

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями ННЦ "Інститут біології" в галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено також нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах і органах у нормі й після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів, наведено результати нових методичних розробок.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів та студентів.

Подано експериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украина, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии" в области физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные об биохимических и биофизических основах регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of Biology" contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалю, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); С. Ю. Морозов, д-р біол. наук, проф. (Московський державний університет ім. М.В. Ломоносова, м. Москва, РФ); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); М. С. Зефіров, д-р біол. наук, проф.; І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А. Г. Мойсеев, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології" ☎ (38044) 521-35-98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 08.12.14 (протокол № 5)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,23), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.); E-Library.ru

Торгало Є., Вакал С., Остапченко Л. Наукометричні бази даних та інтеграція української біологічної періодики у міжнародний інформаційний простір.....	5
Ноздренко Д. Вплив фулперену C60 на зміну швидкості скорочення ішемічного пошкодженого м'язу <i>M. Soleus</i> щура	11
Матвієнко М., Пустовалов А., Держинський М., Михальський С. Можливості корекції кіспептином репродуктивного статусу при застосуванні блокаторів і активаторів α -адренергічних рецепторів	14
Коробейнікова Л. Особливості прояву нейродинамічних функцій у елітних спортсменів-єдиноборців різної статі.....	18
Нечипуренко О., Хархота М., Авдєєва Л. Безпечність штамів-продуцентів каротиноїдів <i>Bacillus sp.</i> 1.1 та <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113 щодо теплокровних тварин.....	21
Харькова А., Мінченко Д., Цимбал Д., Мінченко О. Експресія генів <i>IGFBP1</i> , <i>IGFBP2</i> та <i>IGF2BP3</i> у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму <i>ERN1</i> за умов дефіциту глутаміну і глюкози	24
Довбинчук Т., Берегова Т., Толстановна Г., Закордонець Л. Транспорт води електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотику цефтріаксону	29
Костюк С., Бусенко О. Вплив гамма-опромінення на жирнокислотний склад загальних ліпідів шкіри кролів	34
Галенова Т., Ніколаєва І., Болібрух Х., Половкович С., Новіков В. Вплив нового тіосульфатного похідного хинону на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів.....	36
Варенюк І., Нужина Н., Варенюк В., Держинський М. Вплив мелатоніну на гіпоталамо-адреналову систему птахів: ефект блокади дофамінових D1-рецепторів	40
Гончарова Т., Філімонова Н. Відмінності в електричній активності головного мозку жінок при тестуванні простої сенсомоторної реакції під час фаз овуляції та лютеїнової	43
Єфіменко О., Савченко Ю., Фалалєєва Т., Курик О., Співак М. Морфологічні зміни слизової оболонки шлунка і товстої кишки у щурів різного віку за умов дії нанокристалічного діоксиду церію	46
Свєженцева І., Білько Д., Білько Н., Дягіль І. Особливості еритропоезу при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ	51
Дворщенко К. Зміни енергетичного балансу печінки та підшлункової залози щурів при гіпоацидному стані шлунка та пошук до його відновлення	54
Ракша Н., Бурлова-Васильєва М., Торгалю Є., Савчук О. Поява в крові молекул протромбінового походження за умов розвитку атеротромботичного кардіоемболічного ішемічного інсульту	57
Маркевич А., Богун Л., Харченко О., Кудрявцев К. Вплив низькомолекулярної органічної сполуки 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію на стимульовану карбохоліном шлункову секрецію у щурів.....	60
Расцька Я., Моргасенко О., Ішук Т., Остапченко Л. Динаміка активності трансаміназ при злоякісному рості за умов введення антиоксидантного "GRIN".....	64
Зінабадінова С., Сегеда Т. Використання курячих ембріонів для визначення біологічних ефектів, спричинених дією азбесту та вуглецевих нановолокон	67
Дроздовська С. Асоціація поліморфізмів генів ангіотензинконвертуючого ферменту, ендотеліальної NO-синтази та α -рецептора, що активується проліфераторами пероксисом, з показниками адаптаційних реакцій кардіореспіраторної системи спортсменів до фізичних навантажень.....	71
Кондратюк Т., Калініченко А. Вплив ефірних олій та полігексаметиленгуанідину на чорні дріжджеподібні гриби <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i>	75
Лавриненко В., Чайковський Ю. Вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на макроскопічні показники ембріогенезу курки	80
Степура Л., Радченко О., Зелена П. Вплив додецилсульфату натрію на фізіолого-біохімічні та цито-морфологічні властивості дріжджів родів <i>CANDIDA</i> і <i>SACCHAROMYCES</i>	84
Юрченко А., Конопельнюк В., Торгалю Є., Савчук О. Вплив різних пероральних доз глюкози на вміст серотоніну в сироватці крові щурів	87
Атамнах С., Барановський В., Решетнік Є., Весельський С., Янчук П. Вплив гістаміну на ліпідний склад жовчі щурів.....	93
Аль Далаін Емад., Бисов А., Шевченко О., Шевченко Т., Поліщук В. Деякі вірусні хвороби <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> , що циркулюють на території України	96
Герасченко О., Ковальчук В., Бойдуник О., Солдаткіна М., Погрібний П. Експресія рекомбінантного бета -дефенсину-3 людини та аналіз його біологічної активності.....	98

СОДЕРЖАНИЕ

Торгало Е., Вакал С., Остапченко Л. Наукометрические базы и интеграция украинской биологической периодики в международное информационное пространство	5
Ноздренко Д. Влияние фуллерена C ₆₀ на изменение скорости сокращения ишемически поврежденной мышцы <i>M. Soleus</i> крысы	11
Матвиенко М., Пустовалов А., Дзержинский Н., Михальский С. Возможности коррекции кисспептином репродуктивного статуса при применении блокаторов и активаторов α -адренергических рецепторов	14
Коробейникова Л. Особенности проявления нейродинамических функций у элитных спортсменов-единоборцев разного пола	18
Нечипуренко А., Хархота М., Авдеева Л. Безопасность штаммов-продуцентов каротиноидов <i>Bacillus sp. 1.1</i> и <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113 для теплокровных животных 21	
Харькова А., Минченко Д., Цимбал Д., Минченко О. Экспрессия генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы с подавленной функцией сигнального энзима ERN1 при дефиците глутамин и глюкозы	24
Довбинчук Т., Береговая Т., Толстанов А., Закордонец Л. Транспорт воды через эпителий толстой кишки крыс на фоне введения антибиотика цефтриаксона	29
Костюк С., Бусенко А. Влияние гамма-облучения на жирнокислотный состав общих липидов кожи кроликов	34
Галенова Т., Николаева И., Болибрух К., Половкович С., Новиков В. Влияние нового тиосульфатного производного хинона на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов	36
Варенюк И., Нужина Н., Варенюк В., Дзержинский Н. Влияние мелатонина на гипоталамо-адреналовую систему птиц: эффект блокады дофаминовых D1-рецепторов	40
Гончарова Т., Филимонова Н. Отличия в электрической активности головного мозга женщин при тестировании простой сенсомоторной реакции во время фаз овуляции и лютеиновой	43
Ефименко Е., Савченко Ю., Фалалеева Т., Курик Е., Спивак Н. Морфологические изменения слизистой оболочки желудка и толстой кишки у крыс разного возраста в условиях действия нанокристаллического диоксида церия	46
Свеженцева И., Билько Д., Билько Н., Дягиль И. Особенности эритропоэза при терапии хронической миелоидной лейкемии ингибиторами тирозинкиназы	51
Дворщенко К. Изменения энергетического баланса печени и поджелудочной железы крыс при гипоацидном состоянии желудка и поиск подходов к его восстановлению	54
Ракша Н., Бурлова-Васильева М., Торгало Е., Савчук А. Появление в крови молекул протромбинового происхождения при развитии атеротромботического и кардиоэмболического ишемического инсульта	57
Маркевич А., Богун Л., Харченко О., Кудрявцев К. Влияние низкомолекулярного органического соединения 2-(2-гидроксифенокси)ацетил)-L-пролинат натрия на стимулированную карбоксилином желудочную секрецию у крыс	60
Раяцкая Я., Моргаенко А., Ищук Т., Остапченко Л. Динамика активности трансаминаз при злокачественном росте в условиях введения антиоксидантной "GRIN"	64
Зинабадинова С., Сегеда Т. Использование куриных эмбрионов для определения биологических эффектов, которые возникают под действием азбеста и углеродных нановолокон	67
Дроздовская С. Ассоциация полиморфизмов генов ангиотензинконвертирующего фермента, эндотелиальной NO-синтазы и α -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, с показателями адаптационных реакций кардиореспираторной системы спортсменов к физическим нагрузкам	71
Кондратюк Т., Калиниченко А. Влияние эфирных масел и полигексаметиленгуанидина на черные дрожжеподобные грибы <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i>	75
Лавриненко В., Чайковский Ю. Влияние углеродных материалов разной дисперсности на макроскопические показатели эмбриогенеза курицы	80
Степура Л., Радченко О., Зелена П. Влияние додецилсульфата натрия на физиолого-биохимические и цито-морфологические свойства дрожжей рода <i>CANDIDA</i> и <i>SACCHAROMYCES</i>	84
Юрченко А., Конопельнюк В., Торгало Е., Савчук А. Влияние различных пероральных доз глюкозы на содержание серотонина в сыворотке крови крыс	87
Атамнах С., Барановский В., Решетник Е., Весельский С., Янчук П. Влияние гистамина на липидный состав желчи крыс	93
Аль Далаин Емад., Бисов А., Шевченко О., Шевченко Т., Полищук В. Некоторые вирусные болезни <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> , циркулирующие на территории Украины	96
Герашенко О., Ковальчук В., Бойдуник О., Солдаткина М., Погребной П. Экспрессия рекомбинантного бета-дефенсина-3 человека и анализ его биологической активности	98

CONTENTS

Torgalo E., Vakal S., Ostapchenko L. Scientometric databases and integration of Ukrainian biological journals into common information space	5
Nozdrenko D. Fullerene C60 impact on changes of contraction speed of ischemically damaged rat soleus muscle	11
Matvienko M., Pustovalov A., Dzerzhinsky M., Mikhalsky S. Klisspeptin correction capabilities of the reproductive status upon application of the blockers and activators of α -adrenergic receptors	14
Korobeinikova L. Gender features of presentation of neurodynamic function in elite combat athletes	18
Nechypurenko O., Kharhota M., Avdeeva L. Safety of carotene-producing strains <i>Bacillus sp. 1.1</i> and <i>B. amyloliquefaciens UCM B-5113</i> for homoiothermal animals	21
Kharkova A., Minchenko D., Tsymbal D., Minchenko O. Expression of <i>IGFBP1</i> , <i>IGFBP2</i> and <i>IGFBP3</i> genes in <i>U87</i> glioma cells with suppressed <i>ERN1</i> signaling enzyme function in glutamine and glucose deprivation conditions	24
Dovbychuk T., Beregova T., Tolstanova G., Zakordonets L. Water transport through rat colonic epithelium during ceftriaxone therapy	29
Kostyuk S., Busenko A. Effect of gamma irradiation on fatty acid composition of total lipids in rabbit skin	34
Halenova T., Nikolaeva I., Savchuk O., Bolibrukh K., Polovkovych S., Novikov V. Effects of novel quinoid thiosulfonate derivative on ADP-induced platelet aggregation	36
Vareniuk I., Nuzhyna N., Vareniuk V., Dzerzhynsky M. Influence of melatonin on hypothalamic-adrenal system of birds: effect of dopaminergic D1-receptors blockage	40
Honcharova T., Filimonova N. Differences in electric activity of women brain upon testing of simple sensomotor reactions during ovulation and lutein phases	43
Iefimenko O., Savchenko Iu., Falalyeyeva T., Kyric O., Spivak M. Morphological changes of gastric and colonic mucosa in rats of different ages under the action of nanocrystalline cerium dioxide	46
Sviezhentseva I., Bilko D., Bilko N., Dyagil I. Features of the erythropoiesis upon treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitor	51
Dvorshchenko K. Changes of energy balance of rat liver and pancreas upon gastric hypoacidity and search of approaches for its recovery	54
Raksha N., Burlova-Vasylijeva M., Torgalo E., Savchuk A. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke	57
Markevych A., Bogun L., Harchenko O., Kudryavtsev K. Effect of low molecular weight organic compound sodium 2-(2-hydroxyphenoxy)acetyl-L-prolinate on rat gastric secretion stimulated by carbachol	60
Raetska Ya., Morgaienko O., Ischuk T., Ostapchenko L. Aminotransferase activity in rat blood serum under malignant guerlin's carcinoma growth upon treatment with antioxidant drug "GRIN"	64
Zinabadinova S., Segeda T. Usage of chicken embryos for the determination of biological effects caused by asbestos fibers and carbon nanowires	67
Drozdzovska S. Association of angiotensin converting enzyme, endothelial nitric oxide synthase and peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene polymorphisms with indices of cardiorespiratory systems reactions to exercise	71
Kondratyuk T., Kalinichenko A. Influence of essential oils and polyhexamethyleneguanidine on black yeast-like fungi <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i>	75
Lavrinenko V., Chaykovskiy Yu. Effects of carbonic materials of various sizes on macroscopic indices of chicken embryogenesis	80
Stepura L., Radchenko O., Zelena P. Effects of sodium dodecylsulfate on physiological, biochemical and cytomorphological properties of <i>CANDIDA</i> and <i>SACCHAROMYCES</i> genera	84
Yurchenko A., Konopelniuk V., Torgalo E., Savchuk O. Effect of different oral doses of glucose on the blood serum content of serotonin in rats	87
Athamnah S., Baranovsky V., Reshetnik E., Veselsky S., Yanchuk P. Effect of histamine on lipid composition of rat bile	93
Al Dalain Emad., Bysov A., Shevchenko O., Shevchenko T., Polischuk V. Several viral diseases of <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> circulating in Ukraine	96
Gerashchenko O., Kovalchuk V., Boidunuk O., Soldatkina M., Pogrebnoy P. Fusion expression of recombinant human beta-defensin-3 and analysis of its biological activity	98

НАУКОМЕТРИЧНІ БАЗИ ДАНИХ ТА ІНТЕГРАЦІЯ УКРАЇНСЬКОЇ БІОЛОГІЧНОЇ ПЕРІОДИКИ У МІЖНАРОДНИЙ ІНФОРМАЦІЙНИЙ ПРОСТІР

Розглянуто основні міжнародні індекси цитування та наукометричні бази публікацій: Web of Knowledge, Scopus, Index Copernicus, Google Scholar, Російський індекс наукового цитування. Пояснено принципи розрахунку та відміну між найбільш поширеними наукометричними показниками, такими як імпаکت-фактор, ейгенфактор, h-індекс, SJR, SNIP, ICV тощо. Коротко висвітлено методи пошуку списків журналів, що включені до міжнародних індексів цитування, а також значень вищезгаданих метричних показників. Наведено сучасний перелік українських біологічних журналів, що індексуються міжнародними наукометричними базами, а також висвітлено динаміку їх індексації та цитування за період 1996-2013 рр. Наприкінці розглянуто новітню проблему т.зв. "хижих журналів" та наведено міркування стосовно шляхів покращення відображення української біологічної періодики в міжнародному інформаційному просторі.

Ключові слова: наукометричні бази, періодика, індекси цитування, біологічні журнали.

I. Вступ

Наказ МОНМС №1112 від 17.10.2012 "Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук" спричинив хвилю обговорень в науковій спільноті, пов'язаних з міжнародними наукометричними базами даних. Відповідно до наказу здобувачі вищезгаданих наукових ступенів повинні мати "не менше чотирьох (для кандидатів – не менше однієї) публікацій у наукових періодичних виданнях інших держав", до яких "можуть прирівнюватись публікації у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз" [8]. За два роки, що минули з моменту затвердження наказу, наукометричні рейтинги широко увійшли в наукові кола України, і на даний момент використовуються як показник ефективності роботи науково-педагогічних працівників в багатьох академічних та наукових установах країни. Наочним прикладом є створення цілого ряду національних рейтингів, зокрема "Рейтинг науковців України", "Рейтинг вищих навчальних закладів України", "Рейтинг установ Національної академії наук України" тощо [10].

Необхідність швидкої адаптації стратегії опублікування наукових результатів до нових вимог, потреба у розумінні великого масиву наукометричної та бібліографічної інформації, а також відсутність відповідної навчальної бази породили цілу низку специфічних питань. Чим відрізняються різні наукометричні показники? Як перевірити рівень індексації та якість закордонних наукових видань? Які українські періодичні видання включені до міжнародних наукометричних баз? Даний огляд присвячений роз'ясненню вищенаведених питань та покликаний сформулювати у читача базові навички пошуку наукометричної інформації, а також скласти цілісне бачення місця сучасної української біологічної періодики в системі міжнародної наукометрії.

II. Наукометричні бази даних та індекси цитування

Наукометрична база даних – це вид бібліографічної бази, що індексує та аналізує взаємопосилання публікацій, на основі чого формує кількісний показник значущості статей та журналів для наукової спільноти. Близьке за значенням поняття – *індекс цитування* – також стосується бібліографічних баз, які відстежують та накопичують цитування, проте не обов'язково мають механізм аналізу та кількісної оцінки значущості публікацій. Як індекси цитування, так і наукометричні бази дозволяють відстежити, скільки разів, коли та ким цитувалася будь-яка з проіндексованих статей.

Перші наукові індекси цитування з'явилися ще наприкінці XIX ст., зокрема це "Shepard's citations" та "Index Medicus". Серед найбільш значущих для природничих вчених індексів цитування сучасності слід згадати

"Web of Knowledge", "Scopus", "Index Copernicus", "Google Scholar" та "Російський індекс наукового цитування" [9]. Розглянемо їх детальніше.

Web of Knowledge – це найбільший з існуючих онлайн індексів цитування, що підтримується та оновлюється американською корпорацією Thomson Reuters. На сьогоднішній день Web of Knowledge охоплює більше 23 тисяч наукових журналів та 110 тисяч збірників тез конференцій, що пов'язані більш ніж мільярдом взаємопосилань. Web of Knowledge складається із 17 онлайн-баз, серед яких для біологів найбільше значення мають Biological Abstracts, Biosis Citation Index, Medline, Zoological Record та Web of Science, який, у свою чергу, складається із семи баз, зокрема Science Citation Index Expanded, що індексує понад 6500 наукових журналів природничого спрямування. Варто зазначити, що перелічені бази індексують різний набір журналів, тому включення журналу до однієї з цих баз не означає індексування й в інших базах. Також важливо, що більшість з цих баз не є наукометричними, тобто індексація журналу в деяких базах (наприклад, Zoological Record) не означає, що журнал автоматично має імпакт-фактор.

Практична порада №1. Для того, щоб знайти перелік біологічних журналів, що входять до тієї чи іншої бази в рамках Web of Knowledge, потрібно перейти на офіційний сайт компанії Thomson Reuters та відкрити розділ "Master Journal List" за цим посиланням: <http://ip-science.thomsonreuters.com/mjl>. На сторінці міститься пошукове поле, що дозволяє шукати журнали за ключовими словами, а також посилання на основні індекси цитування, зокрема Biosis Previews, Biological Abstracts, Current Contents® / Life Sciences тощо. Після переходу на сторінки цих індексів, вам знов буде запропоновано провести пошук за ключовими словами (кнопка "Search") або ж переглянути повний перелік усіх включених журналів (кнопка "View journal list"). Варто зазначити, що кожний з цих індексів містить інформацію про індексування журналів в інших базах, що значно спрощує пошук відповідної інформації.

Scopus – це наукометрична база та індекс цитування, що належить нідерландській компанії Elsevier. На даний момент Scopus індексує понад 29 тисяч наукових журналів від більш ніж п'яти тисяч видавництв. За широтою покриття Scopus більший за Web of Science та містить дещо відмінний набір журналів, тому анотування журналу якоюсь із під-баз Web of Science зовсім не означає його індексації у Scopus, хоча для найбільш авторитетних видань це саме так. Оскільки Scopus одночасно є наукометричною базою (робочий інструмент – Journal

Analyzer), для всіх включених до нього журналів вираховуються спеціальні показники SJR, SNIP, h-індекс тощо.

Практична порада №2. Для того, щоб знайти перелік журналів, що індексуються базою Scopus, потрібно перейти на сайт порталу SCImago Journal & Country Rank (<http://www.scimagojr.com/>) та обрати категорію "Journal Rankings". Пошуковий сервіс дозволяє конкретизувати пошук по дисципліні, спеціальності, а також країні походження журналу. Наприклад, якщо звузити пошук лише до українських журналів, то можна побачити, що на даний момент їх всього 34 у Scopus. Над правим верхнім кутом таблиці міститься кнопка "Download data", що дозволяє завантажити перелік журналів у форматі *.xlsx.

Index Copernicus – це наукометрична база даних, що не лише індексує та аналізує періодичні наукові видання, але й має власну систему оцінки вкладу окремих науковців та дослідницьких установ. База належить польській компанії Index Copernicus International. Власне наукометричним індексом цитування є "IC Journals Master List", що охоплює понад 13 тисяч журналів, яким присвоюється специфічний наукометричний показник – ICV.

Практична порада №3. Для того, щоб знайти перелік журналів, що індексуються IC Journals Master List, треба перейти на офіційний сайт Index Copernicus (<http://en.indexcopernicus.com/>) та натиснути на посилання "IC Journals Master List". Внизу нової сторінки зліва потрібно знайти розділ "Menu" та обрати там пункт "IC Journals Master List 2013 – Journals" (списки завжди формуються за минулий рік). Ця сторінка містить пошуковий інтерфейс, який дозволяє шукати журнали за тематичним спрямуванням та країною походження. Також є можливість застосувати спеціальні фільтри, наприклад "Natural Science", що дозволить переглянути список природничих журналів. На жаль, завантажити весь список з сайту неможливо, оскільки він є комерційним продуктом.

Російський індекс наукового цитування (РИНЦ) – це бібліографічна база наукових публікацій вчених країн СНД (переважно Росії) із наукометричним інструментарієм, що розробляється та оновлюється компанією "Наукова електронна бібліотека" на платформі онлайн-бібліотеки "E-library.ru". На даний момент "E-library.ru" індексує понад 49 тисяч журналів, з яких лише 2332 мають так званий "імпаکت-фактор РИНЦ".

Практична порада №4. Для того, щоб знайти перелік журналів, що включені до РИНЦ, необхідно перейти на офіційний сайт Наукової електронної бібліотеки "E-library.ru", на лівій панелі знайти меню "Навігатор" та обрати "Каталог журналів". На новій сторінці в графі "Сортировка" встановити "по імпакт-фактору РИНЦ", а в графі "Порядок" – "по убыванию" та натиснути "Поиск". Всі журнали, що матимуть будь-яке число в графі "ИФ РИНЦ" включені до Російського індексу наукового цитування.

Google Scholar – це бібліографічна база даних повнотекстових статей із потужним пошуковим інтерфейсом, що належить американській корпорації Google. Google Scholar індексує більшість європейських та американських рецензованих журналів, а також книжки і нерецензовані видання. За приблизними оцінками кількість документів у Google Scholar становить понад 160 мільйонів. Цю базу слід вважати швидше вебометричною, аніж наукометричною, оскільки вона використовує спеціальний оціночний алгоритм для формування пошукових видач, а також має власний показник якості

журналів – "індекс h5". На жаль, повного переліку журналів, що індексуються Google Scholar, у зведеному вигляді не існує.

Отже, які ж з розглянутих баз та індексів цитування в повній мірі підпадають під визначення "міжнародна наукометрична база"? Це Scopus, Science Citation Index (із Journal Citation Report), Index Copernicus та РИНЦ. Слід зазначити, що існують також інші наукометричні бази, які не мають особливого визнання у науковій спільноті: Indian Citation Index, CiteFactor, ResearchBible тощо.

III. Найбільш поширені наукометричні показники

Кожна наукометрична система має власні оціночні критерії якості та значущості періодичних видань та (або) окремих науковців. Найбільш відомими та часто вживаними є імпакт-фактор (ІФ) та h-індекс; окрім того, в деяких колах поширені такі наукометричні показники як ICV, SNIP, ІФ РИНЦ, ейгенфактор, h5-індекс тощо (Рис. 1).

Імпакт-фактор журналу – це наукометричний показник, що відображає середню кількість цитувань нещодавно опублікованих у цьому журналі статей. ІФ розраховується на щорічній основі та публікується у спеціальному виданні корпорації Thomson Reuters "Journal Citation Reports". До цього видання потрапляють тільки ті журнали, що включені до індексів цитування Science Citation Index Expanded та Social Science Citation Index. Отже, лише ті біологічні журнали, що індексуються в Science Citation Index Expanded мають ІФ.

ІФ завжди вираховується за минулий рік. Таким чином, у 2014 році можна знайти величину ІФ за 2013 рік. Для будь-якого року ІФ журналу розраховується як середня кількість цитувань статей, що були опубліковані в цьому журналі за два попередніх роки. Наприклад, якщо журнал "BMC Biology" у 2013 році має ІФ 7,43, то це означає, що статті, які були опубліковані в цьому журналі у 2011 та 2012 роках цитувалися в середньому по 7,43 рази кожна.

Практична порада №5. Знайти значення ІФ будь-якого журналу можна декількома шляхами. По-перше, можна придбати або знайти в Інтернеті електронну версію журналу Journal Citation Reports. По-друге, величина ІФ звичайно зазначається на офіційних сайтах наукових журналів. По-третє, величину ІФ (щоправда застарілу) можна знайти в науковій соціальній мережі Researchgate (www.researchgate.net/): для цього у пошуковому вікні у правому верхньому куті сторінки потрібно ввести назву цільового журналу; серед результатів будуть міститись статті з цього журналу із зазначеним імпакт-фактором видання.

h-індекс (індекс Хірша) – це наукометричний показник, що вимірює продуктивність та значущість публікацій наукового журналу або окремого вченого. На даний момент h-індекс є найбільш розповсюдженим та широко визнаним (в останні роки – і в Україні) критерієм ефективності роботи науковців та цілих установ. Він відображає одночасно кількість статей та середню кількість цитувань кожної з них. Індекс Хірша розраховується автоматичними інструментами баз Scopus, Web of Science та Google Scholar; при цьому значення його для різних баз буде відрізнятися, що пов'язано із індексацією різного набору журналів [1].

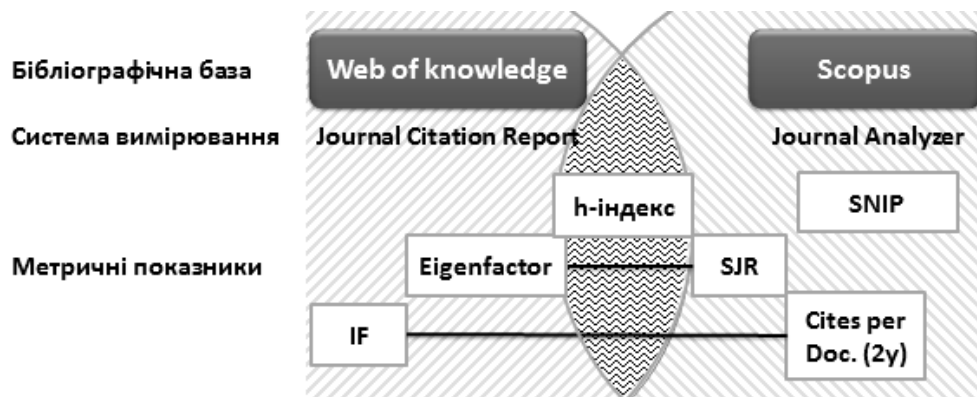


Рис. 1. Найбільш поширені міжнародні наукометричні показники. Прямою лінією сполучено рівнозначні показники в різних базах

Принцип розрахунку індексу Хірша наступний: науковець має h -індекс n , якщо n його статей було процитовано принаймні n раз, а всі інші статті отримали менше n цитувань. Наприклад, якщо науковець має індекс Хірша 7, це означає, що він опублікував не менше 7 статей, кожна з яких було процитовано принаймні 7 разів. Для журналів принцип розрахунку аналогічний. Наприклад, "Український біохімічний журнал" має h -індекс 9, і це означає, що в ньому було опубліковано не менше 9 статей, кожна з яких було процитовано 9 і більше разів.

