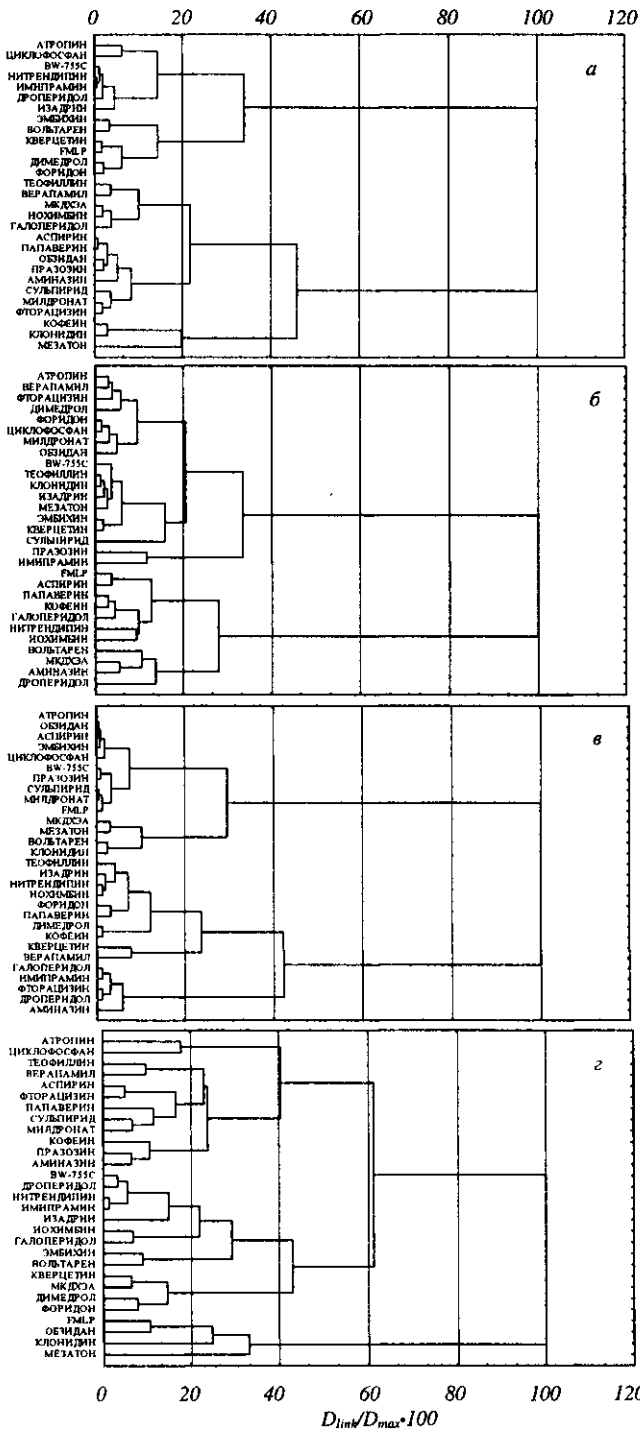
Таблица 3
Влияние физиологически активных веществ (ФАВ) на сократимость гладкой мышцы мочеточника и электрофоретическую подвижность лейкоцитов

Исследуемые ФАВ	Амплитудные значения сократимости (мН) при концентрации ФАВ (моль/л, $M \pm m$, $n = 4$)			Электрофоретическая подвижность лейкоцитов ($m \cdot c^{-1} \cdot V^{-1}$) при концентрации ФАВ (моль/л, $M \pm m$, $n = 4$)
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
Атропин	5,7±0,2	5,8±0,2	5,8±0,1	0,59±0,12*
BW-755C	5,5±0,2*	6,3±0,2	6,3±0,2	0,68±0,04*
Эмбихин	5,9±0,1	5,8±0,2	5,9±0,2	0,86±0,11
Теофиллин	4,9±0,1*	5,7±0,1*	5,9±0,1	0,55±0,03*
Кверцетин	1,5±0,2*	4,3±0,1*	5,8±0,2	0,55±0,06*
Димедрол	3,7±0,2*	6,3±0,1	6,4±0,2	0,66±0,04*
МКДХЭ***	8,5±0,4*	7,9±0,3*	6,6±0,2*	0,46±0,02*
Изадрин	4,7±0,2*	4,8±0,1*	5,7±0,1*	0,48±0,03*
Форидон	0,4±0,1*	0,45±0,1*	0,5±0,1*	0,55±0,04*
Аспирин	5,7±0,2	5,9±0,2	5,9±0,1	0,55±0,08*
Вольтарен	7,±0,3*	6,6±0,2*	5,9±0,2	0,82±0,02
Папаверин	0,3±0,1*	4,7±0,2*	5,8±0,1	0,79±0,04
Циклофосфан	6,1±0,2	6,0±0,1	6,3±0,2	0,43±0,05*
Кофеин	5,7±0,1*	5,8±0,1	5,8±0,2	0,72±0,05*
Сульпирид	6,2±0,2	6,4±0,2	6,5±0,2*	0,76±0,02
Нитрендипин	0,6±0,1*	5,0±0,2*	5,4±0,2*	0,65±0,04*
Милдронат	6,1±0,2	6,3±0,1	6,4±0,2	0,71±0,07*
Иохимбин	4,5±0,1*	5,2±0,2*	6,4±0,2	0,78±0,02
Празозин	5,8±0,1	6,3±0,2	6,1±0,1	0,61±0,03*
Галоперидол	0,9±0,1*	6,3±0,2	6,2±0,2	0,75±0,06
Фторацизин	1,0±0,1*	5,9±0,2	5,9±0,2	0,51±0,04*
Аминазин	2,3±0,1*	6,7±0,3*	6,1±0,2	0,59±0,03*
Импипрамин	1,2±0,1*	6,5±0,3	6,0±0,2	0,65±0,06*
Дроперидол	1,4±0,2*	6,0±0,3	5,9±0,3	0,70±0,04*
Верапамил	2,3±0,1*	2,6±0,3*	5,4±0,2	0,60±0,03*
гМЛР	6,5±0,2*	6,4±0,2	6,3±0,1	0,93±0,07*
Мезатон	9,0±0,3*	7,3±0,2*	6,4±0,2	0,98±0,03*
Обзидан	4,0±0,1*	6,1±0,1	6,3±0,2	1,19±0,07*
Клонидин	6,9±0,1*	6,6±0,1*	5,9±0,1	1,28±0,06*
Контроль	6,1±0,1	6,1±0,1	6,1±0,1	0,84±0,03