Індекс Хірша має ряд вагомих недоліків, зокрема залежність від загальної кількості публікацій. Наприклад, вчений міг опублікувати всього 2 видатних статті, кожна з яких буде процитовано сотні разів, при цьому його h -індекс становитиме всього 2. У той же час інший вчений міг опублікувати 5-6 посередніх статей, які отримають по 6-7 цитувань і мати h -індекс на рівні 5-6. Разом з тим h -індекс враховує недоліки інших наукометричних показників, які враховують загальну кількість статей або загальну кількість цитувань.

Практична порада №6. Як знайти h -індекс для будь-якого вченого у базі Scopus? Якщо ваша установа не має профілю в системі Scopus, потрібно ввести у пошуковій мережі "Free Scopus Author Preview". Перше ж посилання введе вас на сторінку пошукового сервісу, де потрібно вказати прізвище науковця латиницею. Після цього ви отримаєте перелік всіх науковців із цим прізвищем. Виходячи з ініціалів, спеціальності та установи, відкрийте профіль відповідного науковця. Індекс Хірша буде зазначено у графі " h -індекс".

SCImago Journal Rank (SJR) – це показник наукової значущості журналів, що залежить як від кількості цитувань статей цього журналу, так і від престижу журналів, яким належать ці цитування. SJR – це приклад показника, що враховує не лише кількість цитувань, а й їхню якість. SJR розраховується виключно для журналів, що індексуються наукометричною базою Scopus. Одночасно з даним показником у системі Scopus розраховується *середня кількість цитувань кожного документу за дворічний період* (Cites per Doc., 2y). Дана величина розраховується ідентично до вищезгаданого імпаکت-фактору, але для іншого набору журналів. Значення обох показників можна знайти на сайті SCImago Journal & Country Rank.

Ейгенфактор – це ще один показник значущості наукового журналу, що базується на визначенні загальної кількості цитувань статей видання із урахуванням престижу журналів, яким належать ці цитування. Ейгенфактор є аналогом показника SJR, але розраховується для журналів, що індексуються Web of Science (як і імпакт-фактор). Ейгенфактор вважається більш чітким показником значущості журналу, ніж імпакт-фактор,

оскільки останній враховує лише загальну кількість цитувань, ігноруючи престиж журналів-цитаторів [6].

Source normalized impact per paper (SNIP) – це показник, що відображає співвідношення між середньою кількістю цитувань статей журналу та потенціалом цитування у конкретній науковій галузі. Відомо, що різні галузі мають дещо відмінний потенціал цитування. Найбільш інтенсивно цитуються природничі публікації, найменш – гуманітарні. Показник SNIP враховує цю відмінність та дозволяє прямо порівнювати значущість журналів з різних галузей. SNIP розраховується системою Journal Analyzer виключно для журналів, що індексуються базою Scopus [7].

Index Copernicus Value (ICV) – це показник видавничої якості наукових журналів, що індексуються наукометричною базою Index Copernicus. Значення ICV розраховується за складним багатоступеневим алгоритмом, який враховує стабільність видання, склад редакційної колегії, загальну кількість статей, технічну якість, міжнародність, дотримання професійної етики і т.д. На думку Білла [4] ICV абсолютно не відображає наукову якість та значущість журналу, вказуючи лише на технічну якість.

Імпакт-фактор РИНЦ – це показник наукової значущості журналів, що індексуються Російським індексом наукового цитування. ІФ РИНЦ розраховується аналогічно до імпакт-фактору Journal Citation Reports та відображає середню кількість цитувань статей журналу за дво- або п'ятирічний період. Цей показник має локальне значення, оскільки відображає значущість російськомовних журналів та журналів з пострадянських країн.

Індекс $h5$ – метричний показник журналів, що індексуються Google Scholar, який чисельно дорівнює h -індексу журналу при врахуванні статей за останні п'ять років. Одночасно розраховуються такі показники як $h5$ -медіана та $h5$ -кор, які відображають особливості розподілу цитувань серед статей журналу.

IV. Українські біологічні журнали у міжнародних наукометричних базах даних

Вище згадувалось, що відповідно до Наказу МОНМС №1112 від 17.10.2012 "Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук" здобувачі повинні мати публікації у наукових виданнях інших держав або українських виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами. У той же час ні один нормативний документ не роз'яснює, які саме бази мають бути на увазі, що створює плутанину, адже наукометричних баз доволі багато (див. розділ II), до того ж є велика кількість закордонних видань, які вищезгаданими базами не індексуються. На практиці ж від здобувачів вимагають статті в українських або закордонних журналах, що індексуються виключно Scopus або Web of Science. Розглянемо детальніше, які українські журна-

ли біологічної тематики індексуються основними міжнародними наукометричними базами.

Web of Knowledge. Всього в різноманітних базах, що належать до Web of Knowledge, було виявлено 21 біологічний журнал українського походження. Серед них лише два індексуються Science Citation Index Expanded з Web of Science і мають імпакт-фактор. Це "Нейрофізіологія" (ІФ 2013 = 0,174) та "Цитологія і генетика" (ІФ 2013 = 0,282). Всі інші журнали індексуються або в BIOSIS Previews, або Zoological Records, які, по суті, є лише індексами цитування, але не наукометричними базами. До BIOSIS Previews включено такі журнали: "Біополімери і клітина", "Експериментальна онкологія", "Нейрофізіологія", "Український біохімічний журнал", "Український ботанічний журнал", "Фізіологічний журнал". Ще 13 журналів індексуються базою Zoological Records: "Авіафауна України", "Беркут. Український орнітологічний журнал", "Вісник Львівського університету. Серія біологічна", "Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: Біологія", "Доповіді Національної академії наук України", "Гідробіологічний журнал", "Запо-

відна справа в Україні", "Морський екологічний журнал", "Наукові записки державного природознавчого музею", "Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія", "Українська ентомофауністика", "Український антарктичний журнал" та "Фауна України".

Scopus. На сьогоднішній день лише 7 біологічних журналів з України включено до бази Scopus. Це "Експериментальна онкологія" (тематика за рубрикатом Scopus: онкологія, дослідження раку), "Вісник зоології" (екологія, еволюція, поведінкова біологія, систематика, зоологія), "Біополімери та клітина" (біохімія, генетика, молекулярна біологія), "Цитологія і генетика" (біохімія, генетика, молекулярна біологія, медицина), "Український біохімічний журнал" (біохімія, генетика, молекулярна біологія), "Фізіологічний журнал" (медицина) та "Мікробіологічний журнал" (медицина). Також до Scopus включено англomовну версію українського журналу "Нейрофізіологія" – "Neurophysiology" (біохімія, генетика, молекулярна біологія, медицина, нейробіологія). У табл. 1 наведено значення різних оціночних критеріїв БД Scopus для українських біологічних журналів.

Таблиця 1. Наукометричні показники бази Scopus для українських біологічних журналів за 2013 рік

№	Назва журналу	SJR	H-індекс	Середня кількість цитувань кожної статті / 2 роки
1	Експериментальна онкологія	0,675	24	1,55
2	Вісник зоології	0,331	3	0,45
3	Біополімери та клітина	0,188	9	0,42
4	Цитологія і генетика	0,146	9	0,18
5	Український біохімічний журнал	0,126	9	0,12
6	Нейрофізіологія	0,122	8	0,15
7	Фізіологічний журнал	0,117	7	0,09
8	Мікробіологічний журнал	0,111	6	0,07

Index Copernicus. На даний момент до IC Journal Master List включено 8 українських журналів, що публікують статті в галузях біології, екології та біомедицини. Серед них: "Український хіміотерапевтичний журнал" (ICV 2013 = 6,69), "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія" (ICV 2013 = 5,23), "Запорізький медичний журнал" (ICV 2013 = 5,02), "Патологія" (ICV 2013 = 4,93), "Біологічні студії" (ICV 2013 = 4,89), "Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень" (ICV 2013 = 4,82), "Світ медицини та біології" (ICV 2013 = 4,62), "Мікробіологія і біотехнологія" (ICV 2013 = 4,31), "Вісник Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського" (ICV 2013 = 2,85). В минулі роки індексувалися також журнали "Експериментальна онкологія" та "Сучасна фітоморфологія".

РІНЦ. До бібліографічної бази "E-library.ru" на даний момент включено 29 українських журналів біологічної тематики (див. Онлайн-додаток 1). Найбільшу кількість проіндексованих статей має "Український морфологічний альманах" – 994. Лише чотири з цих 29 журналів мають імпакт-фактор РІНЦ відмінний від нуля. Це "Біополімери та клітина" (0,144), "Морфологія" (0,123), "Biotechnologia Acta" (0,019) та "Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина" (0,017).

Журнал "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія" та Серія "Проблеми регуляції фізіологічних функцій" індексують-

ся такими наукометричними базами даних: Index Copernicus (з 2012 р.), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.). Окрім того, всі номери "Вісника Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія" та "Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій" індексуються рядом онлайн-бібліотек та реферативних баз даних: Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.). Варто зазначити, що з 2014 року "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія та Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій", також індексується в РІНЦ. На даний момент проіндексовано статі з трьох номерів 2010-2011 років.

V. Динаміка індексування та цитування українських біологічних журналів в Scopus

Оскільки частіше всього в якості показника ефективності роботи вчених в Україні використовується кількість публікацій та цитувань в індексованих Scopus журналах, доцільно розглянути динаміку цих показників. Користуючись аналітичним інструментарієм порталу SCImago Journal & Country Rank ми встановили ряд статистичних показників українських біологічних журналів за період 1996-2013 років (Рис. 2 та 3).

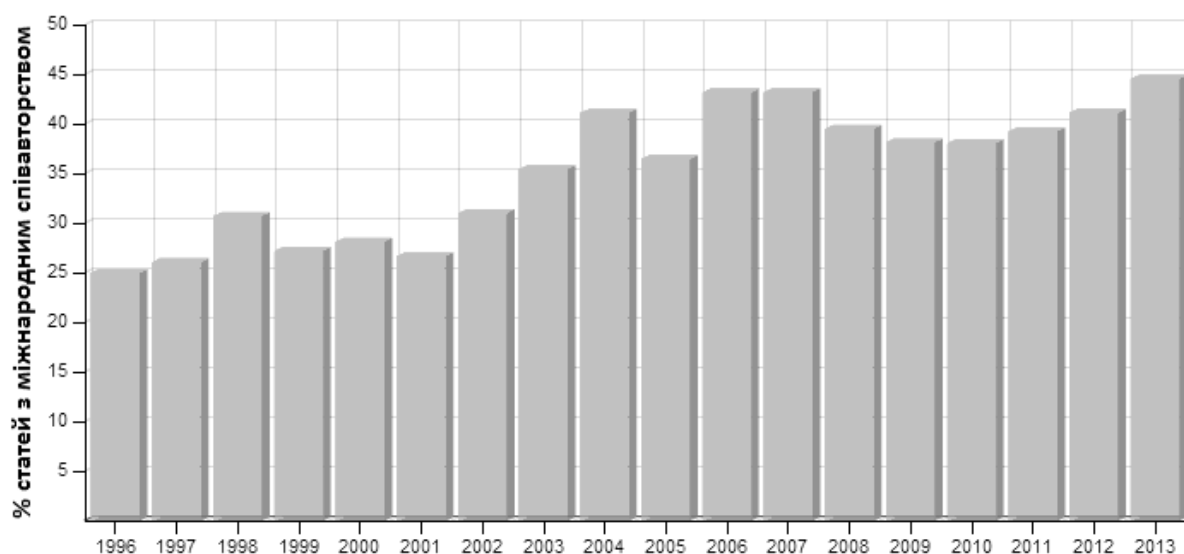


Рис. 2. Відсоток статей українських біологічних журналів у базі Scopus, опублікованих у співавторстві з іноземними вченими за період 1996-2013 рр.

Було встановлено, що відсоток статей в українських біологічних журналах, опублікованих з іноземними співавторами, істотно зріс з 1996 по 2004 роки. За останні ж 10 років не спостерігається ніякого зростання даного показника.

Ще одним важливим показником є середня кількість цитувань статей зовнішніми джерелами (іншими журналами), оскільки вона відображає значущість журналу для всієї сфери досліджень. Було виявлено, що за весь період розгляду середня кількість цитувань статей, опублікованих в українській біологічній періодиці, лишалась стабільною, а в останні кілька років навіть почалась знижуватись (Рис. 3). Ця прикра тенденція вказує на те, що

роль українських журналів для міжнародної біологічної науки досі лишається мізерною. У той же час слід врахувати, що переорієнтація українських публікацій на Scopus розпочалась лише біля двох років тому. Враховуючи те, що включення нових журналів до Scopus відбувається лише раз на рік, а вимоги до заявок є достатньо специфічними [9], можна очікувати підйому загальної кількості проіндексованих українських журналів та статей вже в найближчі 2-3 роки. Зазначимо, що заявка на індексацію в Scopus від журналу "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія та Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій" на даний момент знаходиться в стадії розгляду.

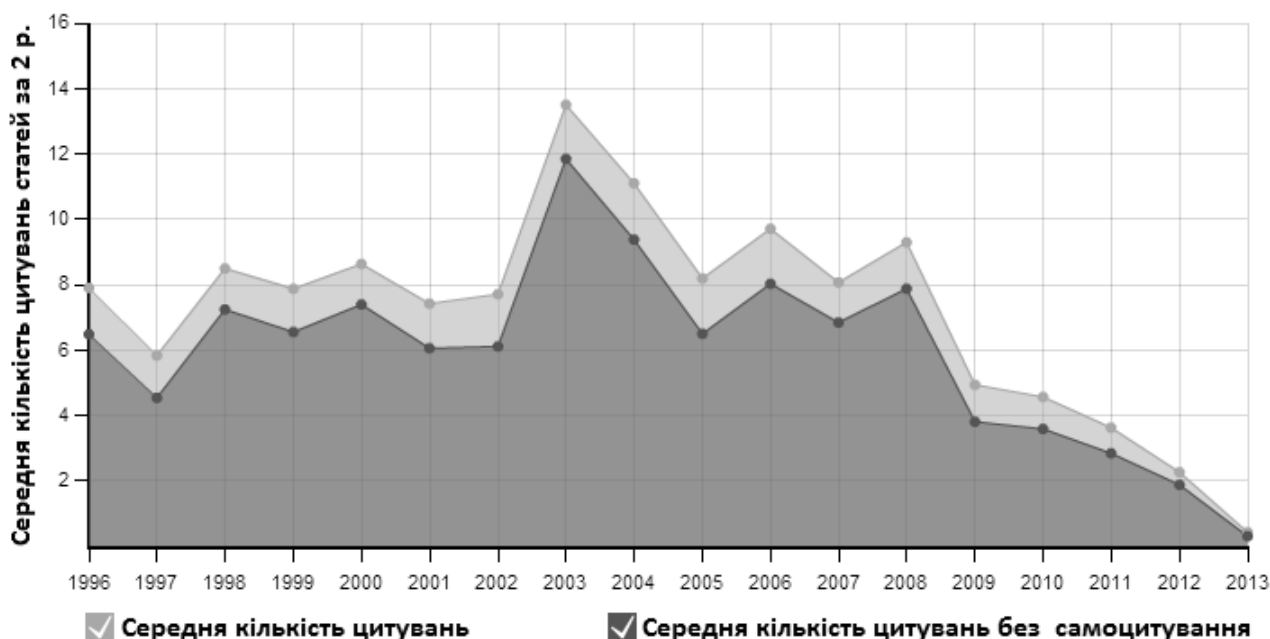


Рис. 3. Середня кількість цитувань статей українських біологічних журналів у базі Scopus за період 1996-2013 рр.

VI. Закордонні видання із відкритим доступом – рятівне коло чи пастка для недосвідчених науковців?

Альтернативою українським виданням, що індексуються міжнародними наукометричними базами, є наукова періодика відповідної спеціальності інших держав

(див. Наказ МОНМС №1112 від 17.10.2012 [8]. Більше того, до таких видань інколи навіть не висувають вимоги індексації, що стимулює вчених шукати максимально доступні закордонні журнали, якість яких далеко не завжди відповідає загальноприйнятим у науковій спіль-

ноті вимогам. Найбільш привабливими з цієї точки зору є закордонні журнали, які використовують модель "відкритого доступу". Суть моделі в тому, що після рецензування та публікації статті, вона викладається в Інтернет у вільному доступі. Початково ідея відкритого доступу була сприйнята науковою спільнотою з великою прихильністю, адже вона сприяє обміну інформацією між науковцями, звільняючи їх від необхідності купувати недешеву підписку на цілий ряд спеціалізованих журналів.

На жаль, перспективна ідея "відкритого доступу" (open access) незабаром була трансформована шахраями від науки у бізнес-модель "відкритого доступу з авторською оплатою", яка полягає в тому, що автори просто оплачують публікацію статті в журналі, який форматує її та викладає у відкритому доступі в Інтернет. На Заході такі видання прийнято іменувати "хижими" журналами (predatory journals) [5]. Варто відмітити, що подібну модель використовують і деякі високоякісні біологічні журнали, наприклад, видання серії BMC, що додатково ускладнює задачу недосвідченому науковцю у виборі цільового журналу для публікації.

Чим же небезпечні "хижі" журнали? В першу чергу, відсутністю адекватної системи рецензування, з чого слідує, що в таких журналах може бути опублікований будь-який матеріал, інколи відверто ненаукового характеру [2]. Таким чином, стаття гарного наукового рівня може потрапити в один номер із псевдонауковими вигадками, що автоматично знизить довіру до неї з боку досвідчених науковців. По-друге, видавництва "хижих" журналів інколи вдаються до неетичних вчинків, імітуючи назву та сайт якісних журналів. По-третє, подібні журнали часто викривляють наукометричну інформацію, заявляючи про наявність імпаکت-фактору, який насправді підмінюється штучною оціночною системою або іншим показником. Нагадаємо, що імпакт-фактор визначається тільки для тих журналів, що включені до Journal Citation Reports корпорації Thomson Reuters (див. вище). Таким чином, недосвідчений науковець, довірившись інформації на сайті одного з таких журналів, ризикує заплатити доволі велику суму грошей (від 50\$ до 1800€ за статтю) за розміщення своєї статті серед псевдонаукового непотребу.

Як же відрізнити якісний журнал із відкритим доступом від "хижого" непрофесійного видання? Найпростіший шлях – звернутись до так званого "списку Білла" (див. онлайн-додаток 2), сформованого професійним бібліотекарем Джефрі Біллом. Цей список отримав широку підтримку та визнання на Заході, що слід особливо враховувати тим науковцям, які планують міжнародну співпрацю, отримання міжнародних грантів або стажування за кордоном. Західні гранто- або роботодавці схильні перевіряти публікації з резюме аплікантів на предмет статей у "хижих" журналах.

Індексція в Web of Sciences або Scopus ще не є гарантією якості журналу, оскільки відомо немало випадків шахрайства навіть з боку журналів з імпакт-фактором. Відповідно до Білла, критеріями "хижого" журналу є: невідповідність журналу вимогам товариств OASPA, COPE та STM, відсутність складу редакційної колегії, занадто швидкий прийом статей до друку (у статтях зазначається дата надходження статті та дата ухвалення до друку), відсутність інформації про процедуру рецензування, приховування вартості публікації, наявність багатьох журналів-клонів того самого видавництва, дуже велика кількість статей в одному номері, низький науковий рівень статей, відсутність реальної адреси та контактів видавництва тощо (див. повний перелік [3]).

Отже, можна зробити висновок, що публікувати статті оптимально в тих журналах, які індексуються базами Web of Science та Scopus і не входять до списку Білла. Лише у такому випадку науковець може сподіватись на те, що його дослідження увійде до міжнародного інформаційного простору та буде помітним для іноземних колег.

VII. Заключення

Можна констатувати, що на сьогоднішній день українська біологічна періодика дуже слабо представлена на міжнародній арені. Загальна кількість журналів, що включені до найбільш авторитетних індексів цитування Web of Knowledge та Scopus, доволі мала та знаходиться на рівні таких країн як Іран та Малайзія. На даний момент немає жодного українського біологічного журналу, який входив би до першого квартилю журналу Scopus або мав імпакт-фактор вище одиниці.

Можлива стратегія підвищення відображення української біологічної періодики повинна залучати декілька аспектів. По-перше, слід сформулювати державну програму підтримки вітчизняних журналів (в Туреччині та Ірані це дало вражаючий ефект). По-друге, доцільним може бути створення спеціалізованої установи по просуванню української періодики в міжнародні індекси цитування (подібно до того як це реалізовано в Росії). По-третє, враховуючи те, що переважна більшість наукових журналів в Україні видаються зусиллями науководослідних та академічних установ, доцільною може бути стимуляція відповідальних осіб до покращення рівня журналів "на місцях". По-четверте, необхідним є проведення тематичних семінарів та майстер-класів з наукометрії, міжнародного співробітництва тощо.

Українська наукова періодика має великий потенціал росту та інтеграції в міжнародний науковий простір. Досвід іноземних колег показує, що найбільші темпи росту спостерігаються в тих країнах (наприклад, Туреччина та Іран), які запровадили ті чи інші заохочувальні заходи. Однак в умовах постійного дефіциту коштів в науково-освітньому секторі бюджету розраховувати на це важко, і, судячи з усього, вирішення питання інтегрування української періодики в міжнародний інформаційний простір в найближчі роки буде реалізовуватись зусиллями окремих установ та науковців-ентузіастів.

Додатки

Онлайн-додаток 1: Список українських журналів біологічної тематики, що включені до бібліографічної бази "E-library.ru".

Онлайн-додаток 2: Список видавництв та окремих наукових журналів із відкритим доступом, що порушують професійну етику публікації (за Біллом).

Обидва онлайн-додатки можуть бути завантажені з офіційного сайту журналу "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія" (www.biovestnik.com) на сторінці номера з даною статтею.

Список використаних джерел

1. Bar-Ilan J. Which h-index? A comparison of WoS, Scopus and Google Scholar // *Scientometrics*. – 2008. – Vol. 74, №2. – P. 257-271.
2. Beall J. Bogus journal accepts profanity-laced anti-spam paper [Electronic resource] // Scholarly Open Access: internet blog. – Access mode: <http://scholarlyoa.com/2014/11/20/bogus-journal-accepts-profanity-laced-anti-spam-paper/>.
3. Beall J. Criteria for determining predatory open-access publishers [Electronic resource] // Scholarly Open Access: internet blog. – Access mode: <http://scholarlyoa.com/2012/11/30/criteria-for-determining-predatory-open-access-publishers-2nd-edition/>.
4. Beall J. Index Copernicus has no value [Electronic resource] // Scholarly Open Access: internet blog. – Access mode: <http://scholarlyoa.com/2013/11/21/index-copernicus-has-no-value/>.
5. Beall J. Predatory publishers are corrupting open access // *Nature*. – 2012. – Vol. 489. – P. 179.

6. Bollen J., Van de Sompel H., Hagberg A., Chute R. A principal component analysis of 39 scientific impact measures // PLOS One. – 2009.

7. Colledge L., De Moya-Anegón F., Guerrero-Bote V., Lopez-Illas C., El Aisati M., Moed H. SJR and SNIP: two new journal metrics in Elsevier's

Scopus // The Journal for the Serials Community. – 2010. – Vol. 23, № 3. – P. 215-221.

Надійшла до редколегії 02.12.14

Е. Торгалю, канд. біол. наук, С. Вакалю, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

НАУКОМЕТРИЧЕСКИЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ИНТЕГРАЦИЯ УКРАИНСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРИОДИКИ В МЕЖДУНАРОДНОЕ ИНФОРМАЦИОННОЕ ПРОСТРАНСТВО

Рассмотрены основные международные индексы цитирования и наукометрические базы публикаций: Web of Knowledge, Scopus, Index Copernicus, Google Scholar, Российский индекс научного цитирования. Объяснены принципы расчета и различия между наиболее распространенными наукометрическими показателями, такими как импакт-фактор, эйгенфактор, h-индекс, SJR, SNIP, ICV и др. Кратко описаны методы поиска списков журналов, включенных в международные индексы цитирования, а также значений вышеуказанных метрических показателей. Приведен современный список украинских биологических журналов, которые индексируются международными наукометрическими базами, и показано динамику их цитирования и индексации за период 1996-2013 гг. В конце рассмотрена новая проблема т.н. "хищных журналов" и приведены соображения относительно стратегии улучшения отображения украинской биологической периодики в международном информационном пространстве.

Ключевые слова: наукометрические базы, периодика, индекс цитирования, биологические журналы.

E. Torgalo, PhD, S. Vakal, PhD, L. Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

SCIENTOMETRIC DATABASES AND INTEGRATION OF UKRAINIAN BIOLOGICAL JOURNALS INTO COMMON INFORMATIONAL SPACE

The most well-known citation indices and scientometric databases are reviewed in the article. Among them are Web of Knowledge, Scopus, Index Copernicus, Google Scholar, Russian Science Citation Index. Basic concepts of calculation as well as differences between most widely used scientometric values (IF, h-index, SJR, SNIP, ICV etc.) are explained. Simple methods of search of indexed journals lists and abovementioned scientometric values are depicted. Up-to-date list of Ukrainian biological journals included in international citation indices as well as their indexation and citation dynamics for the period 1996-2013 are represented. Modern problem of "predatory" journals and possible strategies for increase of Ukrainian journals representation in common informational space are discussed at the end of the paper.

Key words: scientometric databases, periodicals, citation index, biological journals.

УДК: 577.3

Д. Ноздренко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ФУЛЛЕРЕНУ C₆₀ НА ЗМІНУ ШВИДКОСТІ СКОРОЧЕННЯ ІШЕМІЧНО ПОШКОДЖЕНОГО М'ЯЗУ *M. SOLEUS* ЩУРА

Проведено дослідження впливу C₆₀FAS в дозі 1мг/кг на зміну швидкості скорочення ішемічно пошкодженого м'язу *m. soleus* щура. Скорочення м'яза реєстрували при внутрішньовенному та внутрішньом'язовому введенні препарату. Показано захисний ефект фуллерену на зміну швидкості досягнення максимального рівня сили при тетанічному скороченні. Ефективність захисного дії C₆₀FAS зменшується з підвищенням швидкості скорочення ішемічно пошкодженого м'яза. Отримані дані свідчать, що C₆₀FAS можуть розглядатися як перспективні лікарські засоби для профілактики і корекції скорочувальної активності ішемічно пошкодженого м'яза.

Ключові слова: м'яз, ішемія, динаміка скорочення, силова відповідь, фуллерен C₆₀.

Вступ. Серед м'язових патологій, які розвиваються в скелетних м'язах при травмі, ішемічні ушкодження складають більше 35% від загальної кількості ушкоджень опорно-рухового апарату [1]. Однак, незважаючи на досягнення в лікуванні травм, надання допомоги постраждалим при такому ускладненні, як гострий внутрішньотканинний гіпертензійний синдром залишається актуальною проблемою. Для розуміння особливостей змін м'язової динаміки ішемічно пошкодженого м'яза, важливим є критерій відбору аналізованих динамічних параметрів скорочення і можливості модифікації кінетики скорочення під впливом змін механічного стану м'яза в результаті руху. Загальну картину патологій, що розвиваються, ускладнює той факт, що швидкі і повільні м'язові волокна по різному реагують на ішемічні ушкодження і, що важливо, відновлення їх кінетичних характеристик протікає теж в різних часових проміжках, незалежно від їх розташування [2]. Літературні дані показують безліч доказів того, що вільні радикали, а саме супероксид і гідроксид радикал є основним патогенним чинником в процесі ішемічних ушкоджень тканин [3]. В той же час накопичений великий експериментальний матеріал який свідчить проте що водорозчинний фуллерен C₆₀FAS, як і його похідні, мають виражений антиоксидантний ефект і можуть розглядатися як перспективні лікарські засоби для профілактики і корекції ішемічних ушкоджень [4]. Здатність фуллеренів і їх

похідних інактивувати вільні радикали кисню була описана в 1991 р., Krustic у журналі "Science" характеризував фуллерен C₆₀ як "губку, котра всмоктує вільні радикали", що обумовлено електронно-акцепторними властивостями його псевдоароматичної структури [5]. Дійсно, одна молекула фуллерена C₆₀ здатна приєднувати 34 вільних радикала. Антиоксидантна ефективність фуллеренів залежить від числа активних центрів і відстані між активними центрами і атомами-мішенями. Фуллерени здатні ефективно захоплювати і інактивувати як супероксиданіон-радикал, так і гідроксильні радикали *in vivo* і *in vitro* [4,5]. При цьому, як прийнято вважати, антиоксидантна ефективність фуллеренів залежить від числа нерозірваних подвійних зв'язків в їх вуглецевому каркасі. Тому найбільшу антиоксидантну активність (причому більшою, ніж у вітаміну Е) мають нативні, хімічно немодифіковані молекули фуллеренів. Приєднання до них різних хімічних груп супроводжується розривом їх подвійних зв'язків, зниженням електронно-акцепторних і антиоксидантних властивостей фуллеренового каркасу [6].

Методи та матеріали. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком 3 місяці вагою 170±5 г. Введення C₆₀FAS у дозі 1 мг/кг здійснювали двома способами: внутрішньовенно і внутрішньом'язово за 1 год до початку експерименту. Анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Для ішемізації м'язів лігатурами перетягували

гілку стегнової артерії тварини, яка забезпечує кровопостачання використовуваного в експерименті м'язу. Підготовка експерименту також включала канюлювання (a. carotis communis sinistra) для введення фармпрепаратів і вимірювання тиску, трахеотомію і ламінектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. Камбалоподібний м'яз щура (muscle soleus) звільняли від оточуючих тканин. У дистальній частині упоперек перерізували його сухожильну частину. Для модульованої стимуляції еферентів у сегментах L7-S1 перерізували вентральні корінці в місцях їхнього виходу зі спинного мозку. Зміну сили скорочення м'язу реєстрували за допомогою надчутливих тензометричних датчиків, які працюють на основі вимірювання зміни опору масиву одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) при їх деформації. SWCNTs були розташовані у задній частині мікропіпетки, а до передньої її частини приєднували сухожилок досліджуваного м'язу. Для формування електричних стимулів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми. Стимуляцію еферентів у сегментах L7-S1 здійснювали електричними імпульсами тривалістю 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів що керувався через АЦП. Електроstimуляцію проводили використовуючи платинові електроди. Характеристика стимулюючого сигналу задавали програмно і передавали з комплексу АЦП-ЦАП на генератор. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів. Одержані експериментальні криві відображають зміну сили у відсотках відносно контрольних значень непошкодженого м'язу, які приймали за 100%. Статистичну

обробку результатів вимірювання проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

Результати та їх обговорення. Зміни швидкості наростання сили до стаціонарного рівня є одним з найважливіших параметрів кінетики скорочення скелетних м'язів [7]. Цей компонент м'язової динаміки особливо важливий при контролі скорочення кисті рук у людини [8]. Ішемічне ушкодження м'язової тканини призводить до зниження цієї швидкості, що ускладнює, а в деяких випадках і повністю блокує можливість точнісного позиціонування суглоба з пошкодженим м'язом. На рис. 1 показана зміна швидкості зростання сили до максимального рівня в залежності від часу ішемізації при внутрішньом'язовому та внутрішньовенному введенні $C_{60}FAS$, при двох рівнях швидкості наростання стимулюючого сигналу. В контрольних досліджах (ішемізація без введення фулерену) зниження швидкості генерації сили фіксувалось вже на 1 добу після ішемізації, і складало 60% від норми, знижуючись до 40% на 5 добу експерименту, незалежно від зміни швидкості наростання частоти стимуляційного сигналу (рис.1,2.) Проведений експеримент по вивченню швидкості досягнення силою свого стаціонарного рівня при застосуванні стимулюючого сигналу з подовженою швидкістю досягнення максимальної сили (рис. 1,2) виявив значний захисний ефект $C_{60}FAS$ на цей параметр кінетики скорочення. В даному випадку внутрішньовенне введення $C_{60}FAS$ сприяло максимальному збільшенню швидкості скорочення на 25% від контролю порівняно з 15% захисним ефектом при його внутрішньом'язовому введенні.

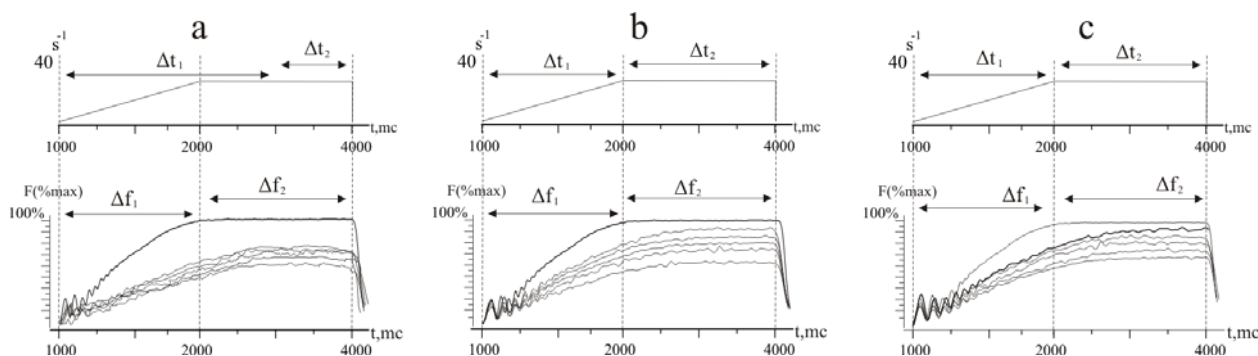


Рис. 1. Криві генерації сили ішемізованого м'язу (muscle soleus) при застосуванні стимулюючого сигналу з швидкістю наростання частоти подразнення 2 с.: (а) – ішемія без впливу препарату (контроль); (б) – внутрішньом'язове введення $C_{60}FAS$ (1 мг/кг); (с) – внутрішньовенне введення $C_{60}FAS$ (1 мг/кг). Δt_2 – час наростання сили скорочення; Δt_1 – час утримання досягнутої максимальної сили скорочення; 1, 2, 3, 4, 5 – доба після ішемізації м'язу

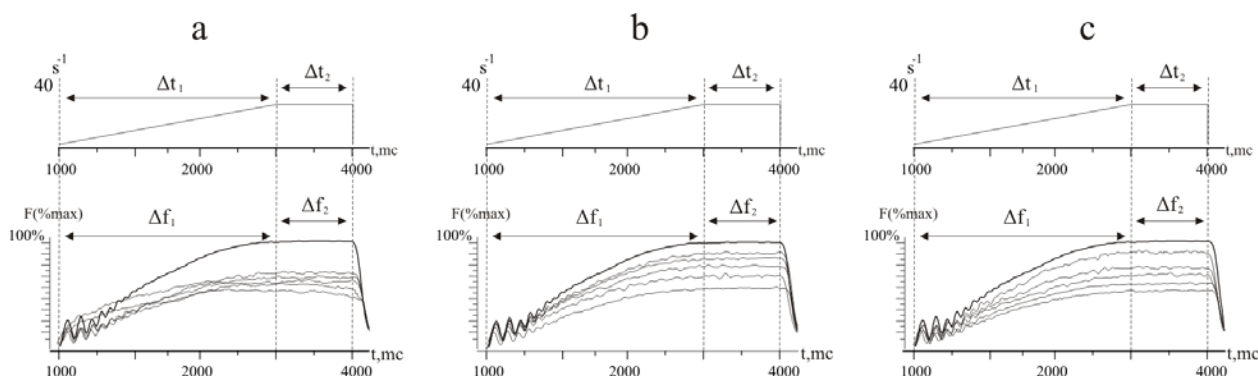


Рис. 2. Криві генерації сили ішемізованого м'язу (muscle soleus) при застосуванні стимулюючого сигналу з швидкістю наростання частоти подразнення 3 с.: (а) – ішемія без впливу препарату (контроль); (б) – внутрішньом'язове введення $C_{60}FAS$ (1 мг/кг); (с) – внутрішньовенне введення $C_{60}FAS$ (1 мг/кг). Δt_2 – час наростання сили скорочення; Δt_1 – час утримання досягнутої максимальної сили скорочення; 1, 2, 3, 4, 5 – доба після ішемізації м'язу

Цей ефект можливо пов'язаний з відмінністю у біомеханіці розвитку зусилля при повільних і швидких балістичних рухах. Траєкторія досить повільного руху м'яза повністю визначається її статичними властивостями. Якщо ж рух здійснюється швидше, то додаються динамічні компоненти, які, безпосередньо залежать від жорсткості і податливості м'яза, які у разі ішемічного ушкодження піддаються значним змінам. У експериментах *in vitro* [9] було продемонстровано, що похідні C_{60} фуллерена, захоплені макрофагами, викликають викид проти-запальних цитокінів. Автори роботи [10] виявили антигістамінну і антиоксидантну дію C_{60} фуллеренів і їх похід-

них. Таким чином значне збільшення внутрішньом'язових колагенових структур, велика кількість нефункціонуючих м'язових волокон, запальні процеси і залучення у вогнище ушкодження активованих нейтрофілів, що вивільняють додаткові вільні радикали, знижує рівень динамічних параметрів скорочення. Останні провокують вазоконстрикцію, яка є характерним проявом ішемічних ушкоджень. А швидкість досягнення силою свого стаціонарного рівня є найбільш чутливою ланкою при таких патологічних процесах.

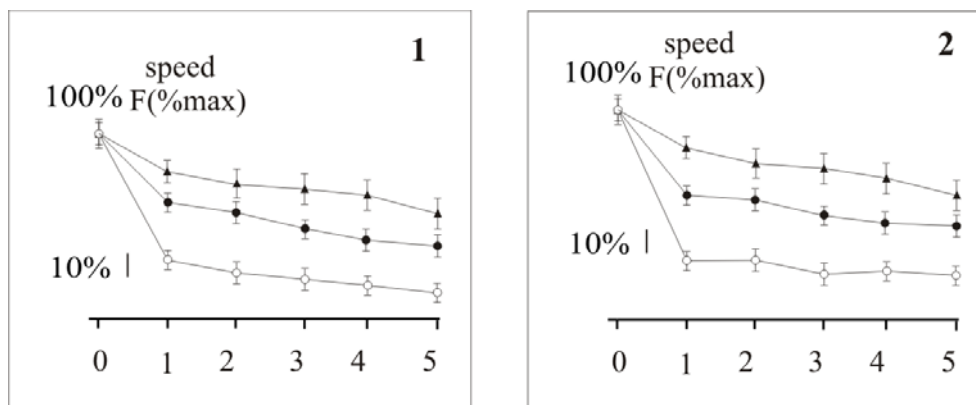


Рис. 3. Швидкість досягнення максимальної силової відповіді ішемізованого м'язу (muscle soleus): (○) – ішемія без впливу препарату (контроль); (●) – внутрішньом'язове введення C_{60} FAS (1 мг/кг); (●) – внутрішньом'язове введення C_{60} FAS (1 мг/кг).

1,2 – стимулюючий сигнал з швидкістю наростання частоти подразнення 2 та 3 с. відповідно

Оскільки C_{60} фуллерени можуть впливати на протікання запального процесу не лише через зниження активності процесів перекисного окислення ліпідів але і через макрофагальну ланку, внутрішньом'язове введення C_{60} FAS повинне мати більше виражений захисний ефект, що і підтвердили наші дослідження. Дослідження токсикологічних властивостей C_{60} FAS на біосистеми показали їх нетоксичність, неімунотоксичність і повну неалергенність [11]. Також показано [6] що нейтралізація вільнорадикальних форм кисню може відбуватися і без їх безпосередньої взаємодії з фуллереновою сіткою. Такі факти свідчать про те, що антирадикальна активність фуллеренів може бути не пов'язана безпосередньо з хімічними властивостями фуллеренового каркасу, а обумовлена особливостями впливу фуллеренів на властивості водного середовища, яке їх безпосередньо оточує. Також виявлено, що аналогічні похідні фуллерена C_{60} , діючи як каталізатори, можуть імітувати дію супероксиддисмутази (СОД) – ферменту, що бере участь в нейтралізації супероксиданіон радикалу. При цьому також було показано, що подібна нейтралізація відбувається без безпосередньої участі фуллеренового каркасу з кисневими радикалами [12].

У разі контролю високошвидкісних рухових реакцій в процесі скорочення (рис 3.1) захисна дія C_{60} FAS при внутрішньом'язовому введенні на 15-17% є ефективнішою чим внутрішньом'язове введення препарату. Захисний ефект при зниженні швидкості скорочення досягнення силою свого стаціонарного рівня збільшувався на 25% порівняно з 15% захисним ефектом при його внутрішньом'язовому введенні (рис3). Таким чином ефективність захисної дії C_{60} FAS зменшується з підвищенням швидкості скорочення ішемічно пошкодженого м'яза. Отримані дані свідчать про виражений захисний ефект C_{60} FAS на динаміку скорочення muscle soleus при її ішемічному ушкодженні. Це прямо вказує на те, що

C_{60} FAS можуть розглядатись як перспективні лікарські засоби для профілактики і корекції дієздатності ішемічно пошкодженого м'яза. Проведені дослідження показують, що саме внутрішньом'язове введення C_{60} FAS є найбільш оптимальним для корекції швидкісних макропараметрів скорочення при ішемічному ушкодженні м'язової тканини. Отримані дані показують, що розвиток медичних нанотехнологій із застосуванням C_{60} FAS, з урахуванням виражених у них антиоксидантних властивостей, і відсутності даних про гострі і хронічні інтоксикації ними відкриває нові можливості в лікуванні і профілактиці ішемічних патологій. Таким чином захисна дія фуллеренів у вигляді ін'єкції їх колоїдного розчину, є перспективним для їх застосування для терапії ішемічних ушкоджень скелетних м'язів.

Список використаних джерел

1. Murdock M, Murdoch M. Compartment syndrome: a review of the literature / M. Murdock, M. Murdoch // Clin Podiatr Med Surg. – 2012. – Apr., 29 (2). – P. 301–310.
2. Recovery of synergistic skeletal muscle function following ischemia / A. J. Carvalho, P. Hollett, N. H. McKee // J Surg Res. – 1995. – Nov., 59 (5). – P. 527–533.
3. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury / S. Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P. Caputi, D. Salvemini // Pharmacol Rev. – 2001. – 53. – P. 135–159.
4. Lai H. S. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs / H. S. Lai, W. J. Chen, L. Y. Chiang // World J. Surg. – 2000. – Apr., 4(4). – P. 450.
5. Radical reactions of C_{60} / P. J. Krustic, E. Wasserman, P. N. Keizer, J. R. Morton, K. F. Preston // Science. – 1991. – 254. – P. 1183–1185.
6. Reactions of (aq), $CO_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ and O_2 with a dendro[60]fullerene and $C_{60}[C(COOH)_2]_n$ (n = 52–6) / R. V. Bensasson, M. Bretteich, J. Frederiksen et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2000. – Vol. 29, № 1. – P. 26–33.
7. Kostyukov I. Muscle hysteresis and movement control: a theoretical study / I. Kostyukov // Neuroscience. – 1998. – Vol. 83. – P. 303–320.
8. Movement-dependent positioning errors in human elbow joint movements / A. P. Mel'nikhous, N. V. Bulgakova, A. N. Tal'nov, F. Hellstrom, U. Windhorst, A. I. Kostyukov // Exp Brain Res. – 2007. – 176 (2). – P. 237–247.
9. Baierl T. In vitro effects of fullerene C_{60} and fullerene black on immunofunctions of macrophages / T. Baierl, A. Seidel // Full. Sci. Technol. – 1996. – 4. – P. 1073–1085.

10. Fullerene Nanomaterials Inhibit the Allergic Response / J. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover, G. Gomez, S. K. Norton, W. Zhao, L. B. Schwartz, R. Lenk, Ch. L. Kepley // The Journal of Immunology. – 2007. – 179. – P. 665-672.

11. Andrievsky G. V. Is C₆₀ fullerene molecule toxic? / G.V. Andrievsky, V. K. Klochkov, L. I. Derevyanchenko // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2005. – 13 (4). – P. 363-376.

12. Biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties / Samen S. Ai, Joshua I. Hardt, Kevin L. Quick, Jeong Sook Kim-Han, Bernard F. Erlanger, Ting-Ting Huang, Charles J. Epstein, Laura L. Dugan // Free Radical Biology and Medicine. – 2004. – 37 (8). – P. 1191-1202.

Надійшла до редколегії 11.06.14

Д. Ноздренко, канд. биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ИЗМЕНЕНИЕ СКОРОСТИ СОКРАЩЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОЙ МЫШЦЫ M. SOLEUS КРЫСЫ

Проведено исследование влияния C₆₀FAS в дозе 1 мг/кг на изменение скорости сокращения ишемической поврежденной мышцы m. soleus крысы. Сокращения мышцы регистрировали при внутривенном и внутримышечном введении препарата. Показан защитный эффект фуллерена на изменение скорости достижения максимального уровня силы при титаническом сокращении. Эффективность защитного действия C₆₀FAS уменьшается с повышением скорости сокращения ишемически поврежденной мышцы. Полученные данные свидетельствуют, что C₆₀FAS может рассматриваться как перспективное лекарственное средство для профилактики и коррекции сократительной активности ишемически поврежденной мышцы.

Ключевые слова: мышца, ишемия, динамика сокращения, силовой ответ, фуллерен C₆₀.

D. Nozdrenko, PhD

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FULLERENE C₆₀ IMPACT ON CONTRACTION SPEED CHANGES OF ISCHEMICALLY DAMAGED MUSCLE SOLEUS OF THE RAT

The effect of water-soluble C₆₀ fullerene (C₆₀FAS) at a dose of 1 mg/kg on ischemic damaged muscles (muscle soleus) of rat was studied. The therapeutic effect of C₆₀FAS was analyzed under intravenous and intramuscular injection. An evident C₆₀FAS protective effect on the dynamics of ischemic damage muscles contraction was revealed. In particular, it was found that in most cases the protective effect of C₆₀FAS with intramuscular administration at 15-17% is more effective than intravenous administration of this drug. This clearly indicates that C₆₀FAS can be considered as a promising therapeutic agent for the prevention and correction of contractile activity of ischemic damage muscles.

Keywords: muscle, ischemia, contraction dynamics, power answer, fullerene C₆₀.

УДК 591.47:612.6

М. Матвиенко, канд. биол. наук
Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина,
А. Пустовалов, канд. биол. наук, Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
С. Михальський, канд. биол. наук
Государственное учреждение "Институт геронтологии имени Д.Ф.Чеботарева НАМН Украины", Киев, Украина

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ КИСПЕПТИНОМ РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ БЛОКАТОРОВ И АКТИВАТОРОВ А-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Киспептинергическая и α-адренергическая системы осуществляют независимое активирующее влияние на клетки аркуатного ядра гипоталамуса половозрелых крыс. Изменение статуса аркуатного ядра как центрального элемента репродуктивной системы, вызванное введением антагонистов и агонистов α-адренорецепторов может быть компенсировано введением киспептина и его антагониста соответственно.

Ключевые слова: α-адренергические рецепторы, мезатон, празозин, киспептин, антагонист киспептина (P-234).

Введение. На сегодняшний день в медицинской практике встречаются препараты, воздействующие на адренергические рецепторы. Последние принадлежат к группе G-протеинсвязанных рецепторов, которые реагируют на адреналин и норадреналин [16]. Существует несколько групп адренорецепторов в зависимости от эффектов, локализации, а также аффинитету к различным веществам: α1-, α2-, β1-, β2, β3-адренорецепторы. Учитывая широкую распространенность адренергических рецепторов в организме, модуляция их активности приводит к разнообразным терапевтическим или токсическим эффектам [18, 26].

α-Адреномиметики и адреноблокаторы широко используются в современной медицине. Так, α-адреноблокатор празозин является сосудорасширяющим, антигипертензивным средством, которое блокирует постсинаптические α1-адренорецепторы и препятствует сосудосуживающему влиянию симпатической иннервации и катехоламинов [3]. Препарат применяется при артериальной гипертензии и застойной сердечной недостаточности [38], а также для улучшения уродинамики при доброкачественной гиперплазии предстательной

железы [2, 25]. Противоположный по действию празозину α-адреномиметик мезатон (стимулирует α-адренорецепторы, практически не влияя на β-рецепторы), напротив, приводит к сужению сосудов. Препарат применяется для повышения артериального давления при артериальной гипотензии и коллапсе, гипотонической болезни [5]. Часто используется при подготовке и во время операций, при инфекционных заболеваниях и интоксикациях. Мезатон необходим для спазма сосудов при секреторной ренальной анурии и для расширения зрачка при иритах, иридоциклитах [7, 32]. А также используется для облегчения носового дыхания при гриппе, простуде, поллинозе и других аллергических реакциях, которые сопровождаются острым синуситом или ринитом [17].

Вместе с тем, препараты, влияющие на α-адренергические рецепторы, оказывают существенное действие также и на состояние репродуктивной системы пациентов, что часто может быть нежелательным побочным эффектом [30, 36, 39]. Связано это с тем, что α-адренергическая система является важным звеном регуляции репродуктивного статуса. В подтверждение вышеизложенного служат такие факты, как возраста-

ние концентрации ФСГ, ЛГ и массы тестикул при введении в третий желудочек мозга фенамина (адреномиметик непрямого действия, агонист α - и β -рецепторов), изадрина (агонист β -рецепторов) и мезатона [11]; возрастание уровня тестостерона в крови при введении в латеральный желудочек мозга $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, или $\beta 1$ -агонистов [33]; снижение содержания иРНК гонадолиберина (ГнРГ) при введении празозина [12]. Таким образом, катехоламины принимают участие в регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадного комплекса, а адренергическая система головного мозга причастна к контролю гонадотропной оси [6, 21].

Открытие нового мощного регулятора репродуктивной функции – кисспептина и его антагониста – P-234 позволяет по-новому взглянуть на проблему побочных воздействий активаторов и блокаторов α -адренорецепторов. Совместное введение кисспептина (или его антагониста) на фоне введения агонистов или антагонистов адренергических рецепторов может быть использовано для коррекции изменений, вызванных адреномиметиками и адреноблокаторами. Например, антираковые свойства кисспептина [19] потенциально могут послужить для снятия негативного воздействия празозина на доброкачественные опухоли репродуктивной системы. Однако, в первую очередь представляется важным установить возможность коррекции кисспептином репродуктивного статуса, измененного введением агонистов или антагонистов адренорецепторов.

Кисспептин (пептидный продукт гена *Kiss1*) активизирует рецепторы GPR54 [29]. У мужчин и женщин острое внутривенное введение значительно увеличивало уровни ЛГ, ФСГ и тестостерона в плазме крови, без побочных эффектов [8]. Данный пептид в мужском и женском организме осуществляет действие на одни и те же нейроэндокринные центры. Он стимулирует гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось, изменяя активность половых желез посредством активации гонадолиберина. ГнРГ, в свою очередь, стимулирует секрецию ФСГ и ЛГ, от которых зависит овуляция и сперматогенез [15].

В то время как кисспептин (КП) активизирует гонадотропную ось, его антагонист действует противоположным образом. Наиболее известным антагонистом кисспептина является P-234 [24]. Данный пептид связывается с рецептором GPR54, предотвращая возможность кисспептина присоединиться к своему рецептору, что исключает реализацию эффектов пептида. Было показано, что P-234 блокирует стимуляцию ГнРГ-нейронов, вызванную кисспептином, причем в тех же концентрациях, в которых кисспептин используется для стимуляции ГнРГ-нейронов (100 нМ, 10 нМ и даже 1 нМ) [40]. Агонисты и антагонисты кисспептина представляют собой новые ценные инструменты для манипуляций гонадотропной осью и коррекции репродуктивных нарушений [34].

С учетом имеющейся информации о влиянии стимуляции и блокады кисспептинергических и α -адренергических рецепторов на репродуктивную функцию, вызывают интерес реакции клеточных элементов гипоталамуса и, прежде всего, аркуатного ядра на подобные влияния, поскольку упомянутое ядро играет ключевую роль в контроле репродуктивной функции (регулирует секрецию ГнРГ) [1, 12].

Целью исследования было изучить влияние кисспептина и его антагониста на репродуктивную функцию при блокаде и активации α -адренергических рецепторов.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента были взяты белые нелинейные самцы крыс в возрасте 3 месяцев, что соответствует молодому половозрелому возрасту. Сроки нашего исследования согласовывались с общепринятым подразделением возрастных периодов животных данного вида [37].

Учитывая цель данной работы, все животные были разделены на семь групп по пять особей в каждой.

Следовало учитывать, что использованные агенты имеют разные рекомендованные способы введения. Кисспептин и антагонист кисспептина можно вводить интрацеребровентрикулярно (и.ц.в.), празозин – перорально (п.о.), а мезатон – подкожно (п.к.). При этом очевидно, что разные способы введения препаратов вызывают у животных стресс различной интенсивности, и это необходимо брать во внимание в ходе исследования. Стресс существенно влияет на функциональную активность нервных и глиальных клеток, которые исследовались в настоящей работе [13, 28]. Для максимальной объективности оценки влияния препаратов на активность клеток аркуатного ядра гипоталамуса животные в наших опытах подвергались введениям всех трех видов. При этом то или иное тест-вещество вводили рекомендованным способом, что сопровождалось введением физиологического раствора в соответствующих объемах двумя другими упомянутыми способами.

Животным контрольной группы получали только физиологический раствор (0,9%-ный изотонический раствор натрия хлорида; "Индар", Украина) всеми тремя способами одновременно – п.о. по 0,5 мл, и.ц.в. по 12,5 мкл и п.к. по 0,5 мл. Две другие группы крыс подвергались и.ц.в.-введению 12,5 мкл агониста кисспептинергических рецепторов GPR54 кисспептина (метастин-(45–54)-амид; "Sigma", США) или антагониста кисспептина P-234 (кисспептин-234-трифторацетат; "Sigma", США) в такой же дозе, а также введению физиологического раствора п.о. и п.к. по 0,5 мл.

Животным следующей группы инъекцировали мезатон (ТОВ "Дослідний завод ГНЦЛС", Украина) п.к. в дозе 100 мкг/100 г массы тела и одновременно вводили физиологический раствор 0,5 мл п.о. и 12,5 мкл и.ц.в. Крысы еще одной группы получали п.о. празозин (празозин-ратиофарм; "Меркль", ФРГ) в дозе 100 мкг/100 г массы тела и при этом 0,5 мл п.к. и 12,5 мкл и.ц.в. физиологического раствора. Была также сформирована группа крыс, на которых исследовали комбинированное воздействие мезатона (п.к. в дозе 100 мкг/100 г массы тела) и и.ц.в.-инъекций P-234 (12,5 мкл); эти животные одновременно получали п.о. 0,5 мл физиологического раствора. Крысам последней экспериментальной группы давали п.о. празозин в дозе 100 мкг/100 г массы тела, и.ц.в. вводили 12,5 мкл кисспептина и п.к. инъекцировали 0,5 мл физиологического раствора. Эксперимент длился 10 дней, препараты вводили раз в сутки. Следует упомянуть, что п.к.- и п.о.-введение препаратов выполняли в ходе эксперимента каждый день, а и.ц.в.-инъекции – в течение трех дней начиная с восьмого дня эксперимента.