Примечание. *Показатель достоверно ($p < 0,05$) отличается от контроля.

чие спазмолитического, антипсихотического, противовоспалительного, противоопухолевого, антикоагулянтного, антиаллергического действия. Для веществ класса -I/+II характерны кардио- и вазотонические, психо- и иммуностимулирующие, гипогликемические и другие эффекты.

Выводы. При воздействии ФАВ на соответствующие клетки и органы изучаемых модельных систем отмечены существенные функциональные изменения. В большинстве случаев наблюдается адекватный ответ на действие ФАВ двух биорегуляторных классов: активация под действием ФАВ



Дендрограмма кластерного анализа данных по хемотаксису полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) (а), агрегации тромбоцитов (б), сократимости гладкой мышцы (в), а также по хемотоксису ПМЯЛ и электрофоретической подвижности лейкоцитов (г). По оси абсцисс указано стандартизованное расстояние между объектами в виде евклидова расстояния между точками в пространстве (D_{link}), деленного на максимальное расстояние между кластерами (D_{max})

класса $-I/+II$ и угнетение в присутствии ФАВ класса $+I/-II$. Ряд изученных реакций, в частности, хемотаксис ПМЯЛ и электрофорез нейтрофильных лейкоцитов являются достаточно чувствительными биомоделями, адекватно реагирующими на воздействие ФАВ двух биорегуляторных классов. Полученные результаты позволяют предложить вышеуказанные клеточные реакции для первичного тестирования потенциальных ФАВ.

I. V. Semenuta, L. A. Metelitsa, L. E. Kalashnikova, R. A. Prokopenko

Research on sensitivity of biomodels for initial testing potential physiologically active substances by the method of cluster analysis

Summary

The sensitivity of blood cells and functional activity of unstriped muscles to physiologically active substances of various chemical nature has been investigated. It is shown, that the stimulating of the chemotaxis and electrophoresis of leucocytes can be used for a tentative estimation of biological potency of new chemical materials, as well as for the further study of mechanisms of influence of various physiologically active substances on immunocompetent cells. The means of handling of heterogeneous and statistically uncertain data by the method of cluster analysis is offered.

I. V. Semenuta, L. A. Metelitsa, L. E. Kalashnikova, R. A. Prokopenko

Дослідження чутливості біомоделей для первинного тестування потенційних фізіологічно активних речовин методом кластерного аналізу

Резюме

Досліджували чутливість клітин крові та функціональну активність гладеньких м'язів до фізіологічно активних речовин (ФАР) різної хімічної природи. Показано, що реакції хемотаксису поліморфноядерних лейкоцитів та електрофорезу нейтрофілних лейкоцитів можуть бути використані для попередньої оцінки біологічної активності нових хімічних речовин, а також для подальшого вивчення механізмів впливу різних ФАР на імунокомпетентні клітини. Запропоновано спосіб обробки неоднорідних та статистично недостовірних даних методом кластерного аналізу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенюта И. В., Метелица Л. А., Чарочкина Л. Л., Могилович С. Е. Исследование чувствительности клеточных реакций к физиологически активным веществам методом кластерного анализа // Вісн. ЛДПУ.—2001.—№ 11.—С. 95—102.
2. Химия биорегуляторных процессов / Под ред. В. П. Кухаря, А. И. Луйка.—Киев: Наук. думка, 1992.—368 с.
3. Калашникова Л. Е. Связь поверхностного заряда мембраны нейтрофилов с функционированием клеточных сигнальных каскадов: Дис. ... канд. биол. наук.—К., 1994.—154 с.
4. Пухальская Т. Г., Колосова О. А., Меньшиков М. Ю., Вейн А. М. Влияние антагонистов кальция на серотонинзависимую агрегацию и транспорт серотонина в тромбоцитах больных с мигренью // Биол. эксперим. биологии и медицины.—2000.—130, № 7.—С. 26—33.