После окончания введений экспериментальных препаратов всех крыс наркотизировали (внутримышечно вводили 10 мг анестетической смеси кетамин (Кетамин гидрохлорид; "Фармак", Украина)/ксилазин ("Биовета", Чехия) 9:1 на 100 г массы тела [4]) и декапитировали, изымая головной мозг. Ткани мозга обрабатывали согласно стандартной гистологической методике. Пользуясь стереотаксическим атласом [27], выделяли аркуатные ядра гипоталамуса, которые заключали в парафиновые блоки. Фронтальные срезы гипоталамической области мозга толщиной 8–10 мкм окрашивали крезилвиолетом, по Нисслю, что позволяло идентифицировать нейроны и астроциты. Микрофотографии гистологических препаратов мозга (микроскоп "Olympus BX51", Япония) обрабатывали с помощью системы анализа изображений Olympus DP-Soft 3.2 (Япония). Необходимые морфометрические параметры измеряли на фотоснимках с использованием программного обеспечения для анализа и обработки изображений Image J (США). Определяли площадь поперечного сечения ядер (ППСЯ) нейроцитов и астроцитов аркуатного ядра гипоталамуса крыс. Данные параметры коррелируют с

уровнем функциональной активности клеток указанной структуры [20, 28]. Полученные результаты обрабатывали с применением стандартных методов вариационной статистики. Вычислялось среднее арифметическое и его ошибка ($M \pm m$). Число измеряемых объектов n во всех выборках составляло не менее 150.

Результаты и их обсуждение. В аркуатном ядре гипоталамуса крыс встречаются нервные и глиальные клетки. Среди последних нас интересуют астроциты. У крыс контрольной группы площадь поперечного сечения ядер нейроцитов составляет $62,62 \pm 1,61$ мкм², а астроцитов – $35,59 \pm 1,20$ мкм² (Табл.1).

После введения антагониста кисспептина (P-234) ППСЯ нейронов стала $56,17 \pm 0,83$ мкм². Этот показатель достоверно уменьшился в нейротах после введения животным блокатора рецепторов кисспептина, по сравнению с контрольной группой. У астроцитов группы "Антагонист кисспептина" ППСЯ составляет $32,40 \pm 1,18$ мкм² (Табл.1). Исследуемый морфометрический показатель клеток достоверно уменьшился, по сравнению с контрольной группой. В целом, площадь поперечного сечения ядер уменьшилась у нейронов и астроцитов крыс после введения антагониста кисспептина (P-234). Такие изменения связываются со снижением функциональной активности клеток под воздействием блокатора рецепторов кисспептина, причем это более характерно для нейроцитов. Супрессивное влияние антагониста кисспептина на функцию рассматриваемых клеток отмечалось и другими исследователями [8, 30].

Нейроциты животных после введения кисспептина показали ППСЯ $69,17 \pm 1,45$ мкм². Произошло статистически достоверное возрастание данного параметра клеток, по сравнению с контрольной группой. Астроциты крыс группы "Кисспептин" имели ППСЯ $42,42 \pm 1,14$ мкм² (Табл.1). Астроциты исследуемой группы крыс также проявили достоверное увеличение морфометрического параметра, по сравнению с контролем. Таким образом, кисспептин повлиял на увеличение кариометрических показателей клеток аркуатного ядра, что отображает возрастание их функциональной активности [14]. Наши наблюдения не противоречат экспериментальным результатам других исследователей [9, 23].

У нервных клеток группы "Мезатон" ППСЯ составляет $68,21 \pm 1,04$ мкм² (Табл.1). Введение мезатона отобразилось на статистически достоверном возрастании показателя ядер нейроцитов, по сравнению с контрольной группой. Астроциты исследуемой группы крыс имеют ППСЯ $39,26 \pm 0,98$ мкм² (Табл.1). Этот тип клеток также демонстрирует достоверное увеличение кариометрического показателя, по сравнению с контролем. Так, введение мезатона способствует увеличению площади поперечного сечения ядер нейронов и астроцитов, что характеризует усиление функциональной активности клеток аркуатного ядра гипоталамуса животных. Аналогичный эффект наблюдался и в гонадах

трехмесячных крыс – инъекции мезатона приводили к активации тестикул [10, 22].

Животные, которые подверглись комбинированному введению мезатона с блокатором кисспептинергических рецепторов (P-234), имели ППСЯ нейронов $61,64 \pm 0,89$ мкм² (Табл.1). Произошло достоверное уменьшение параметра, по сравнению с группой "Мезатон". Астроциты исследуемой группы характеризуются ППСЯ $34,02 \pm 1,12$ мкм² (Табл.1). Кариометрический показатель этих клеток также достоверно уменьшился, по сравнению с животными, которым вводили только мезатон. Подобные изменения данного морфометрического параметра клеток следует интерпретировать как снижение функциональной активности последних. В целом при комбинированном введении мезатона с блокатором рецепторов кисспептина (P-234) снимается активирующее влияние мезатона как на нейроны, так и на астроциты аркуатного ядра гипоталамуса крыс. Результаты исследований на уровне гонад показали, что блокирование рецепторов кисспептина подавляло проявление гонадостимулирующего эффекта мезатона. Данный факт может указывать на то, что действие α -адренергической системы на гипоталамо-гонадную ось опосредовано кисспептином [21].

Нейроциты животных группы "Празозин" имеют такую ППСЯ $52,75 \pm 1,12$ мкм² (Табл.1). Показатель статистически достоверно ниже такого в контрольной группе. Астроциты исследуемой группы крыс характеризуются ППСЯ $31,21 \pm 1,04$ мкм² (Табл.1). У этих клеток также произошло достоверное снижение кариометрического показателя, по сравнению с контролем. Так введение празозина привело к уменьшению морфометрических параметров ядер нейроцитов и астроцитов, отображая снижение синтетических процессов в этих клетках. Другими авторами отмечалось, что празозин осуществляет свои эффекты и на периферическом звене гонадотропной оси: в эякулятивной дисфункции [35] и снижении фертильной способности сперматозоидов [31].

В результате комбинированного введения празозина с кисспептином ППСЯ нейроцитов составляет $62,44 \pm 1,10$ мкм² (Табл.1). Морфометрический показатель статистически достоверно возрос, по сравнению с группой "Празозин". У астроцитов животных исследуемой группы ППСЯ равняется $36,55 \pm 1,07$ мкм² (Табл.1). Произошло статистически достоверное увеличение данного показателя, по сравнению с группой крыс, которые получали только празозин. Таким образом, при комбинированном введении празозина с кисспептином наблюдается существенное увеличение кариометрических показателей обоих типов клеток аркуатного ядра гипоталамуса, что связано с усилением их функциональной активности. Подобные эффекты комбинированного введения празозина с кисспептином наблюдались и на уровне гонад крыс [21, 22].

Таблица 1. Площадь поперечного сечения ядер нейроцитов и астроцитов аркуатного ядра гипоталамуса трехмесячных крыс

Группы животных	Параметры	
	Площадь поперечного сечения ядер нейроцитов, мкм ² ($M \pm m$)	Площадь поперечного сечения ядер астроцитов, мкм ² ($M \pm m$)
Контроль	$62,62 \pm 1,61$	$35,59 \pm 1,20$
Антагонист кисспептина	$56,17 \pm 0,83^*$	$32,40 \pm 1,18$
Кисспептин	$69,17 \pm 1,45^*$	$42,42 \pm 1,14^*$
Мезатон	$68,21 \pm 1,04^*$	$39,26 \pm 0,98^*$
Мезатон+антагонист кисспептина	$61,64 \pm 0,89^{**}$	$34,02 \pm 1,12^{**}$
Празозин	$52,75 \pm 1,12^*$	$31,21 \pm 1,04^*$
Празозин+кисспептин	$62,44 \pm 1,10^{***}$	$36,55 \pm 1,07^{***}$

Примечания. $M \pm m$ – среднее арифметическое ± ошибка среднего арифметического. $^*P < 0,05$ относительно контрольной группы; $^{**}P < 0,05$ относительно соответствующей группы без антагониста кисспептина

$^{***}P < 0,05$ относительно соответствующей группы без кисспептина.

На основании результатов нашего исследования можно отметить, что изменениям в нейронах в большинстве случаев соответствуют аналогичные изменения в астроцитах аркуатного ядра, что указывает на глубокую вовлеченность глиальных клеток в процессы активации и подавления нейросекреторной активности нейронов. При этом активации нейроцитов соответствует активация астроцитов.

Было установлено, что у 3-месячных крыс ксипептин играет роль активирующего, а его антагонист (P-234) – супрессирующего фактора для функционального состояния нейроцитов и астроцитов аркуатного ядра гипоталамуса. Мезатон и празозин также способны соответственно активировать и угнетать клетки аркуатного ядра гипоталамуса.

Интересно, что противоположные влияния на α -адренергическую и ксипептинергическую системы приводят к взаимной нейтрализации этих эффектов. Таким образом, обе нейромедиаторные системы у животных данного возраста представляются относительно независимыми регуляторами активности клеток аркуатного ядра гипоталамуса. Взаимная нейтрализация эффектов противоположно направленных влияний на α -адренергическую и ксипептинергическую системы на уровне клеток аркуатного ядра гипоталамуса свидетельствует в пользу того, что данные воздействия могут стать основой технологии коррекции репродуктивного статуса пациентов, проходящих курс терапии, связанной с применением агонистов и антагонистов α -адренорецепторов.

Выводы. Активация ксипептинергической и α -адренергической систем усиливает, а блокада этих систем подавляет активность клеток аркуатного ядра гипоталамуса половозрелых крыс, а соответственно и репродуктивную функцию. При сочетании друг с другом противоположно направленные эффекты данных нейроэндокринных систем взаимно нейтрализуются.

Список использованных источников

- Amiya N. Anatomical relations between neuropeptide Y, galanin, and gonadotropin-releasing hormone in the brain of chondrostea, the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* / N. Amiya, M. Amano, A. Tabuchi, Y. Oka // *Neurosci Lett.* – 2011. – Vol. 503, № 2. – P. 87–92.
- Araki T. Comparison of 7 α (1)-adrenoceptor antagonists in patients with lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia: a short-term crossover study / T. Araki, K. Monden, M. Araki // *Acta Med. Okayama.* – 2013. – Vol. 67, № 4. – P. 245–251.
- Chen F. Functional analysis of a novel antagonistic antibody against the short epitope of the 61A-adrenergic receptor / F. Chen, X. Chen, Z. Qiu et al // *Cardiovascul. Res.* – 2012. – Vol. 93, № 2. – P. 280–290.
- Chuvashova E. N. Comparative estimate of xylazine and ketamine anesthesia in cats / E. N. Chuvashova // *Summaries of Reports of the Conference "Urgent Problems of Biology and Veterinary Medicine of Small Domestic Animals" (13–14 April 2000, Troitsk) [in Russian].* – Troitsk: UGAVM, 2000. – Part 1. – P. 69–71.
- Cooper B. E. Review and Update on Inotropes and Vasopressors / B. E. Cooper // *AACN Adv. Crit. Care.* – 2008. – Vol. 19, № 1. – P. 5–13.
- Daneri C. Involvement of the ganglion cholinergic receptors in gonadotropin-releasing hormone, catecholamines, and progesterone release in the rat ovary / C. Daneri, A.V. Orozco, D. Bronzi, et al. // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99, № 7. – P. 2062–2070.
- Devys J. M. Eye drops in anesthesia: real drugs, real adverse events / J. M. Devys, S. Gras // *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* – 2013. – Vol. 32, № 2. – P. 82–83.
- Dhillon W. S. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women / W. S. Dhillon, O. B. Chaudhri, E. L. Thompson, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 10. – P. 3958–3966.
- Dungan H. M. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion / H. M. Dungan, D. K. Clifton, R. A. Steiner // *Endocrinology.* – 2006. – Vol. 147, № 3. – P. 1154–1158.
- Dzerzhinsky M. Morphofunctional changes in rat testes under kisspeptin influence against blockade and activation of alpha-adrenergic receptors and melatonin administration / M. Dzerzhinsky, A. Pustovalov, M. Matvienko // *Reproduction in domestic animals.* – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 20.
- Dzerzhinsky N. E. Involvement of the adrenergic and serotonergic systems of the brain in the control of the reproductive system of birds in early postnatal ontogenesis / N. E. Dzerzhinsky, O. M. Pytysya // *Fiziol. Zh.* – 1998. – Vol. 44, № 3. – P. 208.
- Dzerzhinsky N. E. Effect of blockade and stimulation of dopamine receptors on functional activity of the hypothalamo-gonadal complex of birds (morphometric and electrophysiological study) / N. E. Dzerzhinsky, I. M. Varenuk, P. O. Barchouk // *Nauk. Visn. Nats. Agrar. Univ.* – 2000. – 1, № 24. – P. 32–36.
- Dzerzhinsky M. Stress effect on mitochondria morphometric parameters of functional activity of rat neurocytes, protoplasmic and fibrous astrocytes of arcuate and preoptic hypothalamic nuclei at different stages of estrous cycle / M. Dzerzhinsky, A. Pustovalov, M. Matvienko // *VI zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu (8–10 October 2011, Polaneczko).* – Polaneczko: Uniwersytet Rzeszowski, 2011. – P. 79.
- Dzerzhinsky M. Stress effect on morphometric parameters of functional activity of rat protoplasmic and fibrous astrocytes arcuate and preoptic nuclei at different stages of estrous cycle / M. Dzerzhinsky, A. Pustovalov, M. Matvienko, V. Senchylo // *Streszczenia. II Zimowa Konferencja TBR "Centralne i Lokalne Regulacje Procesow Rozrodczych" (17–19 February 2010, Zakopane).* – Krakow, 2010. – P. 38.
- Grachev P. GPR54-Dependent Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by Neuropeptide Y in Prepubertal Rats / P. Grachev, X. F. Li, Y. S. Lin, et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 443–454.
- Huang J. Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state / J. Huang, S. Cheng, J.J. Zhan, X.Y. Huang // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20, № 4. – P. 419–425.
- Kollar C. Meta-analysis of the efficacy of a single dose of phenylephrine 10 mg compared with placebo in adults with acute nasal congestion due to the common cold / J. Huang, S. Cheng, J.J. Zhan, X.Y. Huang // *Clinical Therapeutics.* – 2007. – Vol. 29, № 6. – P. 1057–1070.
- López-Contreras A. J. The induction of cardiac ornithine decarboxylase by β 2-adrenergic agents is associated with calcium channels and phosphorylation of ERK1/2 / A. J. López-Contreras, M. E. de la Morena, B. Ramos-Molina, et al. // *J. Cell Biochem.* – 2013. – Vol. 114, № 9. – P. 1978–1986.
- Matsui H. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat / H. Matsui, Y. Takatsua, S. Kumano, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 320, № 15. – P. 383–388.
- Matvienko M. G. Morphofunctional modifications of cells of the preoptic hypothalamic nucleus of prepubescent rats under conditions of stimulation and blocking of the α -adrenergic and kisspeptinergic systems / M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, N. A. Buzynskaya, N. E. Dzerzhinsky // *Neurophysiology.* – 2013. – Vol. 45, № 5-6. – P. 417–422.
- Matvienko M. G. Testicular activity of young, mature and old rats after administration of prazosin and meztaton during blockade and activation of kisspeptinergic system / M.G. Matvienko, A.S. Pustovalov, M.E. Dzerzhinsky // *Problems of ecological and medical genetics and clinical immunology.* – 2012. – Vol. 6, № 114. – P. 66–78.
- Matvienko M. G. Variety of functions and effects of kisspeptin / M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, N. E. Dzerzhinsky // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 11–20.
- Migaud H. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) / H. Migaud, R. Ismail, M. Cowan, A. Davie // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 179, № 3. – P. 384–399.
- Navarro V. M. Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide / V. M. Navarro, J. M. Castellano, R. Fernández-Fernández, et al. // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, № 10. – P. 4565–4574.
- Noguchi Y. In vivo study on the effects of alpha1-adrenoceptor antagonists on intraurethral pressure in the prostatic urethra and intraluminal pressure in the vas deferens in male dogs / Y. Noguchi, A. Ohtake, M. Suzuki, M. Sasamata // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 580, № 1–2. – P. 256–261.
- Papay R.S. α 1A-Adrenergic Receptors Regulate Cardiac Hypertrophy In Vivo Through IL-6 Secretion / R.S. Papay, T. Shi, M.T. Piascik, et al. // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83, № 5. – P. 939–948.
- Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson // N. Y. : Acad. Press, 1998. – 237 p.
- Pustovalov A. S. Effect of stress on the morphometric parameters of functional activity of astrocytes and neurocytes of the rat arcuate hypothalamic nucleus at different stages of the estrous cycle / A. S. Pustovalov, M. G. Matvienko, N. E. Dzerzhinsky // *Visn. Taras Shevchenko Kyiv Natl. Univ., Ser. Biol.* – 2012. – Vol. 1, № 61. – P. 17–20.
- Ratnasabapathy R. The effects of kisspeptin in human reproductive function – therapeutic implications / R. Ratnasabapathy, W. S. Dhillon // *Current Drug Targets.* – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 365–371.
- Ratnasooriya W. D. Effects of prazosin on fertility of male rats / W.D. Ratnasooriya, R.M. Wadsworth // *J. Reprod. Fertil.* – 1984. – Vol. 70, № 2. – P. 643–647.
- Ratnasooriya W. D. Impairment of fertility of male rats with prazosin / W. D. Ratnasooriya, R. M. Wadsworth // *Contraception.* – 1990. – Vol. 41, №4. – P. 441–447.
- Sarkar S. Revisiting the impact of phenylephrine hydrochloride on static and dynamic accommodation / S. Sarkar, A. M. Hasnat, S. R. Bhargava // *Indian. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 60, № 6. – P. 503–509.

33. Serova L. I. Role of subtypes of adreno- and dopamine receptors of the brain in regulation of the function of the hypothalamo-pituitary-testicular complex / L. I. Serova, E. V. Naumenko // *Fiziol. Zh.* – 1995. – Vol. 1, № 1. – P. 19–23.

34. Sonigo C. Overview of the impact of kisspeptin on reproductive function / C. Sonigo, N. Binart // *Ann. Endocrinol. (Paris)*. – 2012. – Vol. 73, № 5. – P. 448–458.

35. Tatemichi S. Comparison of the effects of four α 1-adrenoceptor antagonists on ejaculatory function in rats / S. Tatemichi, K. Kobayashi, R. Yokoi, et al. // *Urology*. – 2012. – Vol. 80, № 2. – P. 9–16.

36. van Dijk M. M. Effects of alpha(1)-adrenoceptor antagonists on male sexual function / M. M. van Dijk, J. J. de la Rosette, M. C. Michel // *Drugs*. – 2006. – Vol. 66, № 3. – P. 287–301.

37. Vtorushina E. V. Formation of folliculogenesis in the testes of the rat progeny with chronic damage to the hepatobiliary system

/ E. V. Vtorushina, G. V. Bryukhin // *Probl. Reprod.* – 2005. – Vol. 5, № 2. – P. 23–26.

38. Yadav M. R. Revelation on the potency of α (1)-blockers – parallel blockade of angiotensin II receptor: A new finding / M. R. Yadav, H. P. Gandhi // *Pharm. Biol.* – 2012. – Vol. 50, № 4. – P. 439–442.

39. Yono M. A comparison of the expression and contractile function of α 1-adrenoceptors in seminal vesicle and vas deferens from normotensive and hypertensive rats / M. Yono, T. Tanaka, S. Tsuji, et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 694, № 1–3. – P. 104–110.

40. Zhang S. L. Expression and significance of KiSS-1 and its receptor GPR54 mRNA in epithelial ovarian cancer / S. L. Zhang, Y. Yu, T. Jiang, et al. // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. – 2005. – Vol. 34, № 8. – P. 689–692.

Надійшла до редколегії 06.10.14

М. Матвієнко, канд. біол. наук

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ,

А. Пустовалов, канд. біол. наук, М. Держинський, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

С. Михальський, канд. біол. наук

Державна установа "Інститут геронтології" імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, Київ

МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ КІСПЕПТИНОМ РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ БЛОКАТОРІВ І АКТИВАТОРІВ α -АДРЕНЕРГІЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ

Кіспептинергічна та α -адренергічна системи здійснюють незалежний активуючий вплив на клітини аркуатного ядра гіпоталамуса статевозрілих щурів. Зміна статусу аркуатного ядра як центрального елемента репродуктивної системи, викликана введенням антагоністів і агоністів α -адренорецепторів, може бути компенсована введенням кіспептину та його антагоніста відповідно.

Ключові слова: α -адренергічні рецептори, мезатон, празозин, кіспептин, антагоніст кіспептину (P-234).

M. Matvienko, PhD

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine,

A. Pustovalov, PhD, M. Dzerzhinsky, DSc

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

S. Mikhalsky, PhD

D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

KISSPEPTIN CORRECTION CAPABILITIES OF THE REPRODUCTIVE STATUS IN THE APPLICATION OF THE BLOCKERS AND ACTIVATORS OF α -ADRENERGIC RECEPTORS

Kisspeptinergic and α -adrenergic systems provide independent activating influence on the cells of the arcuate hypothalamic nucleus of mature rats. Changes in status of the arcuate nucleus as a central element of the reproductive system, induced by the administration of antagonists and agonists of the α -adrenergic receptors, could be compensated by introduction of kisspeptin and its antagonist, respectively.

Key words: α -adrenergic receptors, meztaton, prazosin, kisspeptin, kisspeptin antagonist (P-234).

УДК 796.072.2

Л. Коробейнікова, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ НЕЙРОДИНАМІЧНИХ ФУНКЦІЙ У ЕЛІТНИХ СПОРТСМЕНІВ-ЄДИНОБОРЦІВ РІЗНОЇ СТАТІ

Вивчення нейродинамічних особливостей у елітних спортсменів в гендерному аспекті. Використовувалися методи "Сенсомоторна реакція", "Функціональна рухливість нервових процесів", "Реакція на рухомий об'єкт", "Витривалість нервової системи". Досліджено дві групи елітних спортсменів-дзюдоїстів різної статі. Виявлено, що у спортсменів-чоловіків вища продуктивність зорового сприйняття і краща ефективність переробки зорової інформації при дослідженні нейродинамічних функцій, порівняно з жінками, що свідчить про наявність залежності когнітивного компонента сприйняття і переробки інформації від статі у спортсменів. Виявлено, що в спортсмени-чоловіки, в умовах інформаційного навантаження, краще виконують спонтанні, швидкісні, але недостатньо підготовлені моторні дії, в порівнянні з жінками.

Ключові слова: нейродинамічні функції, особливості сприйняття, переробка інформації, гендерні відмінності, спортсмени.

Вступ. Сучасний розвиток фізіології та психофізіології спорту здебільшого спрямований на вивчення різних властивостей, які б впливали на прояв максимальних можливостей спортсменів в умовах змагальної діяльності. Однак, спортивна діяльність, як екстремальний різновид діяльності людини, пов'язана із необхідністю прояву генетично детермінованих особливостей: задатків, здібностей, таланту та геніальності [1;2;3;4]. Враховуючи, що останнім часом підготовка спортсменів високої кваліфікації у єдиноборствах не передбачає суттєвих різниць за рівнем фізичних та психоемоційних навантажень між чоловіками та жінками, слід очікувати наявності прояву різних гендерних відмінностей нейродинамічних функцій, які визначають межі можливостей

реалізації у спортивній діяльності [4;5]. До нейродинамічних властивостей (властивостей нервової системи) відносять фізіологічні функції, що відображають особливості протікання нервових процесів збудження і гальмування в центральній нервовій системі, рухливість нервових процесів, особливості сприйняття та переробки інформації, можливості ЦНС утримувати високу працездатність впродовж тривалого часу. Нейродинамічні властивості в істотній мірі залежать від спадкових факторів, які мало змінюються в онтогенезі і є фізіологічною основою темпераменту та деяких інших психофізіологічних функцій людини [3;6;7]. Тому, на нашу думку, актуальним питанням сучасної фізіології спорту постає – вивчення гендерних особливостей прояву нейроди-

намічних функцій у елітних спортсменів-єдиноборців. Дослідження проведені згідно Зведеного плану науково-дослідних робіт у сфері фізичної культури і спорту на 2011 – 2015 рр. теми 2.23 "Превентивні програми нейропсихологічної підтримки спортсменів високої кваліфікації на заключних етапах багаторічної підготовки" (номер державної реєстрації 0109U007579).

Метою роботи було – вивчення прояву нейродинамічних особливостей у елітних спортсменів в гендерному аспекті.

Головним завданням дослідження було – виявити особливості прояву нейродинамічних властивостей спортсменів високої кваліфікації з урахуванням вікових особливостей.

Матеріали та методи дослідження. Для вивчення гендерних особливостей нейродинамічних функцій спортсменів було диференційовано на дві групи. Першу групу склали 22 спортсмена (жінки) вищої кваліфікації, члени збірної команди України з боротьби дзюдо, віком 19-28 років. Другу групу – 24 спортсмена (чоловіки) вищої кваліфікації, членів збірної команди України з боротьби дзюдо, віком 19-28 років. Сутність методики "Сенсомоторна реакція" полягала у тому, що досліджений повинен був швидко реагувати на однотипні зорові подразники. Час реакції на зорові подразники складався з часу сприйняття, переробки та моторної реалізації на подразник. Латентний період простої зорово-моторної реакції – це час між появленням подразника на екрані дисплею до натискання дослідженим відповіді на спеціальній клавіатурі. Задача досліджуваного – реагувати на появу кожного сигналу (червоний прямокутник) якомога швидше натисканням на відповідну клавішу (в залежності від ведучої руки досліджуваного). Світовий сигнал подавався в достатньо випадкові моменти часу, щоб не виробився умовний рефлекс на час, але достатньо регулярно, щоб кожний наступний сигнал був очікуваний. Інтервал між сигналами складав від 0,5 до 2,5 секунд [8]. Методика на визначення функціональної рухливості нервових процесів досліджувала нейродинамічні властивості, які відображали особливості протікання нервових процесів збудження і гальмування в центральній нервовій системі. Дана методика досліджувала максимальний темп обробки інформації по диференціюванню різних подразників. На екрані монітора відображалося стилізоване зображення світлофора, на якому по черзі у випадковому порядку висвічувалися червоне, жовте і зелене світло. Завдання випробуваного – в максимальному темпі у відповідь на появу червоного сигналу натискати праву клавішу, на появу зеленого – ліву клавішу, а на появу жовтого – пропускати натискання. Виконанню тесту передувало тренування. Довжина залікового тесту варіювалася і, в середньому становила 170-200 сигналів, тривалість виконання коливалася в межах 1,8-3,5 хвилин. За допомогою тесту визначалися показники: динамічність, пропускна здатність, гранична швидкість переробки інформації, імпульсивність. Для визначення врівноваженості процесів збудження та гальмування (балансу) у центральній нервовій системі (ЦНС) нами було застосовано ме-

тодику "Реакція на рухомий об'єкт". Реакція на рухомий об'єкт являла собою різновид складної сенсомоторної реакції, яка крім сенсорного та моторного періодів включала період відносно складної обробки сенсорного сигналу центральною нервовою системою. Суть завдання полягала в тому, що в кожній окремій пробі досліджуваному пред'являлось 2 сигнали – динамічний (ціль) та статичний (маркер), при цьому останній окреслював локальну область в просторі, при досягненні якої досліджуваний повинен був відреагувати своєчасним дискретним сигналом на датчик. За результатами тестування визначалися показники: точність, стабільність, збуджуваність, тренд (по збудженню). Оцінка балансу нервових процесів складалася з двох компонентів: співвідношення випереджень і запізень та величина і знак середньої похибки маркера від цілі в момент натискання клавіші [8].

Для визначення витривалості ЦНС, за методикою "Витривалість нервової системи", використовувався 128-секундний варіант теплінг-тесту. При таких параметрах тесту надійність одержуваних оцінок вище, ніж при більш коротких варіантах. За результатами дослідження вираховувалися стандартизовані показники: витривалість (по тренду); частота торкань; стабільність (між ударних інтервалів); скважність. Під "силою нервової системи" розумілось здатність індивіда витримувати тривалу і (або) інтенсивну стимуляцію, не входячи в позамежне гальмування. Передбачалось, що в основі цієї властивості лежить витривалість, працездатність нервових клітин або до тривалої дії подразника, що дає концентроване, зосереджене в одних і тих же нервових центрах, і накопичення в них, збудження, або до короточасного дії надсильних подразників. Чим слабкіша нервова система, тим раніше нервові центри переходять у стан втоми і охоронного гальмування. Всі перераховані методики входять до складу апаратно-програмного психодіагностичного комплексу "Мультипсихометр-05" [8].

Статистичний аналіз проводився за допомогою програмного пакету Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc.). У зв'язку із тим, що обстежувана вибірка не підпадала під нормальний розподіл за показниками які вивчалися, було застосовано методи непараметричної статистики за допомогою критерію знакових рангових сум Вілкоксона. Для демонстрації розподілу даних використовувався інтерквартильний розмах, вказуючи першу квартиль (25% перцентиль) та третю квартиль (75%) [9;10].

Результати та їх обговорення. Для аналізу гендерних відмінностей нейродинамічних функцій у елітних спортсменів були проаналізовані дані тестових завдань на дослідження зорово-моторних реакцій та сили нервової системи. В табл.1 наведено середні значення показників простої зорово-моторної реакції у спортсменів різних гендерних груп. За результатами тесту "Сенсомоторна реакція" (СМР) слід зазначити достовірну відмінність за показником стабільність, який кращий в групі спортсменок-жінок (табл.1). Цей факт вказує на кращі можливості нейродинамічних функцій у спортсменок даної групи. Показник латентного часу реакції в обох групах не мав достовірних відмінностей.

Таблиця 1. Середні значення показників простої зорово-моторної реакції у спортсменів різних гендерних груп (n=46)

Показники	Жінки (n=22)			Чоловіки (n=24)		
	Медіана	Нижній квартиль	Верхній квартиль	Медіана	Нижній квартиль	Верхній квартиль
Латентність реакції (мс)	272,43	257,10	290,27	270,77	259,09	284,93
Стабільність (%)	14,40	12,24	16,47	16,45*	13,70	21,13

Примітка: * – $p < 0,05$, порівняно із групою спортсменок-жінок.

В табл. 2 представлені значення показників функціональної рухливості нервових процесів у спортсменів різних гендерних груп. Аналіз даних табл. 2 вказує

на наявність достовірної різниці за показниками пропускної здатності та імпульсивності між групами спортсменів різної статі. Це вказує на той факт, що на

характеристики пропускної здатності зорового аналізатору, на зовнішні подразники, впливає гендерний компонент (табл. 2). Вищі показники здатності до переробки зорових подразників та імпульсивність виявлено у чоловіків, які краще виконують спонтанні, шви-

дкі, але недостатньо підготовлені рішення і моторні дії, в умовах інформаційного навантаження. За особливостями прояву динамічності, як показнику швидкості оволодіння навичкою виконання нового завдання, у групах результати ідентичні.

Таблиця 2. Середні значення показників функціональної рухливості нервових процесів у спортсменів різних гендерних груп (n=46)

Показники	Жінки (n=22)			Чоловіки (n=24)		
	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль
Динамічність, (%)	77,21	66,90	82,84	78,41	71,38	83,81
Пропускна здатність, (ум.од.)	1,62	1,56	1,79	1,82*	1,76	1,92
Імпульсивність, (ум.од.)	-0,08	-0,12	0,00	0,02*	-0,02	0,09

Примітка: * – $p < 0,05$, порівняно із групою спортсменок-жінок.

В табл. 3 представлені значення показників за методикою "Баланс нервових процесів" у спортсменів різних гендерних груп. Аналіз даних табл. 3, свідчить про наявність достовірної різниці за показниками точності та стабільності між групами спортсменами різної статі. Кращий показник точності виявлено у жінок. Цей факт

підтверджує наші попередні дослідження. Спортсменки-жінки мають кращі здібності до виконання когнітивних завдань, які потребують концентрації уваги та залучення функції мислення. Показник стабільності достовірно кращий у жінок, які мають вищу стабільність у реалізації нейродинамічних функцій.

Таблиця 3. Середні значення показників балансу нервових процесів у спортсменів різних гендерних груп (n=46)

Показники	Жінки (n=22)			Чоловіки (n=24)		
	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль
Точність (ум.од.)	3,24	2,90	4,08	2,67*	2,27	3,15
Стабільність (%)	4,35	3,50	4,81	3,35*	2,89	3,83
Збудження (ум.од.)	-0,41	-1,68	0,02	-0,50	-1,17	0,04

Примітка: * – $p < 0,05$, порівняно із групою спортсменок-жінок.

За особливостями прояву балансу нервових процесів достовірною різниці не виявлено (табл. 3). Цей показник, враховуючи граничні норми комплексної методики, у спортсменів, як чоловіків, так і у жінок знаходиться на межі балансу та помірного збудження нервових процесів. Особливістю при проведенні цього тесту було те, що впродовж усієї роботи місцезоположення обох сигналів знаходилося під постійним зоровим контролем обстежуваних. У табл. 4 представлено значення показників витривалості ЦНС у спортсменів різних гендерних груп. За результатами дослідження витривалості нервової системи, необхідно зазначити, що вищі значення показників витривалості та стабільності спостері-

гаються в групі чоловіків. За показниками частоти торкань та скважності достовірних різниць не виявлено. Вищі абсолютні значення стабільності (коефіцієнту варіації) у спортсменів-чоловіків вказують на погіршення рівня відтворення частоти торкань при виконанні теплінг-тесту, що свідчить про наявність варіабельності під час рухової діяльності. Цей феномен відображає можливості при формування або реалізації функціональної системи, відповідальної за рівень сприйняття та переробки інформації, та пошуку і залучення нових нейродинамічних елементів функціональної системи в екстремальних умовах спортивної діяльності [4].

Таблиця 4. Середні значення показників, що характеризують витривалість (силу) нервової системи у спортсменів різних гендерних груп (n=46)

Показники	Жінки (n=22)			Чоловіки (n=24)		
	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль	Медіана	Нижній кuartиль	Верхній кuartиль
Витривалість (ум.од.)	-1,66	-2,85	-1,04	-1,23*	-1,53	-0,33
Частота торкань (ум.од.)	5,65	5,31	5,89	5,87	5,4	6,09
Стабільність (%)	9,39	8,11	10,21	10,10*	8,21	14,48
Скважність, (ум.од.)	3,74	3,10	4,55	3,58	3,04	4,11

Примітка: * – $p < 0,05$, порівняно із групою спортсменок-жінок.

На сьогоднішній день сучасний спорт вимагає індивідуального підходу, з урахуванням особливостей стану та максимальних можливостей прояву нейродинамічних функцій, при підготовці елітних спортсменів різних гендерних груп, особливо у єдиноборствах, куди входять всі види боротьби. Індивідуалізація, на нашу думку, повинна враховувати індивідуально-типологічні особливості, що генетично детерміновані, біоритми, функціональний стан, об'єм навантажень, визначений час тренувань та інше.

Висновки. Однією з психофізіологічних особливостей статевого диморфізму у спортсменів-єдиноборців високої кваліфікації є наявність кращого прояву когніти-

вних функцій, на фоні деякого зниження рівня нейродинамічних характеристик у жінок, порівняно із чоловіками. Виявлено, що у спортсмени-чоловіки в умовах інформаційного навантаження краще виконують спонтанні, швидкісні, але недостатньо підготовлені рішення і моторні дії, порівняно із жінками. Наявність погіршення стабільності при виконанні теплінг-тесту у спортсменів-чоловіків відображає можливості при формуванні функціональної системи, відповідальної за рівень сприйняття та переробку інформації, пошуку і залучення нових елементів функціональної системи в умовах спортивної діяльності. Подальші дослідження у гендерному аспекті будуть проведені з урахуванням таких генетично дете-

рмінованих функцій, як проявів стресостійкості, різних рівнів полезалежності та функціональної асиметрії півкуль головного мозку.

Список використаних джерел

1. Вяткин Б. А. К вопросу о соотношении свойств типа нервной системы, темперамента и способностей к спортивной деятельности / Б. А. Вяткин // Темперамент и спорт: ученые записки ИГПИ. – Пермь. 2001.
2. Емшанова Ю. А. Индивидуально-типологические особенности теннисистов и их влияние на соревновательную деятельность / Ю. А. Емшанова // Физическое воспитание студентов. – 2011. – № 5. – С. 22–25.
3. Ильин Е. П. Психофизиология состояний человека / Е. П. Ильин. – СПб., 2005.
4. Лебедев В. И. Личность в экстремальных условиях / В. И. Лебедев. – М., 1989.

5. Коробейников Г. В. Физиологические механизмы мобилизации функциональных резервов организма человека при напряженной мышечной деятельности / Г. В. Коробейников // Физиология человека. – 1995. – Т. 21, № 3. – С. 81–86.
6. Коробейников Г. Оцінювання психофізіологічних станів у спорті / Г. Коробейников. – Л., 2013.
7. Van der Molen M. W., Eds. O. Neumann & A. F. Sanders. Energetics and the reaction process: Running threads through experimental psychology / M. W. Molen van der ; eds. O. Neumann, A. F. Sanders // Handbook of perception and action. – 1996. – Vol. 3. – P. 229–276.
8. Руководство к аппаратно-программному психодиагностическому комплексу Мультипсихометр-05 под руководством канд. техн. наук Сугоняева К. В.
9. Реброва О. Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях / О. Ю. Реброва // Междунар. журн. мед. практики. – 2000. – № 4. – С. 43–46.
10. Shannon C. E. A mathematical theory of communication / C. E. Shannon // Bell. System. Tech. J. – 1948. – № 27. – P. 379.

Надійшла до редколегії 06.10.14

Л. Коробейникова, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕЙРОДИНАМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ У ЭЛИТНЫХ СПОРТСМЕНОВ-ЕДИНОБОРЦЕВ РАЗНОГО ПОЛА

Изучение нейродинамических особенностей у элитных спортсменов в гендерном аспекте. Использовались следующие методики "Сенсомоторная реакция", "Функциональная подвижность нервенных процессов", "Реакция на движущийся объект", "Выносливость нервенной системы". Исследовано две группы элитных спортсменов-дзюдоистов разного пола. Выявлено, что у спортсменов-мужчин выше производительность зрительного восприятия и лучше эффективность переработки зрительной информации, при исследовании нейродинамических функций, по сравнению с женщинами, что свидетельствует о наличии зависимости когнитивного компонента восприятия и переработки информации от пола у спортсменов. Выявлено, что в спортсмены-мужчины, в условиях информационной нагрузки, лучше выполняют спонтанные, скоростные, но недостаточно подготовленные моторные действия, по сравнению с женщинами.

Ключевые слова: нейродинамические функции, особенности восприятия, переработка информации, гендерный аспект, спортсмены.

L. Korobeinikova, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

GENDER FEATURES OF PRESENTATION OF NEURODYNAMIC FUNCTION IN ELITE COMBAT ATHLETES

To study the neurodynamics features in elite athletes from a gender perspective. The used of the following methods "Sensory-motor reaction", "Functional mobility of nervous processes", "Reaction to a moving object", "Endurance of the nervous system." The two groups of elite judokas with different sexes were studied. Revealed that male athletes higher performance and better visual perception of the effectiveness of visual information processing, the study of neural function, compared with women, which suggests the presence of cognitive component depending on the perception and processing of information from the floor in athletes. It is revealed that the male athletes, in terms of information load, better perform spontaneous, high-speed, but not enough trained motor actions, as compared to women.

Key words: neurodynamic functions, features of perception, information processing, gender dimension, athletes.

УДК 579.62

О. Нечипуренко, асп.,
М. Хархота, канд. биол. наук,
Л. Авдєєва, д-р мед. наук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

БЕЗПЕЧНІСТЬ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ КАРОТИНОЇДІВ *BACILLUS SP. 1.1* ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ЩОДО ТЕПЛОКРОВНИХ ТВАРИН

*Встановлено, що штами-продуценти каротиноїдів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 є безпечними щодо теплокровних тварин, а саме, авірулентні, не виявляють токсичної та токсигенної дії. Визначено відсутність здатності штамів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 продукувати путресцин та кадаверин. У дослідках на мишах показано, що пероральне та внутрішньочеревинне введення суспензій досліджуваних штамів бацил, які містили 15 млрд. клітин/мишу не викликало загибелі піддослідних тварин і не призводило до патоморфологічних змін тканин їх органів. Таким чином, штами *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 непатогенні і є безпечними для теплокровних тварин.*

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, вірулентність, токсичність, токсигенність.

Вступ. Наразі у тваринництві, птахівництві та аквакультурі широко використовують пробіотичні штами бактерій роду *Bacillus* [1]. Вони характеризуються вираженою антагоністичною активністю щодо умовно-патогенних і патогенних бактерій, стійкі до агресивних умов шлунково-кишкового тракту, мають високу ферментативну активність [2, 3]. До того ж переважна більшість штамів бактерій роду *Bacillus* є непатогенними, за виключенням лише деяких ізолятів, що мають фактори вірулентності та детермінанти стійкості до антибіотиків [4]. Окремі штами здатні синтезувати пігменти, зокрема каротиноїдні природи, що робить їх перспективними при застосуванні у тваринництві че-

рез можливість поєднати в одному препараті властивості пробіотиків і здатність компенсувати дефіцит каротину в організмі тварини. Однак, головною вимогою, що висувається до штамів мікроорганізмів – складових біопрепаратів, є їх безпечність щодо теплокровних тварин, а саме авірулентність, відсутність токсичності, токсигенного впливу та здатності викликати патоморфологічні зміни тканин органів тварин [1, 4].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити безпечність штамів-продуцентів каротиноїдів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо теплокровних тварин.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *Bacillus* sp. 1.1 з музею відділу антибіотиків та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Культивування бактерій здійснювали на рідкому живильному середовищі наступного складу (г/л): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75, KH_2PO_4 – 9,60, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18, глюкоза – 10,00, pH = 7,0 за температури 37 °C [5].

Наявність у штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 лізин- й орнітиндекарбоксилаз, за допомогою яких утворюються путресцин і кадаверин, відповідно, визначали у дослідях *in vitro* з використанням API 20 E тест-системи (Himedia, Індія). Поява червоного кольору внаслідок інкубації вказує на наявність лізин- та орнітиндекарбоксилази [6].

Досліди на мишах проводили згідно до біоетичних норм поводження з тваринами [7]. Для дослідження вірулентності мишам самцям лінії BALB/C віком 1,5–2 місяці вводили суспензію добової культури живих клітин, токсигенності – суспензію добової культури, вбитої прогріванням, токсичності – безклітинний фільтрат 10-ти денної культури. Досліджувалися наступні концентрації клітин штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113: $0,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^9$, 15×10^9 КУО/мл. Шлях введення – перорально та внутрішньочеревинно. Суспензію вводили тваринам одноразово, термін спостереження – 7 діб [8]. Тваринам контрольної групи вводили стерильне середовище для культивування бактерій. Контроль зовнішнього стану тварин проводили щоденно. Після закінчення терміну спостереження проводили евтаназію, шляхом дислокації шийних хребців, оцінювали стан внутрішніх органів тварин. Звертали увагу на форму, колір, зовнішній вигляд внутрішніх органів.

Для гістологічного аналізу у мишей відбирали зразки нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахеї, шлунку, кишечника, підшлункової, нерву, стравоходу. Відібрані зразки фіксували швидким методом у 10 % формаліні, проводили через розчини спиртів, ксилолу та розплавлений парафін. Після зневоднення та парафінізації тканин, органи заливали рідким парафіном і виготовляли мікротонкі зрізи, які висушували і фарбували за стандартною методикою розчинами еозину та гематоксиліну [9]. Гістологічні дослідження проводили у лабораторії гістології ТОВ "Центру ветеринарної діагностики".

Результати та обговорення. Більшість патогенних бактерій родини *Enterobacteriaceae* та деякі штами *Bacillus cereus* здатні утворювати у кишечнику тварин отруйні біогенні аміни, а саме, путресцин та кадаверин, які за концентрації більше 2 г речовини на 1 кг маси тіла є токсичними для щурів [10]. При дослідженні здатності штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

продукувати біогенні аміни, не виявлено лізиндекарбоксилази та орнітиндекарбоксилази, за допомогою яких, відповідно, утворюються путресцин та кадаверин.

Відомо, що мікроорганізми, які входять до складу біопрепаратів є непатогенними, а тому, авірулентними, не спричинюють токсичний і токсигенний вплив на теплокровних тварин [1]. З огляду на це, нами було досліджено зазначені показники. При пероральному та внутрішньочеревинному введенні добової суспензії штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 з концентраціями клітин: $0,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^9$, 15×10^9 КУО/мл не спостерігали зовнішніх змін та змін у поведінці мишей, порівняно з тваринами контрольної групи. Не відмічено випадків захворювання чи загибелі піддослідних тварин, спричинених введенням суспензії живих клітин бактерій обох штамів навіть за концентрації 15×10^9 КУО/мл. Це свідчить про авірулентність штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Також слід зазначити й відсутність токсичного і токсигенного впливу бацил на організм тварин, оскільки жодного випадку загибелі піддослідних мишей не було зафіксовано.

Летальні дози встановити не вдалося, тому що вони перевищували застосовані. Тобто можна стверджувати, що $\text{LD}_{50 \text{ per os}}$ та $\text{LD}_{50 \text{ в/б}} > 15$ млрд. клітин/мишу. Отримані дані узгоджуються з літературними [2] і вказують на безпечність та низьку токсичність каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо теплокровних тварин.

Відсутність патологічних змін у мишей було підтверджено при макроскопічному вивченні внутрішніх органів. У тварин дослідних і контрольних груп виявлено лише незначний набряк легень та гіперемію печінки, що могли виникнути внаслідок евтаназії. Видимих патологоанатомічних змін у мозку, трахеї, шлунку, серці, нирках, кишечнику, селезінці не зафіксовано. Підтвердженням безпечності штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 є гістологічний аналіз тканин органів мишей, яким перорально та внутрішньочеревинно було введено суспензію з концентрацією клітин: 15×10^9 КУО/мл.

У респіраторному тракті тварин контрольної та дослідних груп не виявлено принципових відмінностей. Структура епітелію слизової оболонки трахеї збережена, в'язкий шар слизової структурований. Зареєстрований незначний набряк інтерстиції легенів (у межах фізіологічної норми). Будова нервової тканини головного мозку відповідала базовим нормам. У кишечнику мишей контрольної та дослідних груп був виявлений частковий некроз епітелію слизової, проте довжина та структура ворсин були не змінені, ознак запального процесу (лімфоцитарно-макрофагальних інфільтрацій), крововиводів у підслизовій та власній пластинці слизової не зареєстровано (рис. 1). Це вказує на відсутність розвитку інфекційного процесу бактеріальної етіології.

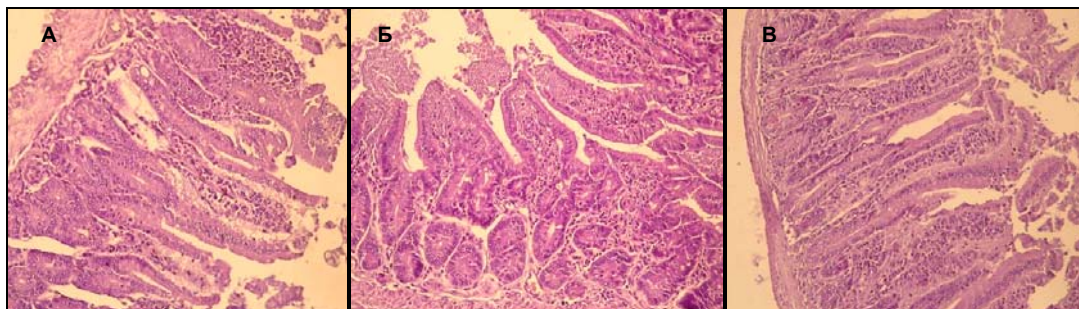


Рис. 1. Мікроскопічна будова кишечника (фарбування гематоксиліном та еозином, А Б, В збільшення $\times 200$):

А – контрольна група, Б – група мишей, яким вводили штам *Bacillus* sp. 1.1,

В – група мишей, яким вводили штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

(структура збережена, частковий некроз епітелію слизової)

Некротичних змін у серці та підшлунковій залозі не зафіксовано. Слід зазначити про наявність незначного некрозу та атрофії епітелію ниркових канальців у тварин

усіх груп (рис. 2). Відповідні зміни не є значимими, вони могли виникнути внаслідок порушення доступності води.

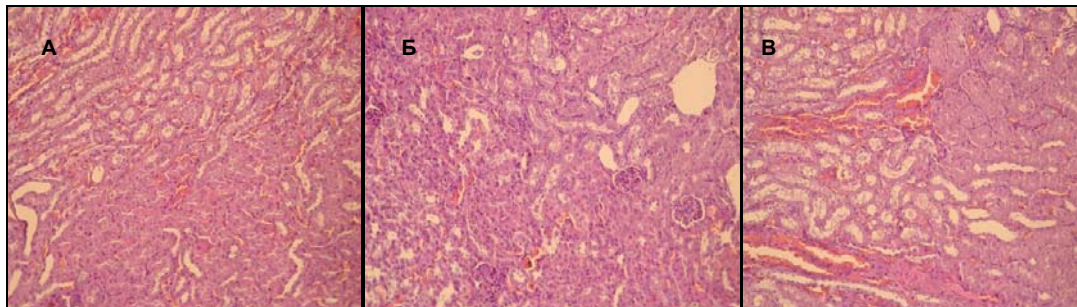


Рис. 2. Мікроскопічна будова нирок (фарбування гематоксиліном та еозином, А Б, В збільшення $\times 200$):

Б – група мишей, яким вводили штам *Bacillus* sp. 1.1,
В – група мишей, яким вводили штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113
(частковий некроз та ділянки паренхіми з атрофією епітелію ниркових канальців)

При дослідженні паренхіми печінки тварин контрольної групи та мишей, яким вводили клітини штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, були виявлені незначні ознаки зернистої дистрофії та коагулятивного некрозу гепатоцитів (рис. 3). Характер та

ступінь патогістологічних змін контрольної та дослідних груп не відрізнялися між собою, що вказує на неінфекційну причину патології, котра могла виникнути внаслідок незбалансованості раціону мишей.

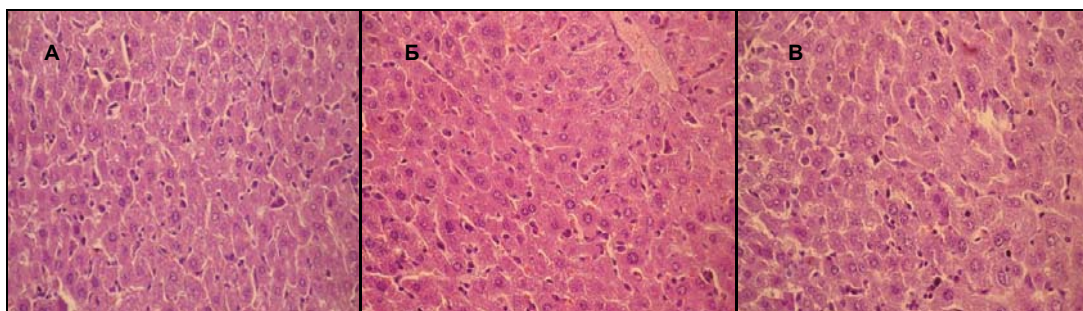


Рис. 3. Мікроскопічна будова печінки (фарбування гематоксиліном та еозином, А Б, В збільшення $\times 400$):

Б – група мишей, яким вводили штам *Bacillus* sp. 1.1,
В – група мишей, яким вводили штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113
(ознаки зернистої дистрофії гепатоцитів)

Слід зазначити, що при аналізі тканин органів імунної системи мишей патоморфологічних змін не виявлено. Нами було показано відсутність виснаження білої пульпи селезінки та фолікулів лімфатичних вузлів у тварин, яким

вводили клітини *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 (рис. 4). Це вказує на відсутність інфекції, спричиненої бактеріями досліджених культур.

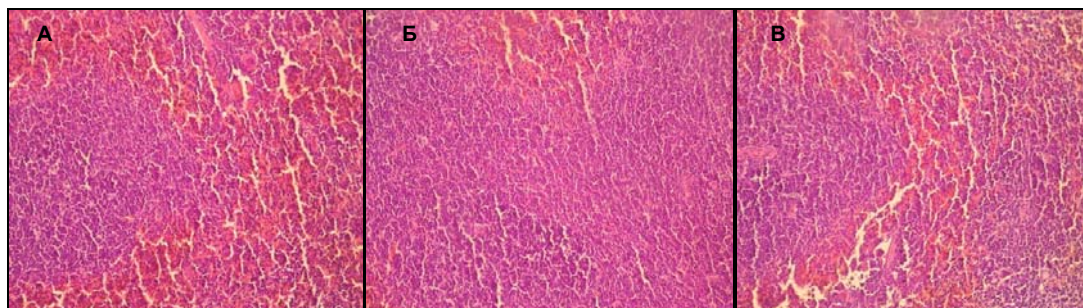


Рис. 4. Мікроскопічна будова селезінки (фарбування гематоксиліном та еозином, А Б, В збільшення $\times 200$):

А – контрольна група, Б – група мишей, яким вводили штам *Bacillus* sp. 1.1,
В – група мишей, яким вводили штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113
(виснаження білої пульпи селезінки на 10-15 % – у межах фізіологічної норми)

Слід зазначити, що патогістологічні зміни та будова тканин органів мишей контрольної групи були подібними до тих, які спостерігалися внаслідок ін'єкції суспензії бактеріальних клітин. З огляду на вищевикладене, ка-

ротинсинтезувальні штами *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 не спричинювали появу патологічних змін у мишей.

Висновки. Отже, нами встановлено, що досліджувані штами бактерій є авірулентними, не виявляють токсичної та токсигенної дії. Летальна доза для обох штамів перевищувала застосовані: ЛД₅₀ peros і ЛД₅₀ в/б > 15 млрд. клітин/мишу. Згідно отриманих результатів та відповідних нормативних матеріалів [1, 2, 3] каротинсинтезувальні штами *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 віднесено до групи непатогенних мікроорганізмів, безпечних щодо теплокровних тварин.

Список використаних джерел

1. Lee J. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties / J. Lee, I. Park; Y. Cho // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2012. – Vol. 25. – P. 577–585.
2. Sorokulova I. B. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use / I. B. Sorokulova, I. V. Pinchuk, M. Denayrolles // Dig Dis Sci. – 2008. – Vol. 53. – P. 954–963.
3. Anadón A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment / A. Anadón, M. Martínez-Larrañaga, M. Aranzazu Martínez // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2006. – Vol. 45. – P. 91–95.

4. Hwang K. Y. The benefits of using bacillus as a probiotic / K. Y. Hwang, J. H. Cho, J. Y. Lee, K. D. Kang // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–3462.

5. Нечипуренко О. О. Пробиотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 / О. О. Нечипуренко, М. А. Хархота, Л. В. Авдеева // XIII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (1–6 жовт. 2013 р., Ялта) : зб. тез. і доп. – Ялта, 2013. – С. 499.

6. Chang M., Chang H.C. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. / M. Chang, H.C. Chang // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – Vol. 153. – P. 269–274.