5. Andersson K. E. Neurotransmission and drug effects in urethral smooth muscle // *Scand. J. Urol. Nephrol.*—2001.—207, Suppl.—P. 26—34.
6. Hidi R., Timmermans S., Liu E., Schudt C., Dent G., Holgate S., Djukanovic R. Phosphodiesterase and cyclic adenosine monophosphate-dependent inhibition of T-lymphocyte chemotaxis // *Eur. Respir. J.*—2000.—15, N 2.—P. 342—349.
7. Radchenko I. V., Naidenova I. Yu., Batrak G. N., Luik A. I., Poda G. I., Mogilevich S. E., Kostyuchenko N. V., Kibirev V. K. The similarity of the effects of tosyl-L-arginine methyl ester, atropine, caffeine and antitumour alkylating agent on some biological functions of thrombin and 12-lipoxygenase // *Укр. біохім. журн.*—1993.—65, № 5.—С. 37—40.
8. Прокопенко Р. А. Взаимосвязь между структурой и общим профилем физиологической активности веществ, действующих на сократимость гладких мышц: Дис. ... канд. биол. наук.—К., 1996.—122 с.
9. Метелица Л. А., Калашикова Л. Е., Могилевич С. Е., Луйк А. И. Использование показателей образования Е-розеток и электрофоретической подвижности для комплексной оценки функционального состояния лейкоцитов // *Укр. біохім. журн.*—1996.—68, № 1.—С. 84—88.
10. Konishi K., Urada M., Adachi I., Tanaka T. Inhibitory effect of sanguin H-11 on chemotaxis of neutrophil // *Biol. Pharm. Bull.*—2000.—23, N 2.—P. 213—218.
11. *Статистические методы для ЭВМ* / Под ред. К. Энслейна, Э. Рэлстона, Г. Уилфа.—М.: Наука, 1986.—464 с.
12. Краскэл Дж. Б. Взаимосвязь между многомерным шкалированием и кластер-анализом // *Классификация и кластер* / Пер. с англ.—М.: Мир, 1980.—С. 21—41.
13. Дюран Б., Одел П. Кластерный анализ.—М.: Статистика, 1977.—128 с.
14. Крамер Г. Математические методы статистики.—М.: Мир, 1975.—648 с.
15. Mackarel A. J., Russell K. J., Brady C. S., FitzGerald M. X., O'Connor C. M. Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells *in vitro* // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*—2000.—23, N 2.—P. 154—161.
16. Hsu M. F., Lin C. N., Lu M. C., Wang J. P. Inhibition of the arachidonic acid cascade by norathyriol via blockade of cyclooxygenase and lipoxygenase activity in neutrophils // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*—2004.—369, N 5.—P. 507—515.
17. Мухин В. В., Пода Г. И., Балденков Г. Н., Луйк А. И. Мембранные механизмы действия алкилирующих цитостатиков // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1990.—№ 4.—С. 351—353.
18. Varadi A., Rutter G. A. Dynamic imaging of endoplasmic reticulum Ca(2+) concentration in insulin-secreting MIN6 cells using recombinant targeted cameleons: roles of sarco(endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA)-2 and ryanodine receptors // *Diabetes.*—2002.—51, N 1.—P. 190—201.
19. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med.*—1962.—115.—P. 453—466.
20. Cazenave J.-P., Hemmendinger S., Beretz A. L'agregation-plateletaire: outil d'investigation clinique et d'etude pharmacologique. *Methodologie* // *Ann. Biol. Clin.*—1983.—41.—P. 167—179.
21. Зима В. Л., Давидовская Т. Л., Бурдыга Ф. В. Влияние циклического аденозинмонофосфата и ионов кальция на механическую активность сканированных гладких мышц // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1989.—№ 14.—С. 36—41.
22. Духин С. С., Дерягин Б. В. *Электрофорез.*—М.: Наука, 1976.—353 с.
23. Сепетлиев Д. *Статистические методы в научных медицинских исследованиях* / Под ред. А. М. Меркова.—М.: Медицина, 1968.—420 с.
24. *Классификация и кластер* / Под ред. Дж. Вэн Райзина.—М.: Мир, 1980.—390 с.
25. Bolshev L. N. Cluster analysis // *Bull. Int. Stat. Inst.*—1989.—16, N 43.—P. 425—441.

УДК 612.112:615.015.4:519.237.8
Надійшла до редакції 13.10.03