7. Animal Bioethics: Principles and Teaching Methods / eds by: M. Marie, S. Edwards, G. Gandini, M. Reiss, E. von Borell. – Wageningen, 2005. – 360 p.

8. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / В. В. Алексеев, А. Н. Алипов, В. А. Андреев и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 2. – 792 с.

9. Горальский Л. П. Основы гістологічної техніки у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.

10. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats / H. P. Til, H. E. Falke, M. K. Prinsen, M. I. Willems // Food and chemical toxicology. – 1997. – Vol. 43. – P. 337–348.

Надійшла до редколегії 06.10.14

А. Нечипуренко, асп., М. Хархота, канд. біол. наук, Л. Авдеева, д-р мед. наук
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

БЕЗОПАСНОСТЬ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ *BACILLUS* SP. 1.1 И *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ДЛЯ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Установлено, что штаммы-продуценты каротиноидов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 являются безопасными для теплокровных животных, а именно, авирулентны, не проявляют токсическое и токсигенное действие. Установлено отсутствие способности штаммов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 продуцировать путресцин и кадаверин. В опытах на мышах показано, что пероральное и внутрибрюшинное введение суспензий исследуемых штаммов бактерий, содержащих 15 млрд. клеток/мышь не вызывало гибель подопытных животных и не приводило к патоморфологическим изменениям тканей их органов. Таким образом, штаммы *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 непатогенны и являются безопасными для теплокровных животных.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, вирулентность, токсичность, токсигенность.

O. Nechypurenko, PhD stud., M. Kharhota, PhD., L. Avdeeva, D.Sc.
Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

SAFETY OF CAROTENE-PRODUCING STRAINS *BACILLUS* SP. 1.1 AND *B. AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113 FOR HOMIOOTHERMAL ANIMALS

It was detected that the strains of carotenoid-producing *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 are safe for warm-blooded animals, also avirulent and do not show toxic and toxigenic effect. It was determined the absence of the ability of strains of *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 to produce putrescine and cadaverine. In experiments on mice was shown that oral and intraperitoneal administration of suspensions of the strains of bacilli, containing 15 billion cells/mouse did not cause the death of experimental animals and did not lead to pathologic changes in the tissues of their bodies. Thus, strains *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 are non-pathogenic and safe for warm-blooded animals.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, virulence, toxicity, toxigenicity.

УДК 577.112.7

А. Харькова, асп., Д. Мінченко, канд. мед. наук,
Д. Цимбал, студ., О. Мінченко, проф.
Институт біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *IGFBP1*, *IGFBP2* ТА *IGF2BP3* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ І ГЛЮКОЗИ

Протеїни, що зв'язуються з подібним до інсуліну фактором росту (IGF) або мРНК цього фактора росту відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації і, зокрема, росту злоякісних пухлин. Встановлено, що блокада обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1), що є основним компонентом сигналіну за умов стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* і *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87, що корелює з пригніченням проліферації цих клітин. Встановлено, що дефіцит глутаміну у середовищі призводить до посилення експресії гена *IGFBP1*, але істотно не змінює рівень експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* в обох типах клітин гліоми, причому цей ефект дефіциту глутаміну не залежав від пригнічення функції сигнального ензиму ERN1. В той же час, за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* знижувався в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції ERN1 посилювало цей ефект. Таким чином, результати даної роботи продемонстрували, що експресія генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 є залежною від сигнального ензиму ERN1 і змінюється за умов дефіциту глутаміну та глюкози, але лише ефект дефіциту глюкози залежав від функції ERN1. Більше того, зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 може бути причетним до пригнічення проліферації цих клітин.

Ключові слова: експресія генів *IGFBP1*, *IGFBP2* і *IGF2BP3*, глутамін, глюкоза.

Вступ. Дефіцит поживних речовин є одним із факторів, що індукують стрес ендоплазматичного ретикулу і експресію великої групи генів, зокрема тих, що

контролюють процеси проліферації, а тому важливим фактором росту різних злоякісних пухлин, в тому числі і гліом [1, 2]. Відомо, що стрес ендоплазматичного рети-

© Харькова А., Мінченко Д., Цимбал Д., Мінченко О., 2014

кулуму є реакцією на накопичення не згорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному ретикулумі і опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), PERK (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулуму) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6), але саме ERN1 є головною сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулуму [3 – 7]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму спостерігається блокада синтезу протеїнів і надходження до ендоплазматичного ретикулуму нових протеїнів, що синтезуються, а це сприяє не лише фолдингу протеїнів, які уже є в ендоплазматичному ретикулумі, а і деградації не згорнутих протеїнів [8 – 11]. Все це необхідно для виживання клітин за умов стресу або їх смерті через механізми, асоційовані зі стресом ендоплазматичного ретикулуму.

Сенсорно-сигнальний ензим ERN1 є біфункціональним, оскільки має два різних каталітичних домени (серин/треонінової кінази та ендорибонуклеази), які опосередковують залежний від ERN1 сигналінг. Відомо, що асоційована з ERN1 протеїнкіназна активність аутофосфорилує цей ензим і що це фосфорилування є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеази ERN1 [7]. Ця ендорибонуклеаза є відповідальною за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу мРНК пре-ХВР1 (X-box binding protein 1) [9, 10]. Зрілий сплайс-варіант мРНК ХВР1 (ХВР1s) є матрицею для синтезу транскрипційного фактора, що контролює експресію декількох сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13]. Також відомо, що фосфорилування ХВР1s протеїнкіназою р38 MAP та його взаємодія з регуляторною субодиницею фосфатиділінозитол 3-кінази збільшують ядерну транслокацію ХВР1s, а взаємодія з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) сприяє опосередкованій протеосою деградації цього транскрипційного фактора [13, 14]. Сигнальний шлях ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулуму тісно пов'язаний з ефектами ішемії і гіпоксії, а також процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки було показано, що повна блокада функції цього сигнального шляху у клітинах гліоми та аденокарциноми легень призводить до пригнічення росту пухлин із цих клітин [9, 15, 16]. Відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженим ангіогенезом та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму головного мозку і що як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом, сприяють виживанню пухлинних клітин і посилюють їх агресивність [8]. Детальне вивчення механізмів залежності клітин від гіпоксії є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення ангіогенезу у клітинах пухлин шляхом блокади механізмів їх виживання.

Фактори IGFBP1, IGFBP2 та IGF2BP3, що кодують синтез важливих регуляторів функції подібних до інсуліну факторів росту (IGF) відіграють ключову роль у регуляції росту злоякісних пухлин, змінюючи стабільність і функцію IGF, а також стабільність мРНК і ефективність трансляції [17–19]. Фактори IGFBP1 та IGFBP2 є протеїнами, що зв'язуються з подібними до інсуліну факторами росту і не лише захищають їх від деградації, а і істотно впливають на взаємодію IGF з їх рецепторами, змінюючи таким чином ефективність дії цих факторів росту [17, 18]. Більше того, для протеїнів родини

IGFBP показані також не опосередковані IGF функції. Фактор IGFBP2 стимулює процеси проліферації, виживання клітин і активує каскади сигнальних шляхів протеїнкіназ, що активуються міогеном (MAPK) [18]. Протеїн IGF2BP3 має у своїй структурі КН домени, що важливі для зв'язування з мРНК і регуляції її стабільності та ефективності трансляції, причому він може зв'язуватися не лише з IGF2, а і з іншими мРНК [19]. Він посилює процеси проліферації і рівень його експресії є збільшеним у злоякісних пухлинах. На даний момент внесок факторів IGFBP1, IGFBP2 та IGF2BP3 в реалізацію ефектів стресу ендоплазматичного ретикулуму і, зокрема, сигнального шляху ERN1 досліджений ще недостатньо, а тому вивчення їх ролі у контролюванні процесів проліферації клітин гліоми є надзвичайно важливим [18, 19].

Метою даної роботи було оцінити експресію генів, що кодують синтез факторів IGFBP1, IGFBP2 та IGF2BP3, які задіяні в регуляції процесів проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулуму, за умов короткотривалого дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі.

Матеріали та методи. Досліди проведені на клітинах гліоми лінії U87, що були отримані із компанії "ATCC" (США). Ростили їх у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л) від компанії "Invitrogen" (США) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У це середовище додатково додавали 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят ("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco". США) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; "Gibco"). Для проведення досліджень були використані дві сублінії цих клітин гліоми: контрольні клітини гліоми, що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1 (Вектор), які використовували як контроль 1, та клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінант-негативною конструкцією dnERN1 що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1 (dnERN1), які використовували як контроль 2 при дослідженні впливу на ці клітини дефіциту глюкози та глутаміну. Пригнічення функції ензиму ERN1 було оцінено раніше по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 за умов індукваного тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [20]. При дослідженні впливу дефіциту глутаміну та глюкози клітини промивали фізіологічним розчином (рН 7,4) і інкубували у середовищі DMEM ("Gibco") без глутаміну або без глюкози протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли, як було описано у попередній роботі [20]. Осад РНК двічі промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК (кДНК). Синтез кДНК проводили за допомогою Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії різних генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції, використовуючи апарат "Mx 3000P QPCR" фірми "Stratagene" (США) та реакційну суміш "SYBRGreen Mix" із компанії "AB gene" (Велика Британія). Для ампліфікації кДНК *IGFBP1* (insulin-like growth factor binding protein 1) були використані такі праймери: прямий (5'– TATGATGGCTCGAAGGCTCT –3' та зворотний (5'– GAGACCCAGGGATCCTCTTC –3').

Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 765 – 784 та 1020 – 1001 кДНК IGFBP1 людини (GenBank номер NM_000596). Розмір ампліфікованого фрагмента 256 пар нуклеотидних залишків (п.н.з.). Ампліфікацію кДНК IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein 2) проводили за допомогою прямого (5'– CCTCAAGTCGGGTATGAAGGAG –3') та зворотного (5'– SAACAGGAAGTGGACCAGGT –3') праймерів, які відповідають послідовностям 669 – 688 та 830 – 811 кДНК IGFBP2 людини (GenBank номер NM_000597). Розмір ампліфікованого фрагмента 172 п.н.з. Для ампліфікації кДНК IGF2BP3 (insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3) also known as KOC1 (KH domain containing protein overexpressed in cancer) були використані такі праймери: прямий – 5'– GGCAAAACGGTGAATGAACT –3' та зворотний – 5'– GTCCACTTTGCAGAGCCTTC –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 1785-1804 та 1983 – 1964 кДНК IGF2BP3 людини (GenBank номер NM_006547). Розмір ампліфікованого фрагмента 199 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential

expression calculator", а статистичний аналіз за непараметричним аналогом *t*-теста Ст'юдента з використанням програмного забезпечення OriginPro 7.5. Значення експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. Представлені значення $M \pm m$ чотирьох експериментів. Результати вважали достовірними при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, пригнічення кінзної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму, призводить до зниження на 45 % ($P < 0,05$) рівня експресії гена *IGFBP1* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором pcDNA3.1 (Вектор). За умов дефіциту глутаміну у середовищі рівень експресії цього гена посилюється на 120 % ($P < 0,05$) як у контрольних клітинах гліоми (з нормальною функцією ензиму ERN1), так і у клітинах з пригніченою функцією цього сигнального ензиму (dnERN1). Ці результати вказують на те, що ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії гена *IGFBP1* істотно не залежить від функціональної активності сигнального шляху, опосередкованого ERN1, оскільки ефект дефіциту глутаміну був подібним в обох типах клітин. В той же час, за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії гена *IGFBP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контролем 1 також посилюється, але лише на 27 % ($P < 0,05$), а у клітинах гліоми без функції сигнального ензиму ERN1 цей ефект дефіциту глюкози у середовищі у порівнянні з контролем 2 не проявляється (рис. 1).

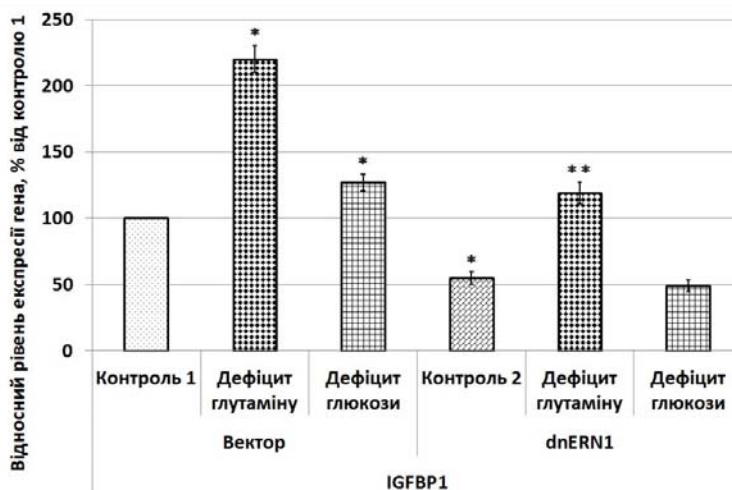


Рис. 1. Зміни рівня експресії гена *IGFBP1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

Таким чином, отримані результати свідчать про опосередкованість ефекту дефіциту глюкози на рівень експресії гена *IGFBP1* сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулуму ERN1.

Рівень експресії гена *IGFBP2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади ERN1 також призводить до зниження на 55 %; ($P < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором (рис. 2A).

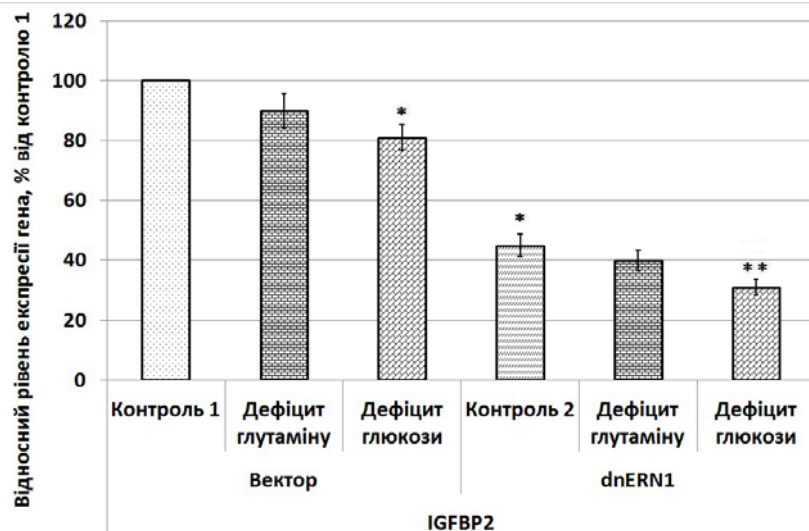


Рис. 2А. Зміни рівня експресії гена *IGFBP2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

В той же час, рівень експресії гена *IGFBP2* за умов дефіциту глутаміну у середовищі істотно не змінюється як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Ці результати вказують на те, що експресія гена *IGFBP2* у клітинах гліоми є резистентною до дефіциту глутаміну й істотно не залежить від функціональної активності сигнального шляху, опосередкованого ERN1. Із наведених на рис. 2 даних також видно, що за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії гена *IGFBP2* знижується на 19 % ($P < 0,05$) у контрольних клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контролем, а у клітинах гліоми без функції сигнального ензиму ERN1 знижується на 31 %; ($P < 0,05$), тобто у цих клітинах ефект дефіциту глюкози у середовищі є більшим, порівняно з контроль-

ними клітинами. Таким чином, рівень експресії генів *IGFBP1* та *IGFBP2* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у середовищі змінюється по-різному за напрямком, але залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

На рис. 2Б приведені результати електрофоретичного розділення в агарозному гелі продуктів ампліфікації генів *IGFBP2* та β -актину у контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор; 1 і 2) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1; 3 і 4), за умов дефіциту глутаміну у середовищі (2 і 4), де 1 – контроль 1, 3 – контроль 2. Отримані результати свідчать про відсутність у продуктах ампліфікації додаткових чи неспецифічних фрагментів.

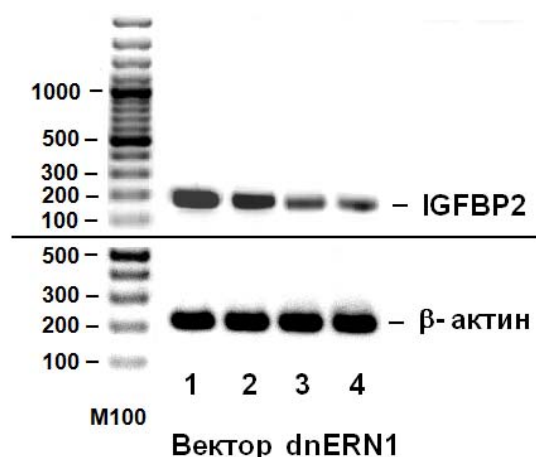


Рис. 2Б. Електрофореграма розподілення продуктів ампліфікації генів *IGFBP2* та β -актину у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну у середовищі. 1 – контроль 1, 3 – контроль 2, а 2 і 4 – за умов дефіциту глутаміну у контрольних клітинах (Вектор) та трансфікованих dnERN1, відповідно

Як видно з даних, приведених на рис. 3, за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 знижується на 60 % ($P < 0,05$) рівень експресії і гена *IGF2BP3*, білковий продукт якого зв'язується з мРНК IGF2 і контролює стабільність цієї мРНК та ефективність її трансляції, активуючи процеси проліферації

[19]. Також встановлено, що рівень експресії цього гена є резистентним до дефіциту глутаміну у середовищі в обох типах клітин гліоми, але знижується за умов дефіциту глюкози: у контрольних клітинах гліоми на 17 %, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 в значно більшій мірі – на 35 % (рис. 3).

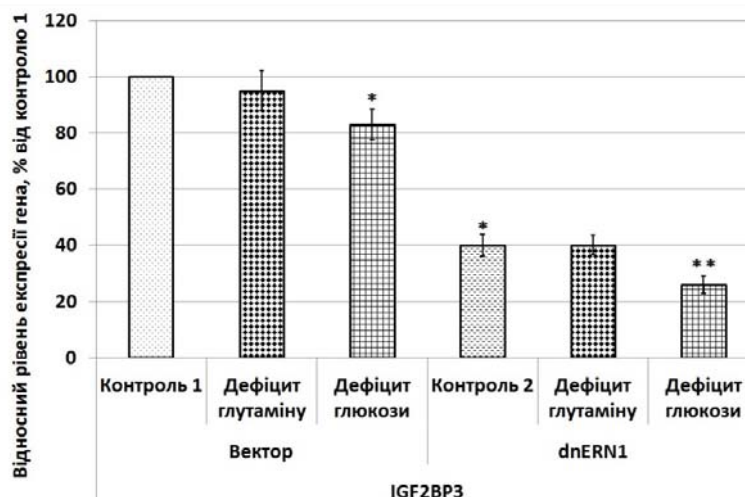


Рис. 3. Зміни рівня експресії гена *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

Ці результати свідчать про залежність експресії гена *IGF2BP3* до умов дефіциту глюкози і про залежність цього процесу від сигнального ензиму ERN1. Більше того, отримані дані узгоджуються з даними інших авторів стосовно впливу нестачі глутаміну і глюкози у середовищі на експресію генів, що контролюють ангіогенез, і переважну залежність цих ефектів від функції сигнального ензиму ERN1 [15, 20].

Відомо, що фактори *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* є поліфункціональними протеїнами і відіграють важливу роль у регуляції росту злоякісних пухлин переважно як фактори, що контролюють стабільність подібних до інсуліну факторів росту, їх взаємодію з рецепторами IGF, а також стабільність і ефективність трансляції мРНК IGF2 та інших мРНК [17-19]. Рівень експресії цих факторів посилюється за пухлинного росту, і виявлене нами зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* за умов блокади функції сигнального ензиму ERN1 узгоджується з даними літератури про пригнічення проліферації цих клітин та росту пухлин із них [15, 16]. Можна припустити, що зменшення рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 вносить певний вклад у пригнічення проліферації клітин гліоми та росту пухлин із них. В той же час, для розшифровки молекулярних механізмів зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1, як і за умов нестачі глюкози чи глутаміну, потрібні подальші поглиблені дослідження.

Таким чином, результати проведених досліджень продемонстрували залежність експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* від функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87, а також залежність їх експресії від дефіциту глутаміну і глюкози у середовищі, а також ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу. Крім того, значне зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 корелює з пригніченням росту пухлин із цих клітин *in vivo* [15, 16] і може бути причетним до цього, оскільки ці фактори є ключовими у регуляції процесів проліферації та виживання клітин [17-19].

Висновки.

1. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму

ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87.

2. Показано, що рівень експресії гена *IGFBP1* посилюється, а генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* – істотно не змінюється у контрольних клітинах гліоми за умов відсутності глутаміну у середовищі і що пригнічення сигнального ензиму ERN1 не змінює цей ефект.

3. Встановлено, що рівень експресії гена *IGFBP1* збільшується, а генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* знижується у контрольних клітинах гліоми за умов відсутності глюкози у середовищі і що блокада сигнального ензиму ERN1 посилює вплив дефіциту глюкози на експресію всіх цих генів.

4. Результати досліджень свідчать про залежність експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 від функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, а також про чутливість їх експресії до дефіциту глюкози, причому ця чутливість змінюється у клітинах з пригніченим ERN1.

Список використаних джерел

- Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // *Mutation Research*. – 2008. – Vol. 640. – P. 174-179.
- Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – P. 705-713.
- Zhang K., Kaufman R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 25. – P. 25935-25938.
- Bi M., Naczki C., Koritzinsky M., et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth // *EMBO Journal*. – 2005. – Vol. 24, № 19. – P. 3470-34815.
- Aragón T., van Anken E., Pincus D., et al. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, № 7230. – P. 736-740.
- Fels D.R., Koumenis C. Focused Review: ER Stress and Cancer The PERK/eIF2 α /ATF4 Module of the UPR in Hypoxia Resistance and Tumor Growth // *Cancer Biology & Therapy*. – 2006. – Vol. 5, № 7. – P. 723-728.
- Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A., et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, № 7230. – P. 687-693.
- Moennner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 22. – P. 10631-10634.
- Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D., et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64, № 17. – P. 5943-5947.
- Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A., et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 27. – P. 53-66.

11. Hollien J., Lin J.H., Li H., et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *The Journal of Cell Biology*. – 2009. – Vol. 186, № 3. – P. 323-331.
12. Lee J., Sun C., Zhou Y., et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, № 10. – P. 1251-1260.
13. Zhou Y., Lee J., Reno C.M., et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, № 3. – P. 356-365.
14. Park S.W., Zhou Y., Lee J., et al. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation // *Nature Medicine*. – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 429-437.
15. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – P. 6700-6707.
16. Auf G., Jabouille A., Guérin S., et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2010. – Vol. 107, № 35. – P. 1555-1558.

17. Nakamura M., Takakura M., Fujii R., et al. The PRB-dependent FOXO1/IGFBP-1 axis is essential for progestin to inhibit endometrial epithelial growth // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 336, № 1. – P. 68-75.

18. Foulstone E.J., Zeng L., Perks C.M., Holly J.M. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154, № 5. – P. 1780-1793.

19. Hartmann E.M., Bea S., Navarro A., et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor // *Modern Pathology*. – 2012. – Vol. 25, № 9. – P. 1227-1235.

20. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V., et al. The effect of hypoxia and ischemic condition

on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown // *Advances in Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 2, №2. – P. 198-206.

Надійшла до редколегії 06.10.14

А. Харьков, асп., Д. Минченко, канд. мед. наук, Д. Цимбал, студ., О. Минченко, проф.
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ IGFBP1, IGFBP2 И IGFBP3 В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С ПОДАВЛЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛУТАМИНА И ГЛЮКОЗЫ

Протеины, которые связываются с подобным инсулину фактору роста (IGF) или мРНК этого фактора роста играют важную роль в регуляции процессов пролиферации и, в частности, роста злокачественных опухолей. Установлено, что блокада обеих ферментативных функций сенсорно-сигнального энзима ERN1 (от эндоплазматического ретикулума к ядру-1), что является основным компонентом сигналинга в условиях стресса эндоплазматического ретикулума, снижает уровень экспрессии генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы линии U87, что коррелирует с угнетением пролиферации этих клеток. Установлено, что дефицит глутамина в среде приводит к усилению экспрессии гена IGFBP1, но существенно не влияет на уровень экспрессии генов IGFBP2 и IGFBP3 в обоих типах клеток глиомы, причем этот эффект дефицита глутамина не зависит от угнетения функции сигнального энзима ERN1. В то же время, в условиях дефицита глюкозы в среде уровень экспрессии генов IGFBP2 и IGFBP3 снижался в обоих типах клеток глиомы, но угнетение ERN1 усиливало этот эффект. Таким образом, результаты данной работы продемонстрировали, что экспрессия генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы линии U87 является зависимой от сигнального энзима ERN1 и меняется в условиях дефицита глутамина и глюкозы, но только эффект дефицита глюкозы зависит от функции ERN1. Более того, снижение уровня экспрессии генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы в условиях подавления обеих ферментативных активностей ERN1 может быть причастен к подавлению пролиферации этих клеток.

Ключевые слова: экспрессия генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3, глутамин, глюкоза.

A.Kharkova, PhD stud., D. Minchenko, PhD, D. Tsymbal, stud., O. Minchenko, prof.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF IGFBP1, IGFBP2 AND IGFBP3 GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION IN GLUTAMINE AND GLUCOSE DEPRIVATION CONDITIONS

Insulin-like growth factor binding proteins play an important role in the regulation of cell proliferation and malignant tumor growth. It was shown that blockade of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes in U87 glioma cell. The decreased level of these gene expressions in glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function correlates with suppression of cell proliferation. It was shown that glutamine deprivation condition leads to enhance the expression of IGFBP1 gene, but did not change significantly the expression of IGFBP2 and IGFBP3 genes in both types of glioma cells. Moreover, this effect of glutamine deprivation did not depend from suppression of ERN1 enzyme function. At the same time, the expression of IGFBP2 and IGFBP3 genes is decreased in glucose deprivation condition in both types of glioma cells and blockade of ERN1 signaling enzyme enhanced this effect. Thus, results of this investigation demonstrated that the expression of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes in U87 glioma cells is dependent from signaling enzyme ERN1 and is changed in glutamine and glucose deprivation conditions, but only effect of glucose deprivation was depended of ERN1 signaling enzyme function. Moreover, the decreasing of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 gene expressions in glioma cells with blockade of both enzymatic activities of ERN1 is possibly related to suppression of these cells proliferation.

Key words: expression of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes, glutamine, glucose.

УДК 612.362/364:577.181.5

Т. Довбинчук, асп., Т. Берегова, д-р біол. наук,
Г. Толстанов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Л. Закордонєць, канд. мед. наук
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ

ТРАНСПОРТ ВОДИ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКУ ЦЕФТРИАКСОНУ

Досліджено вплив антибіотику цефтріаксону на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів, в залежності від терміну введення та дози препарату, за використання методу перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ*. В дозі 50 мг/кг/добу, цефтріаксон викликає діарею у 10% щурів, а в дозі 300 мг/кг/добу – у 25%. Цефтріаксон, в обох дозах, призводить до зменшення абсорбції води через епітелій товстої кишки щурів. Отриманий ефект був більш виразним після 14-ти денного курсу у порівнянні з 5-ти денним.

Ключові слова: товста кишка, цефтріаксон, діарея.

Вступ. За частотою призначення антибіотики займають друге місце серед лікарських засобів. Антибіотикотерапія часто супроводжується розвитком побічних ефектів, особливо з боку шлунково-кишкового тракту, а саме діареї [1]. Антибіотик-асоційована діарея (ААД) – це три або більше щоденних епізодів неоформлених випорожнень упродовж двох або більше днів на фоні прийому антибіотиків чи у віддалені терміни після їх

відміни (зазвичай упродовж 8 тижнів). ААД може розвиватися не залежно від шляху введення антибіотиків (пероральне, парентеральне і, навіть, трансвагінальне). На сьогодні виділяють два типи ААД: 1) діарея зумовлена мікроорганізмом *Clostridium difficile*, яка складає приблизно 20 % усіх випадків [2]; 2) решта 80 % – це ідіопатична діарея, тобто не з'ясованої етіології.

Товста кишка – є важливим фізіологічним бар'єром на шляху виникнення діареї. Її всмоктувальна здатність у людини сягає 6 л води за добу і, лише, у випадку її підвищеного надходження виникає діарея [3]. Всмокування води через епітелій товстої кишки відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів, переважно йонів хлору та натрію. Також, часткове всмоктування відбувається трансцелюлярно за допомогою аквапоринових каналів мембрани колоноцитів [4]. Всмоктувальна функція кишечника знаходиться в тісному взаємозв'язку з життєдіяльністю мікробіоти, яка її населяє. Мікробіота впливає на рівень кон'югації та синтез жовчних кислот, продукує коротко-ланцюгові жирні кислоти, які мають прямий вплив на механізми всмоктування кишечника [5, 6]. Від складу мікробіоти залежить рівень колонізаційної резистентності та здатності перешкоджати розвитку місцевого запального процесу, що також може бути причиною зрушень у всмоктувальній функції кишечника [7].

Не дивлячись на величезну кількість клінічних описових даних щодо проявів ААД, механізми впливу антибіотиків на транспортну функцію епітелію товстої кишки дослідженні недостатньо [8]. Цефтріаксон, належить до III покоління антибіотиків ряду цефалоспоринів і є найбільш вживаним серед інших груп антибіотиків [9]. Встановлено, що антибіотики цефалоспоринового ряду викликають зниження рівня глутатіону та підвищення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканині печінки [10], зумовлюють дизбіоз, асоційований зі змінами антиген-перезентувальної функції дендритних клітин кишечника та продукції ними інтерлейкінів-10 та -12 [7]. В 4-9% випадків, прийом цефалоспоринів викликає розвиток ААД не з'ясованої етіології. Врахо-

вуючи вищенаведене, ми припустили, що розвиток діареї за умов прийому антибіотиків цефалоспоринового ряду пов'язаний зі змінами у всмоктувальній функції слизової оболонки товстої кишки, тому метою даної роботи було дослідити вплив антибіотику цефтріаксону на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів, в залежності від терміну введення та дози препарату.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проводили на білих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г, n=63. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря. Експерименти проведені згідно етичним принципам, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародним угодам та національному законодавству у цій галузі [11]. Контролем слугували щури, яким упродовж 5-ти чи 14-ти діб одноразово вводили 0,1 мл дистильованої води, внутрішньом'язово. Дослідні групи щурів, отримували внутрішньом'язово цефтріаксон (Артеріум, БАТ "Київмедпрепарат" Україна) в дозах 50 мг/кг чи 300 мг/кг, один раз на добу впродовж 5-ти чи 14-ти діб. Відповідно на 6-тий та 15- день після початку експерименту (першим днем експерименту вважали день початку введення антибіотику) проводили визначення сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки методом перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ* (Табл. 1).

Моніторинг клінічних параметрів стану щурів, які визначали за масою тіла, млявістю (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), діаресю (визначали за м'якістю стільця), оцінювали щоденно.

Таблиця 1. Схема дослідів

№ групи	дН ₂ O		Цефтріаксон (50 мг/кг)		Цефтріаксон (300 мг/кг)		Дослідження транспорту води	
	5 діб	14 діб	5 діб	14 діб	5 діб	14 діб	6-й день	15-й день
1	+						+	
2			+				+	
3					+		+	
4		+						+
5				+				+
6						+		+

Сумарний транспорт води через епітелій товстої кишки щурів досліджували методом перфузії ізольованої ділянки товстої кишки *in situ*. Тварин наркотизували уретаном (Sigma Chemical Co., США), з розрахунку 1,15 г/кг (внутрішньоочеревинно). Сталу температуру тіла щурів (37°C) підтримували за допомогою грілки. Для попередження респіраторної недостатності виконували трахеотомію. Після цього відкривали черевну порожнину (лапаротомія), підтягували товсту кишку, накладали лігатури на межі переходу сліпої кишки в висхідну частину ободової кишки та робили надріз кишки і вводили привідний катетер для подачі перфузійного розчину. Через 8-10 см дистальніше першої лігатури, накладали другу лігатуру і робили надріз кишки. Сегмент товстої кишки промивали теплим фізіологічним розчином та вводили вивідний катетер, з якого збирали відтікаючий (аспірований) розчин, після чого закривали черевну порожнину [12]. Привідний катетер під'єднували до перистальтичного насосу (Minipuls 3, Gilson®), який подавав перфузійний розчин (37°C) з постійною швидкістю 0,18-0,2 мл/хв. В якості перфузійного розчину використовували модифікований ізотонічний (фізіологічний) розчин Кребса-Хенселейта, (ммоль/л): NaCl – 117; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 24,8; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2;

NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 5,5; pH=7,4, до якого додавали неабсорбований маркер феноловий червоний (20 мг/л).

Після 60-хвилинної перфузії (еквілібраційний період), відтікаючий розчин збирали впродовж 180 хв, через кожні 20 хв. Дані, отримані за кожний період, усереднювали. В кінці експерименту щурів умертвляли шляхом введення летальної дози наркозу. Сегмент кишки, що перфузувався, швидко видаляли, розрізали його в поздовжньому напрямку, обережно підсушували фільтрувальним папером та висушували в термостаті при 60°C, 20 годин, для отримання сухої маси в грамах, для розрахунку сумарного транспорту води. Концентрацію іонів Cl⁻ вимірювали за допомогою хлор-селективного електроду (іономір ЄВ-74).

Сумарний потік іону Cl⁻ розраховують за формулою [13]:

$$J_{\text{net ion}} = \frac{v \cdot (S\varphi - S\alpha)}{W} \cdot \frac{C\varphi}{C\alpha}$$

υ – швидкість подачі перфузату (мл/хв.); Sφ – концентрація фенолового червоного в перфузійному розчині; Sα – концентрація фенолового червоного в аспірованому розчині; Sφ – концентрація іона в перфузійному розчині (ммоль/л); Sα – концентрація іона в аспірованому розчині (ммоль/л); W – вага сегменту кишки (г).

Для розрахунку сумарного потоку води (J_{net}), визначали рівень неабсорбованого маркера, фенолового червоного шляхом колориметричного аналізу, при трьох довжинах хвиль $\lambda=520$ нм, $\lambda=560$ нм та $\lambda=600$ нм (спектрофотометр Synergy HT BioTek) для визначення поправки на неспецифічну абсорбцію (PRC) [13]. Перед визначенням величини екстинції перфузійного та аспірованого розчинів до них додавали краплину аміаку – для створення лужного середовища рН 9,5-10 та досягнення максимальної інтенсивності забарвлення фенолового червоного.

Сумарний потік води вираховували за формулою [13]:

$$J_{\text{net води}} = \frac{v \cdot \left(1 - \frac{C_n}{C_a}\right)}{W}$$

$J_{\text{net води}}$ – сумарний потік води (мкл/хв·г); v – швидкість подачі перфузату (мл/хв); C_n – концентрація фенолового червоного в перфузійному розчині; C_a – концентрація фенолового червоного в аспірованому розчині; W – вага сегменту кишки (г).

Позитивні значення є свідченням про всмоктування води, а негативні – її секрецію.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Statistica 6.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для порівняння вибірок даних сумарних потоків води та електролітів використовували непараметричний метод – ранговий критерій груп U-тест Мана-Вітні. За умов нормального розподілу вибірок використовували t тест Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для визначення адекватності, досліджуваної нами моделі клінічної картини протікання ААД, проведено моніторинг динаміки змін стану щурів на фоні антибіотикотерапії. Як показано на рис. 1, цефтріаксон, в дозі 50 мг/кг/добу, викликав появу м'якого стільця у 10 % тварин вже на 5 добу після початку введення, цей показник залишався без змін до кінця досліджуваного періоду. Збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг/добу, асоціювалося з появою м'якого стільця у 5 % тварин вже на 2-гу добу експерименту. На 3-тю добу кількість тварин з діареєю сягало 15%, до кінця досліджуваного періоду цей показник в середньому дорівнював 25-30%.

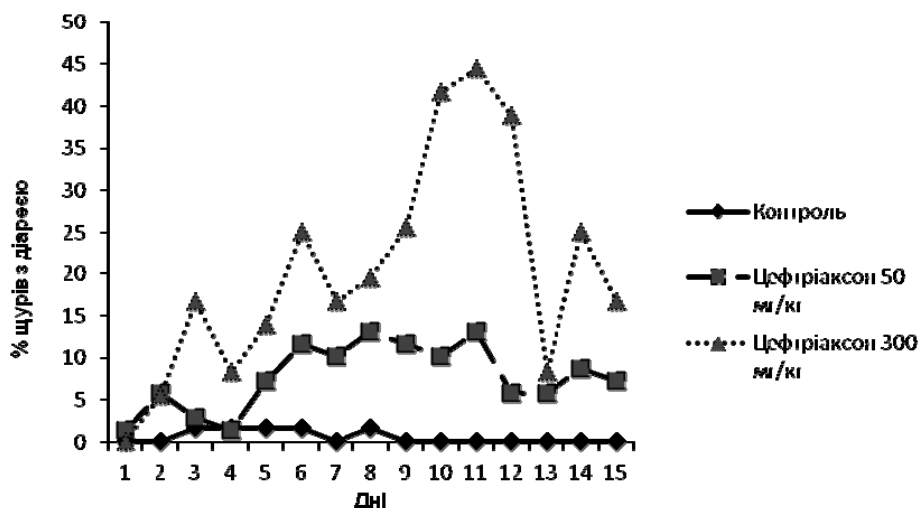


Рис. 1. Розвиток діареї у контрольній групі щурів (n=30) та на фоні 14-ти добового введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг в.м. (n=17) та 300 мг/кг в.м. (n=16)

5-ти та 14-ти добове введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг та 300 мг/кг не спричиняло значних змін у масі тіла щурів, що в принципі може бути пояснене незначною інтенсивністю діареї, яка проявлялась у більшості тварин м'яким стільцем. Отже, запропонована модель є клінічно-адекватною і може бути використана для вивчення механізмів ААД.

В результаті проведених нами досліджень показано, що 5-ти добове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг призводило до статистично вірогідного зменшення всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів з $36,76 \pm 27,73$ до $19,30 \pm 20,70$ мкл/хв·г (на 52 %, $p < 0,001$). Підвищення дози антибіотику (300 мг/кг) не призводило до поглиблення змін у рівні сумарного транспорту води у порівнянні з дозою 50 мг/кг (рис. 2).

Частим випадком в клінічній практиці при лікуванні важких інфекційних захворювань, наприклад при менінгіті [14], збільшується тривалість курсу антибіотикотерапії з 5 до 14 днів. В наших дослідженнях введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 14 днів зумовлювало зменшення рівня всмоктування води на 61% ($p < 0,001$), тоді як, після 5-ти добового курсу – на 51% (рис. 3).

Цікаво, що введення цефтріаксону в дозі 300 мг/кг впродовж 14 днів не викликало статистично вірогідних змін у показниках сумарного транспорту води, хоча відсоток тварин з діареєю значно підвищувався зі збільшенням тривалості курсу цефтріаксону (рис. 1). Для пояснення даного феномену ми висунули припущення, що збільшення тривалості антибіотикотерапії в високій дозі, значно зрушує нормобіотний гомеостаз кишечника і відповідно сприяє порушенню слизового бар'єру. Це в свою чергу, викликає захисну реакцію у вигляді підвищення секреції слизу в просвіт кишки. Враховуючи методологію вимірювання всмоктування води, а саме, використання фенолового червоного як неабсорбованого маркера, який за своїми властивостями набуває більш інтенсивного забарвлення при підвищенні рН, активна секреція слизу може спотворювати показники екстинції за якими визначаємо транспорт води.

Відомо, що підвищення секреції іонів хлору є рушійною силою секреції рідини в просвіт кишечника, як реакція на контакт епітелію з бактеріальною флорою [15, 16]. Крім того, секреція аніонів (в тому числі іонів хлору) сприяє підвищенню продукції слизу келихоподібними клітинами кишечника, утворюючи додатковий захисний

бар'єр [17]. Отже, рівень сумарного транспорту іонів хлору є надійним маркером функціонування всмоктувального апарату товстої кишки. Враховуючи ці дані, ми перевірили рівень сумарного транспорту іонів хлору в контрольній групі щурів, та групі, що отримувала цефтріаксон в дозі 300 мг/кг упродовж 14 днів. Встановлено,

що за нормальних умов сумарний транспорт іонів хлору має про-абсорбтивний характер і дорівнює $24,17 \pm 17,29$ ммоль/хв·г. Введення цефтріаксону призводило до реверсії абсорбції на секрецію іонів хлору, так сумарний транспорт становив $-1,05 \pm 15,62$ ммоль/хв·г, що служить на користь запропонованого нами припущення.

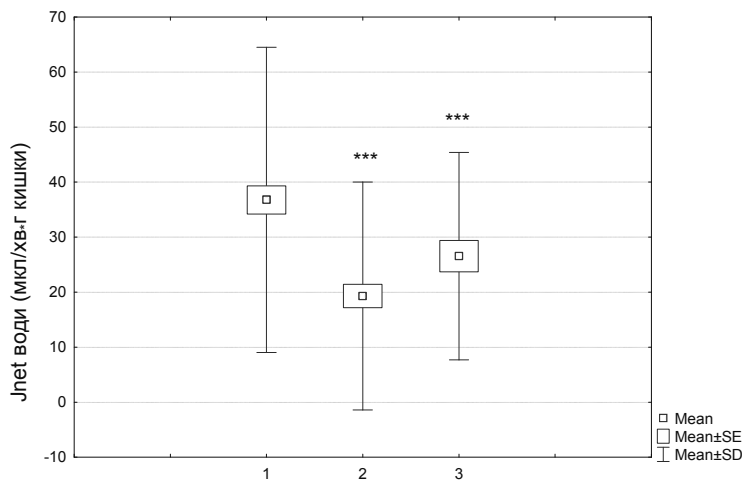


Рис. 2. Вплив 5-ти добового введення цефтріаксону у дозах 50 мг/кг (2) (n=14) та 300 мг/кг, в.м. (3) (n=7) на сумарний потік води через епітелій товстої кишки щурів порівняно з контролем (1), (M±m)

*** – $p < 0,001$ відносно показників в контрольній групі

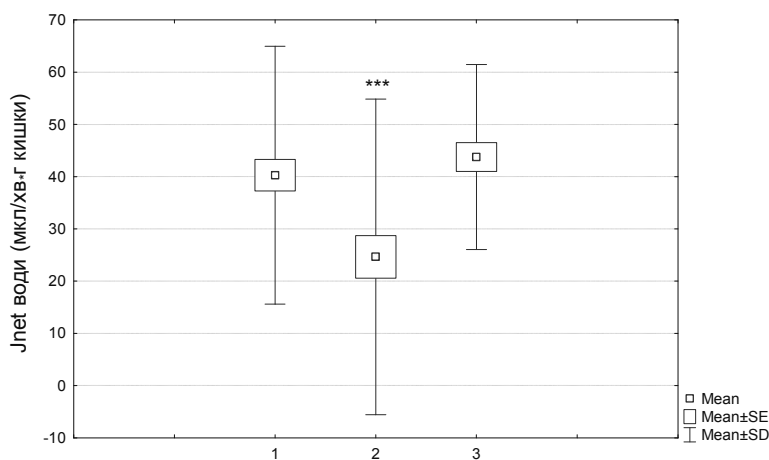


Рис. 3. Вплив 14-ти добового введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг, в.м. (2) (n=7) та 300 мг/кг, в.м. (3) (n=7) на сумарний потік води через епітелій товстої кишки щурів порівняно з контролем (1) (n=9), (M±m)

*** – $p < 0,001$ відносно показників в контрольній групі

Регуляція транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки здійснюється ентеральною нервовою системою, яка реагує на стимули, що надходять із просвіту кишечника [18]. Тому зміни у складі мікрофлори, і особливо, її метаболічній активності можуть призводити до зрушень у всмоктувальній функції. Важливою ланкою нормальної всмоктувальної функції товстої кишки є коротко-ланцюгові жирні кислоти (КЛЖК – масляна, пропіонова, оцтова та ін.), що утворюються при ферментації харчових волокон, та є одними із основних продуктів життєдіяльності нормальної мікрофлори товстої кишки (біфідобактерій, бактероїдів та ін.). Слід зауважити, що всмоктування КЛЖК колоніцитами пригнічує базальну та цАМФ-залежну секрецію хлору через CFTR канали, тим самим сприяючи пере-

важанню всмоктування над секрецією [19]. Отже, кількісні та функціональні зміни нормобіоти кишечника на фоні антибіотикотерапії [20, 21], можуть впливати на всмоктувальну функцію товстої кишки через КЛЖК.

Крім того, викликаний антибіотиками зсув у складі кишкової мікрофлори може спричинювати розвиток прозапальних змін в слизовій оболонці кишечника [22], які скоріш за все пов'язані з активацією тучних клітин кишечника і вивільненням про-секреторного медіатора гістаміну. Гістамін, в свою чергу стимулює секрецію води [23], що є захисним механізмом у попередженні контакту просвітної мікрофлори з епітеліальними клітинами кишечника, а також колонізації пристінкового шару слизу умовно-патогенними бактеріями.

Також, неможна виключити прямого ефекту антибіотиків на функціонування транспортерів для іонів. Оліунок та спів. [24] показали дозо-залежне підвищення секреції хлору епітеліальними клітинами за умов інкубації з антибіотиком групи макролідів, азитроміцином. Цей ефект був пригнічений при ко-інкубуванні з блоатором CFTR каналів.

Висновки. 1. Цефтріаксон в дозі 50 мг/кг/добу, викликав діарею у 10% щурів, а в дозі 300 мг/кг/добу – у 25%. 2. Отриманий ефект був більш виразним після 14-ти денного курсу у порівнянні з 5-ти денним терміном введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг/добу. 3. Встановлено, що розвиток діареї на фоні антибіотикотерапії цефтріаксоном, обумовлений зменшенням всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів.

Список використаних джерел

1. Костюкевич О. І. Антибіотикикоассоциированная диарея: мифы и реальность / О. И. Костюкевич // Рус. мед. журн. – 2009. – № 7. – С. 459–463.
2. Костюкевич И. О. Антибиотикоассоциированная диарея: мифы и реальность / О. И. Костюкевич // Гастроэнтерология. Конспект лекций. – 2010. – № 18. – С. 56–57.
3. Kunzelmann K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease / K. Kunzelmann, M. Malf // Physiological Reviews. – 2002. – Vol. 82. – P. 245–289.
4. Takata K. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane / K. Takata, T. Matsuzaki, Y. Tajika // Prog. Histochem. Cytochem. – 2004. – Vol. 39, № 1. – P. 1–83.
5. Mauricio A. C. Deoxycholic acid (DOC) affects the transport properties of distal colon / A. C. Mauricio, M. Slawik, D. Heitzmann [et al] // Pflugers Arch. – 2000. – Vol. 439, № 5. – P. 532–540.
6. Vidyasagar S. Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon / S. Vidyasagar, B. S. Ramakrishna // The Journal of Physiology. – 2002. – Vol. 539, № 1. – P. 163–173.
7. Li M. Effects of ceftriaxone-induced intestinal dysbacteriosis on dendritic cells of small intestine in mice / M. Li, W. Li, S. Wen [et al] // Microbiol Immunol. – 2013. – Vol. 57, № 8. – P. 561–568.
8. Equi A. C. Exploring the mechanisms of macrolides in cystic fibrosis / A. C. Equi, J. C. Davies, H. Paenter [et al] // Respir. Med. – 2006. – Vol. 100, № 4. – P. 687–697.
9. Vyhnanek F. Use of 3rd generation cephalosporins in antimicrobial prophylaxis in surgery / F. Vyhnanek, O. Lochmann // Rozhl Chir. – 1994. – Vol. 73, № 3. – P. 129–132.
10. Cojocel C. Protection against cephalosporin-induced lipid peroxidation and nephrotoxicity by (+)-cyanidanol-3 and vitamin E

/ C. Cojocel, K. L. Tolle, H. El-Hajj [et al] // Braz J Med Biol Res. – 2007. – Vol. 40, № 6. – P. 867–875.

11. Перший національний конгрес з біоетики // Еженедельник АПТЕКА. – 2001. – № 308 (37).

12. Sladen G. E. Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo / G. E. Sladen, J. T. Harries // Biochem Biophys Acta. – 1972. – Vol. 288, № 2. – P. 443–456.

13. Schedl H. P. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man / H. P. Schedl, D. White // Gut. – 1966. – Vol. 7, № 2. – P. 159–163.

14. Amelieke J. H. Effect of antibiotic streamlining on patient outcome in pneumococcal bacteraemia / Amelieke J. H. Cremers, T. Sprong, Jeroen A. Schouten [et al] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2014. – Apr 11. [Epub ahead of print].

15. De Lisle R.C. Lubiprostone ameliorates the cystic fibrosis mouse intestinal phenotype / R. C. de Lisle, R. Mueller, E. Roach // BMC Gastroenterol. – 2010. – 10. – P. 107.

16. Bekkali N. The role of rectal chloride secretion in childhood constipation / N. Bekkali, H. R. de Jonge, R. M. van den Wijngaard [et al] // Neurogastroenterol Motil. – 2011. – Vol. 23, № 11. – P. 1007–1012.

17. Gustafsson J. K. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype / J. K. Gustafsson, A. Ermund, D. Ambort, [et al] // Journal of Experimental Medicine. – 2012. – Vol. 209, № 7. – P. 1263–1272.

18. Bertrand P. P. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa / P. P. Bertrand, W. A. Kunze, J. C. Bornstein [et al] // Journal of Physiology. – 1997. – Vol. 273, № 2. – P. 422–435.

19. Vidyasagar S. Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃ secretion / S. Vidyasagar, C. Barmeyer, J. Geibel et al. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2005. – Vol. 288, № 6. – P. 1217–1226.

20. Boirivant M. Intestinal microflora and immunoregulation / M. Boirivant, A. Amendola, A. Butera // Mucosal Immunol. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 47.

21. Eckburg P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein et al. // Science. – 2005. – Vol. 308, № 5728. – P. 1635–1638.

22. Boirivant M. Inflammatory bowel disease / M. Boirivant, A. Cossu // Journal Oral Diseases. – 2012. – Vol. 18, № 1. – P. 1–15.

23. Schultheiss G. Histamine-induced ion secretion across rat distal colon: involvement of histamine H₁ and H₂ receptors / G. Schultheiss, B. Hennig, W. Schunack [et al] // European Journal Pharmacology. – 2006. – Vol. 546, № 1–3. – P. 161–170.

24. Oliynyk I. Azithromycin increases chloride efflux from cystic fibrosis airway epithelial cells / I. Oliynyk, G. Varelogianni, M. Schalling et al. // Experimental lung research. – 2009. – Vol. 35, № 3. – P. 210–221.

Надійшла до редколегії 17.06.14

Т. Довбинчук, асп., Т. Береговая, д-р биол. наук, А. Толстанов, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Л. Закордонетс, канд. мед. наук
Национальный медицинский университет им. О.О. Богомольца, Киев, Украина

ТРАНСПОРТ ВОДЫ ЧЕРЕЗ ЭПИТЕЛИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ АНТИБИОТИКА ЦЕФТРИАКСОНА

Исследовано влияние антибиотика цефтриаксона на транспорт воды через эпителий толстой кишки крыс, в зависимости от срока введения и дозы препарата, при использовании метода перфузии изолированного участка кишки *in situ*. В дозе 50 мг/кг/сут, цефтриаксон вызывал диарею у 10% крыс, а в дозе 300 мг/кг/сут – у 25%. Цефтриаксон, в обеих дозах, приводил к уменьшению абсорбции воды через эпителий толстой кишки крыс. Полученный эффект был более выраженным после 14-ти дневного курса по сравнению с 5-ти дневным.

Ключевые слова: толстая кишка, цефтриаксон, диарея.

T. Dovbynchuk, PhD student., T. Beregova, DSc., G. Tolstanova, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Zakordonets, PhD, MD
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

NET WATER TRANSPORT IN RAT COLONIC EPITHELIUM DURING CEFTRIAXONE THERAPY

The dose and time-dependent effect of the antibiotic ceftriaxone on net water transport in rat colonic epithelium was studied by colon loop perfusion technique *in situ*. Ceftriaxone in dose 50 mg / kg / day caused diarrhea in 10% of rats, in dose 300 mg/kg/day – 25% of rats. Ceftriaxone in both doses decreased net water absorption in rat colon. The resulting effect was more pronounced after 14-days course compared with 5-days.

Keywords: colon, ceftriaxone, diarrhea.

УДК: 636.92:577.1 15.3.614.876

С. Костюк, канд. біол. наук
НДІ фізіології та екоімунології тварин і птиці
Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології
імені С.З. Гжицького, Львів,
О. Бусенко, проф.
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ ШКІРИ КРОЛІВ

Встановлено, що гамма-опромінення призводить до вірогідного зниження в шкірі кролів вмісту жирних кислот таких як міристинова пантадеканова, пальмітинова, пальмітоолеїнова, лінолева, ліноленова, арахідонова, а на кінець досліджу, тобто на 76-ту добу, концентрація кислот підвищувалася, а таких жирних кислот, як міристинова і пальмітоолеїнова наблизилася до фізіологічної норми.

Ключові слова: гамма-радіація, кролі, жирні кислоти, шкіра, піридоксин.

Вступ. Вивчення характеру біологічної дії різних доз опромінення на живий організм, діагностика захворювання та профілактика опромінення залишається актуальним і на сьогоднішній день, особливо, коли існує загроза опромінення при різних аварійних ситуаціях на численних атомних електростанціях України. Ефективне використання тварин в умовах інтенсифікації тваринництва вимагає глибокого розуміння особливостей фізіологічних процесів у тварин і птиці, а також змін, які виникають в організмі під впливом різноманітних факторів зовнішнього середовища, серед яких зустрічається іонізуюча радіація. Через інтенсивне випробування ядерної енергетики, виникненням аварій на атомних електростанціях стають нові завдання вивчення особливостей дії іонізуючого випромінювання на живий організм і пошук речовин, які зменшували б шкідливий вплив іонізуючої радіації на живий організм і серед них суттєву роль як радіопротектора відіграє піридоксин гідрохлорид (вітамін В₆) [2,9]. Для фізіологічного функціонування систем організму тварини потребують постійного надходження з кормом незамінних поліненасичених жирних кислот, особливо – лінолевої і ліноленової, які не синтезуються в їхньому організмі [1,4]. Жирні кислоти виконують цілий ряд життєво важливих функцій і забезпечують процеси росту, розвитку й розмноження. Таке важливе значення цих сполук для організму тварин зумовлене їх високою енергетичною цінністю та багатограним впливом на основний обмін і тканинний метаболізм [1,2,4]. Вітамін В₆ (піридоксин), у тваринних тканинах (піридоксаль і піридоксдоксамін) розчинний у воді. У тканинах піддається фосфорилуванню і перетворюється в коензими багаточисленних ферментних систем. З останніх особливо важливе значення мають ферменти каталізуючої реакції переамінування і декарбоксілювання амінокислот.

Метою і завданням роботи було дослідити вплив гамма-радіації на жирнокислотний вміст загальних ліпідів шкіри кролів на тлі дії піридоксин гідрохлориду, як радіопротектора.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили в НДІ фізіології і екоімунології тварин і птиці ЛНУВМ та БТ імені С. З. Гжицького на кролях породи Білий велетень віком 5 місяців і масою тіла 3-3,5 кг. Тварин опромінювали рентгенівськими променями DL = 50, яка становила 1000 рентген (V – 190 kV, A – 20 mA), фокусна відстань – 62 см, потужність – 20 P / хв. З метою фільтрації м'яких променів застосовувалися

алюмінієвий і мідний фільтри (Cu – 0,5, Al – 1 мм). Опромінення було тотальним і одномоментним. Забій кролів проводили в кінці досліджу, зразки шкіри брали для визначення жирнокислотного складу загальних ліпідів [3], які визначали на жирнокислотному хроматографі Хром-4. Для обробки отриманого цифрового матеріалу застосовувались стандартні методи математичної статистики, визначаючи середнє арифметичне (M), його похибку (m), рівень вірогідності (p), з використанням t-критеріїв Стюдента та таблиць комп'ютера Microsoft Excel. Зміни показників вважали вірогідними за p<0.05 [5].

Результати дослідження. Дані таблиці свідчать про те, що променева радіація призвела до зменшення концентрації більшості жирних кислот в шкірі тварин. Концентрація міристинової кислоти під впливом гамма-опромінення зменшилася і до вихідної величини не повернулася. Так, якщо в нормі концентрація міристинової кислоти до опромінення становила $0,80 \pm 0,026$ ммоль/л, то після опромінення зменшилася на 12,%. У наступному концентрація міристинової кислоти дещо зростала і становила на п'яту добу $0,72 \pm 0,03$ ммоль/л, на 15-ту добу – $0,74 \pm 0,046$ ммоль/л, на 36-ту добу – $0,75 \pm 0,018$ ммоль/л і на 76-ту добу зросла до $0,78 \pm 0,031$ ммоль/л. Концентрація пантадеканової до опромінення становила $0,9 \pm 0,03$ ммоль/л, після опромінення зменшилася на 22,3% (p<0,05), пальмітинової відповідно $13,64 \pm 0,01$ ммоль/л – на 23,4% (p<0,01), пальмітоолеїнової $2,25 \pm 0,08$ ммоль/л зменшилася на 22,3% (p<0,01), олеїнової $36,08 \pm 1,16$ ммоль/л зменшилася на 6%, (p>0,05), лінолевої $33,68 \pm 0,69$ ммоль/л – на 33,2% (p<0,001), ліноленової $8,65 \pm 0,26$ на 36% (p<0,01) ммоль/л, арахінової $0,65 \pm 0,03$ ммоль/л на 7,8% (p>0,05), арахідонової до опромінення становила $2,86 \pm 0,026$ ммоль/л, після опромінення зменшилася на 76,3% (p<0,001). Аналогічний результат отримано в концентрації пантадеканової ки, пальмітинової, пальмітоолеїнової та ліноленової кислот шкіри кролів. Так, концентрація пантодеканової кислоти ліпідів шкіри кролів до опромінення становила $0,90 \pm 0,03$ ммоль/л, після опромінення вірогідно зменшилася на 22,7%, на п'яту добу вірогідно зменшилася до $0,60 \pm 0,05$ ммоль/л, на 15-ту добу зросла до $0,80 \pm 0,02$ ммоль/л, на 36-ту добу зменшилася до $0,70 \pm 0,01$ ммоль/л і так залишалася до кінця дослідження.

Таблиця. Жирнокислотний склад ліпідів шкіри кролів, М±m, ммоль/л

Кислота та її код	Групи	Доби дослідів					
		норма	Після опром.	П'ята	15-та	36-та	76-та
Лауринова C12:0	К	0,26±0,01	0,24±0,03	0,22±0,02	0,25±0,03	0,26±0,06	0,24±0,01
	Д	0,28±0,06	0,25±0,04	0,26±0,02	0,27±0,02	0,26±0,04	0,27±0,07
Міристинова C14:0	К	0,80±0,02	0,70±0,04	0,72±0,03	0,74±0,04	0,75±0,01	0,78±0,03
	Д	0,78±0,04	0,70±0,03	0,75±0,03	0,78±0,04	0,76±0,02	0,77±0,04
Пантадеканова C15:0	К	0,9±0,03	0,7±0,01*	0,6±0,05*	0,8±0,02	0,7±0,01	0,7±0,04
	Д	0,7±0,05	0,6±0,02	0,5±0,03	0,6±0,02	0,6±0,06	0,7±0,01
Пальмітинова C16:0	К	13,64±0,01	10,46±0,01**	11,26±0,01	10,42±0,01**	11,60±0,01	12,82±0,01
	Д	11,40±0,01	8,28±0,01*	7,60±0,01	14,48±0,01**	13,00±0,01*	14,88±0,01*
Пальмітоолеїнова C16:1	К	2,05±0,06	1,55±0,02**	1,65±0,04	1,75±0,03	1,88±0,07	2,0±0,02
	Д	2,25±0,08	1,75±0,04*	1,86±0,06*	1,85±0,01	1,88±0,05	2,10±0,05
Стеаринова C18:0	К	5,44±0,06	5,64±0,03	5,72±0,02	5,68±0,07	5,50±0,05	5,48±0,02
	Д	5,44±0,06	5,64±0,03	5,72±0,02	7,68±0,07*	7,50±0,05*	6,48±0,02*
Олеїнова C18:1	К	36,08±1,16	34,08±1,23*	37,28±1,25	36,18±1,32	34,81±1,41*	35,03±1,35
	Д	34,18±1,22	35,82±1,16	33,18±1,65	35,85±1,22	36,15±1,21	35,33±1,25
Лінолева C18:2	К	33,68±0,69	23,18±0,35***	24,82±0,49	26,81±0,28	28,88±0,40	30,80±0,52
	Д	30,80±0,31	20,55±0,55**	28,20±0,70	29,10±0,40*	30,08±0,60*	33,00±0,32*
Ліноленова C18:3	К	8,65±0,26	5,58±0,28*	6,52±0,30	7,55±0,36	6,60±0,50	7,60±0,40
	Д	6,54±0,31	5,98±0,41*	5,52±0,36*	6,00±0,24	6,20±0,30	6,60±0,12
Арахідова C20:0	К	0,65±0,03	0,60±0,04*	0,55±0,02*	0,60±0,06	0,61±0,06	0,63±0,04
	Д	0,80±0,01	0,63±0,02	0,65±0,06	0,68±0,04	0,69±0,03	0,73±0,03
Арахідонова C20:4	К	2,86±0,02	0,68±0,01**	0,88±0,06	1,60±0,07**	1,80±0,05**	2,06±0,05***
	Д	2,96±0,06	1,88±0,01	1,98±0,03	2,00±0,07*	2,36±0,02**	2,56±0,02*
Бегемова C22:0	К	0,56±0,01	0,86±0,03	0,90±0,02	0,68±0,04	0,60±0,04	0,64±0,03
	Д	0,73±0,03	0,80±0,02	0,85±0,04	0,82±0,03	0,80±0,02	0,74±0,01

Примітка: 1. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з тваринами контрольної групи; 2. К – контрольна група; Д – дослідна група

Концентрація пальмітинової кислоти в нормі становила $13,64 \pm 0,01$ ммоль/л, після опромінення зменшилася на 24,4% і приблизно на такий величині утримувалася до кінця дослідів (на п'яту добу – $11,26 \pm 0,01$ ммоль/л, на 15-ту добу – $10,42 \pm 0,01$ ммоль/л, на 36-ту добу – $11,60 \pm 0,015$ ммоль/л і на 76-ту добу – $12,82 \pm 0,01$ ммоль/л, що на 5,8% менше норми).

Концентрація пальмітоолеїнової кислоти в нормі становила $2,05 \pm 0,05$ ммоль/л, після опромінення зменшилася на 25%, а в наступному концентрації пальмітоолеїнової кислоти ліпідів шкіри кролів збільшувалася і на п'яту добу становила $1,65 \pm 0,04$ ммоль/л, на 15-ту добу – $1,75 \pm 0,03$ ммоль/л, на 36-ту – $1,88 \pm 0,07$ ммоль/л і на 76-ту добу концентрація пальмітоолеїнової кислоти повернулася до норми і становила $2,0 \pm 0,02$ ммоль/л (норма $2,05 \pm 0,05$ ммоль/л). Гамма-опромінення викликало зменшення концентрації ліноленової кислоти ліпідів шкіри кролів. Так, якщо до опромінення концентрація ліноленової кислоти шкіри кролів становила $8,65 \pm 0,26$ ммоль/л, то після опромінення вірогідно зменшилася на 35%. У послідовному концентрація ліноленової кислоти зростала. На п'яту добу зросла до $6,52 \pm 0,30$ ммоль/л, на 15-ту – до $7,55 \pm 0,36$ ммоль/л, на 36-ту знову зменшилася до $6,60 \pm 0,50$ ммоль/л і на 76-ту зросла до $7,60 \pm 0,40$ ммоль/л і становила на 22,2% менше норми. Слід зазначити, що вірогідна різниця концентрації пальмітинової, стеаринової, ліноленової та арахідонової жирних кислот встановлено після 15-тої доби дослідження. При обговоренні отриманих результатів слід відмітити, що гамма-радіація викликала збільшення концентрації бегемової кислоти у шкірі кролів. Слід відмітити, що протягом усього дослідів концентрація її була вищою порівняно до норми, а меристинової і пальмітоолеїнової наближалася до фізіологічної норми. Концентрація арахідонової кислоти в шкірі кролів була вірогідно вищою у тварин дослідної групи, а відомо, що арахідонова кислота бере активну участь в процесі роботи серця, особливо в процесі відкривання неселективних мегаканалів або мітохондріальних пор [6,7]. Отримані результати підтверджуються кращою електрокардіограмою в дослідній групі кролів при застосуванні піридоксину як радіопротектора, що

вказує про взаємозв'язок вмісту концентрації жирних кислот шкіри кролів з станом роботи серця.

Висновки

1. В основному гамма- опромінення призводило до зменшення вмісту жирних кислот у шкірі кролів, що вказує на зменшення енергетичних запасів в організмі тварин.

2. Концентрація міристинової, пантадеканової, пальмітинової, пальмітоолеїнової, ліноленової, арахідонової кислот у шкірі кролів під впливом гамма-опромінення вірогідно зменшилася, але до кінця дослідження на 76-ту добу практично поверталася до норми.

3. Концентрація ненасичених жирних кислот шкіри кролів у дослідній групі впродовж усього дослідів була невірогідно більшою, порівняно з контрольною.

4. Застосування піридоксину як радіопротектора позитивно вплинуло на зниження негативної дії гамма-опромінення на концентрацію більшості жирних кислот шкіри кролів.

Список використаних джерел

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс, 2006. – 462 с.
2. Білошицький П. В. Радіаційне пошкодження організму та їх корекція в умовах висотних метеорологічних факторів. / П. В. Білошицький, О. М. Ключко, Ю. М. Оночук // Вісник НАУ. – 2010. – № 10. – С. 224–231.
3. Ривис И. Ф. Количественный метод определения некоторых высокомолекулярных жирных кислот в биологическом материале / И. Ф. Ривис, И. В. Скороход, А. Б. Пидлужный // Докл. ВАСХНИЛ. – 1985. – № 8. – С. 33–35.
4. Чумаченко В. Ю. Довідник по застосуванню біологічно активних речовин у тваринництві / В. Ю. Чумаченко, С. В. Стояновський, П. З. Лагодюк [та ін.]. – К. : Урожай, 1989. – 264 с.
5. Плохинський Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинський. – М. : Колос, 1969. – 256 с.
6. Янович В. Г. Физиологические и биохимические основы использования жиров в кормлении жвачных / В. Г. Янович // Сельское хозяйство за рубежом. – 1981. – № 1. – С. 35–57.
7. Ярмоненко С. П. Причина межвидовых различий радиационно-генетических эффектов низких уровней облучения / С. П. Ярмоненко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46, № 5. – С. 605–610.
8. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores closed during cardiocirculatory arrest after open heart bypass / E. Griffiths, A. Halestrap // Biochem. J. – 1995. – Vol. 288. – P. 93–98.
9. Hygo Aebi. Action of vitamin on enzymes / Hygo Aebi // Trends pharm. Sci. – 1982. – Vol. 3, № 4. – P. 150–158.

Надійшла до редколегії 29.10.14

С. Костюк, канд. биол. наук

НДИ физиологии и экоиimmunологии животных и птицы

Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологии имени С.З. Гжицкого, Львов, Украина,

А. Бусенко, проф.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩИХ ЛИПИДОВ КОЖИ КРОЛИКОВ

Установлено, что гамма-излучение приводит к достоверному снижению у шкуры кролей содержания таких жирных кислот, как меристиновая, пантадекановая, пальмитиновая, пальмитоолеиновая, линолевая, арахидоновая, а под конец исследований, то есть на 76-тые сутки, концентрация жирных кислот повышалась, а меристиновой и пальмитоолеиновой приближалась к физиологической норме.

Ключевые слова: гамма-радиация, кроли, жирные кислоты, шкура, пиридоксин

S. Kostyuk, Phd

Institute of Shysiology and Animal ekoimmunology LUWM and BT S.Z. Hzhyskoho, Lviv, Ukraine,

A. Busenko, Prof

National University of Life Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF GAMMA IRRADIATION ON THE FATTY ACID COMPOSITION OF TOTAL LIPIDS RABBIT SKIN

It is found that gamma radiation leads to a significant decrease in the skin of rabbits content of these fatty acids, as meristic, pantadecanovaya, palmitic, palmitoleic, linoleic, arachidonic, and at the end issledvany, ie 76 Tide day, the concentration of fatty acids increased, and meristic palmitoleic and close to the physiological norm.

Key words: gamma-radiation, rabbits, lipids acids, skin, piridoxyn.

UDK 54.057:547.567:615.273

Т. Галенова, канд. биол. наук, І. Ніколаєва, студ.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

Х. Болібрех, асп., С. Половкович, канд. хім. наук, В. Новіков, д-р хім. наук

Національний університет "Львівська політехніка", Львів

ВПЛИВ НОВОГО ТІОСУЛЬФОНАТНОГО ПОХІДНОГО ХІНОНУ НА АДФ-ІНДУКОВАНУ АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ

Авторами виявлено, що S-((1,4-диметокси-9,10-діоксо-9,10-дигідроантрацен-2-іл)метил)-4-амінобензенсульфонотіоат володіє антитромбоцитарною активністю. Для з'ясування механізму його антиагрегаційної дії, провели серію додаткових експериментів. Було встановлено, що сполука інгібує АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. Інгібуючий ефект залежить від концентрації препарату та часу преінкубації. Похідне також виявляє дисагрегаційну дію щодо агрегатів тромбоцитів, попередньо сформованих внаслідок АДФ-стимуляції.

Ключові слова: збагачена тромбоцитами плазма, тіосульфонатні похідні хінону, АДФ-індукована агрегація тромбоцитів, антитромбоцитарні засоби.

Introduction. Platelet activation and aggregation play a crucial role in the maintenance of normal hemostasis [1, 2], but malfunction of these processes can lead to a loss of hemostatic equilibrium within the blood vessel resulting in the formation of occlusive platelet-rich thrombi, responsible for the manifestations of atherothrombotic disease [3-5]. Pharmacologic modification of platelet function reduces the risk for the development of thrombotic diseases and their complications [6, 7]. Ideally, a clinically useful, platelet-modifying drugs should be nontoxic, orally effective, has sustained action and good antithrombotic potency without excessive risk of abnormal bleeding. None of the clinically available agents satisfy sufficient all these requirements. Moreover, despite the proven benefits of current antiplatelet agents, morbidity and mortality rates for thrombotic disease are remaining at high level. Therefore, there is much room for further improvement of antiplatelet

treatment and development of novel antiplatelet agents with increased efficacy and safety profile.

Several studies have suggested that some quinone derivatives can significantly modify platelet functions [8, 9]. On the other hand, it was found that sulfur-rich compounds that contain R-SO₂-CH₂-S-S-R fragment are also known as the agents with antithrombotic activity [10]. Taking into account these observations, we have synthesized derivatives, containing quinoid system of bonds and thiosulfonate fragment in one molecule. At the result of screening the synthesized derivatives for their antiplatelet activity [results in print], a novel small molecule – S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl) 4-aminobenzenesulfonothioate (Fig. 1) – with high antiplatelet activity have been discovered. The studied compound at concentration of 100 μM had full inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation.

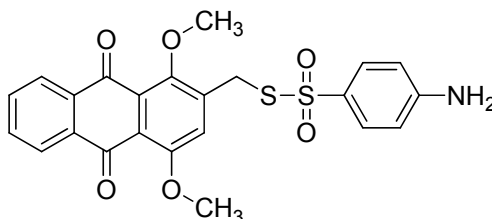


Fig. 1. Chemical structure of S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-aminobenzenesulfonothioate

The aim of the present study was to obtain more information about the effects of S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-

aminobenzenesulfonothioate on platelet aggregation function and mechanism of its action.

Materials and methods. Studied compound, S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl) 4-aminobenzenesulfonothioate, was synthesized at the Department of Technology of Biologically Active

Substances, Pharmacy and Biotechnology, of Lviv Polytechnic National University. The compound was synthesized according the scheme depicted in Figure 2.

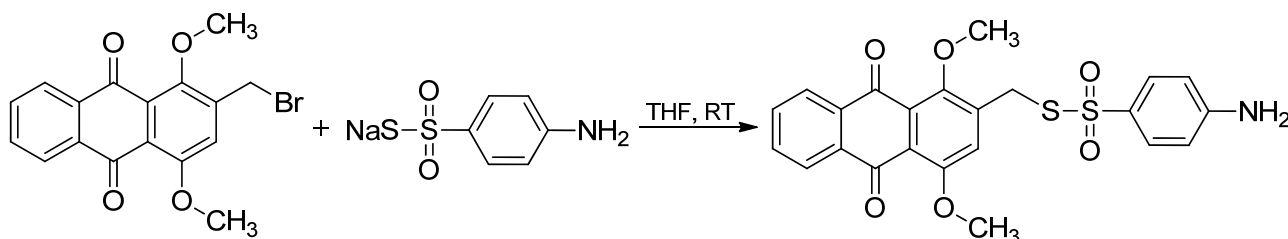


Fig.2. Synthesis of S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-aminobenzenesulfonothioate

Melting points were determined on a Büchi capillary melting point apparatus and are uncorrected. Element analyses were performed by the centre of Microanalyse of the Aix-Marseille University. Both ^1H and ^{13}C NMR spectra were determined on a Bruker AC 200 spectrometer. The ^1H the ^{13}C chemical shifts are reported from CDCl_3 peaks: ^1H (7.26 ppm) and ^{13}C (77.16 ppm) and from DMSO peaks: ^1H (2.50 ppm) and ^{13}C (39.52 ppm).

Silica gel 60 (Merck, particle size 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM) was used for column chromatography. TLC was performed on 5 cm $\times$ 10 cm aluminum plates coated with silica gel 60 F254 (Merck) in an appropriate solvent.

Procedure for synthesis of S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-amino-benzenesulfonothioate:

Into two-necked flask equipped with a nitrogen inlet was added solution of 2-(bromomethyl)-1,4-dimethoxyanthracene-9,10-dione (0.77 g, 2.13 mmol) in THF (10 ml) and dissolved in portion of THF (10 ml) sodium salt of 4-amino-benzenethiosulfonic acid (0.45 g, 2.13 mmol). The solution was stirred and maintained at room temperature for 5 hours. After this time, TLC analysis showed that compound 2 was totally consumed. The reaction mixture was treated with ice water and extracted 3 times with dichloromethane. The organic phase was washed with water, and then dried over anhydrous sodium sulfate. After evaporation, product was purified by silica gel chromatography and recrystallized from ethanol, gave corresponding S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-aminobenzenesulfonothioate.

S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-amino-benzenesulfonothioate:

Yellow precipitate, Mp. 215–217 °C, yield 30 %.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ , ppm: 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 4.35 (s, 2H, CH_2), 6.09 (s, 2H, NH_2), 6.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (s, 1H, Ar-H), 7.67 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.71–7.74 (m, 2H, Ar-H), 8.12–8.17 (m, 2H, Ar-H).

^{13}C -NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ , ppm: 34.5 (CH_2), 56.8 (OCH_3), 62.7 (OCH_3), 114.0 (2CH), 120.4 (CH), 125.4 (C), 126.4 (CH), 126.6 (CH), 127.1 (C), 129.6 (CH), 133.0 (C), 133.4 (CH), 133.6 (C), 133.8 (2CH), 134.2 (C), 138.3 (C), 151.1 (C), 152.3 (C), 156.2 (C), 182.7 (CO), 183.0 (CO).

Calculated for ($\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}_2$), %: C 58.84; H 4.08; N 2.98; O 20.45; S 13.66.

Found, %: C 58.02; H 4.41; N 2.76; S 12.85.

Assay of antiplatelet activity:

Preparation of platelet rich plasma (PRP) was done according to the method described previously [11]. All procedures were conducted at room temperature. Blood was collected from the auricular artery of healthy rabbit into

3.8 % citrate in a ratio of 9:1 and then centrifuged at 150 g for 15 min in order to obtain PRP. The PRP was carefully removed and placed into a plastic tube. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by further centrifugation of the remained plasma at 1500 g for 40 minutes. Throughout all experiments, the platelet number was adjusted to $250 \times 10^9/\text{L}$ by diluting PRP with PPP. Platelet aggregation in PRP was recorded under constant stirring conditions (500 rpm) at 37°C for 10 min by aggregometer (AT-02, Belarus). The baseline value was set using PRP while PPP served as full transmittance control. PRP suspension was incubated with the studied compounds (final concentration: 5, 10, 25, 50 and 100 μM) or with dimethylsulphoxide (DMSO) alone for 2 minutes. To minimize the effect of DMSO, the solvent, on aggregation, the final concentration of DMSO was fixed at 1% (v/v). The aggregation was induced by adding ADP (final concentration: 5 μM) and monitored the change of light transmission for 8 minutes, measuring the maximal increase after the addition of the inducer. The concentration at which the test compound showed 50% inhibition was taken as the IC_{50} . To study the time-dependent inhibitory effect of the test quinoid thiosulfonate derivative on ADP-induced platelet aggregation, samples of PRP were preincubated with 50 μM of studied compound for 0, 2, 3, 5, 20, 40, 60 minutes at 37°C with continuous stirring. The aggregation was induced by adding 5 μM ADP and monitored for the maximal changes in light transmission. To investigate the effect of the test quinoid thiosulfonate derivative on platelet disaggregation, samples of PRP were stimulated with ADP (5 μM) at 37°C with continuous stirring for the formation of aggregates in PRP. Studied compound (50, 100 μM) or 1% DMSO alone were added 90 seconds after the addition of inducer and changes in light transmission were recorded by aggregometer. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. The difference between groups was analyzed by standard Student's t -test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion. Platelet function can be regulated by various agonists. A major signaling molecule causing platelet aggregation is adenosine-5'-diphosphate (ADP) which activates platelets and is known to play an important role in hemostasis and thrombosis. Moreover, ADP receptor antagonists are in wide clinical use [12, 13]. Therefore, we investigated the effect of the test derivative on ADP-induced platelet aggregation. Concentration of ADP which inducing maximal aggregation was determined in preliminary experiments. In rabbit platelet-rich plasma (PRP), the maximal changes in light transmission observed at the ADP (5 $\mu\text{mol/L}$) was $46 \pm 4\%$. In the platelet aggregation assay, samples of citrated PRP were preincubated with vehicle 1% DMSO (control) or with increasing concentrations of studied compound (5, 10, 25, 50, 100 μM) and then stimulated with

ADP to induce aggregation. Obtained results suggested that 1% DMSO had no effect on platelet aggregation induced by ADP. Test agent inhibited ADP-induced aggregation and the degree of inhibition was proportional to its concentration

(Figure 3). As shown in Figure 3 the inhibition increased linearly from 5 to 100 μM with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) – 50 μM .

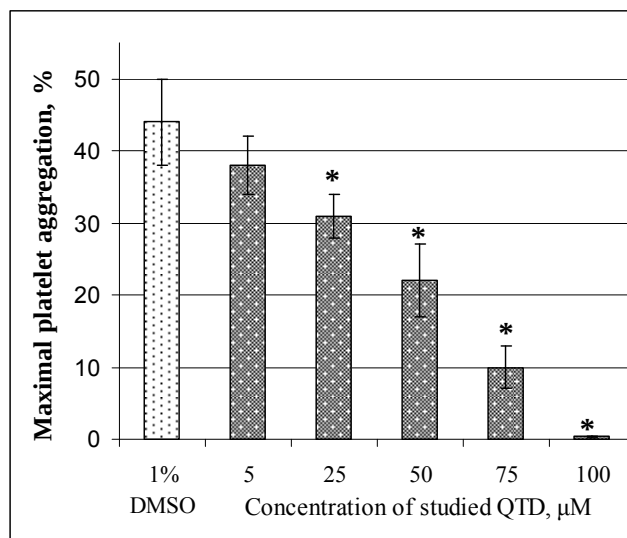


Fig. 3. Maximal ratio of ADP-induced platelet aggregation after 2 min incubation of PRP with different concentration of studied quinoid thiosulfonate derivative (QTD) or with 1% DMSO ($\text{M} \pm \text{m}$, $n=6$)

* – $P < 0.05$ vs 1% DMSO

The inhibitory effect of studied compound was inversely associated with preincubation time (Figure 4). For this experiment, samples of PRP were preincubated with 50 μM of test quinoid thiosulfonate derivative for 0, 2, 3, 5, 20, 40, 60 min and then stimulated with ADP (5 μM) to induce aggregation. As shown in Figure 4 the inhibition levels of ADP-induced aggregation observed after preincubation of PRP with 50 μM of compound for 0, 2, 3 or

5 minutes did not differ from each other. On the other hand, the inhibitory effect of S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl) 4-aminobenzenesulfonothioate was significantly reduced after more than twenty minutes of incubation. Moreover, after preincubation of PRP with 50 μM of the derivative for 60 minutes, the level of aggregation was identical to that in untreated PRP (Figure 4).

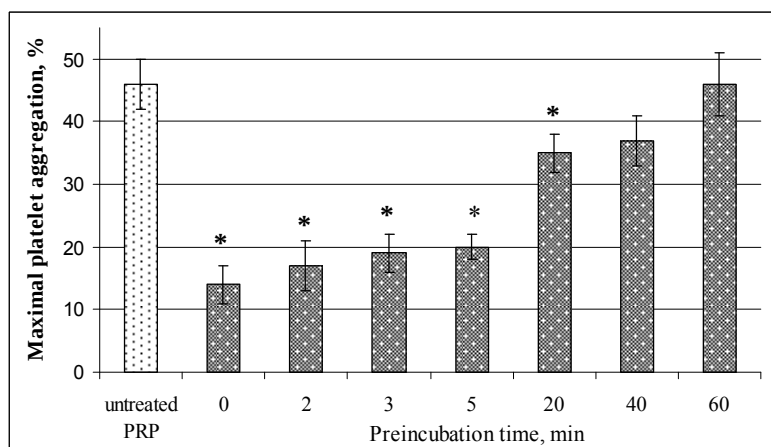


Fig. 4. Maximal ratio of ADP-induced platelet aggregation after preincubation of PRP with 50 μM of studied quinoid thiosulfonate derivative for 0, 2, 3, 5, 20, 40, 60 min ($\text{M} \pm \text{m}$, $n=5$)

* – $P < 0.05$ vs untreated PRP

Our results suggest that test compound at the concentration 100 μM could also effectively disaggregate the preformed platelet aggregate caused by ADP as the inducer. As shown in Figure 5 where PRP was incubated with ADP for 90 seconds, as soon as studied compound

was added into the mixture, disaggregation occurred rapidly and profoundly. In contrast, the addition of lower concentration of tested derivative of thiosulfonate (50 μM) as well as vehicle 1% DMSO did not affect the aggregate (Figure 5).

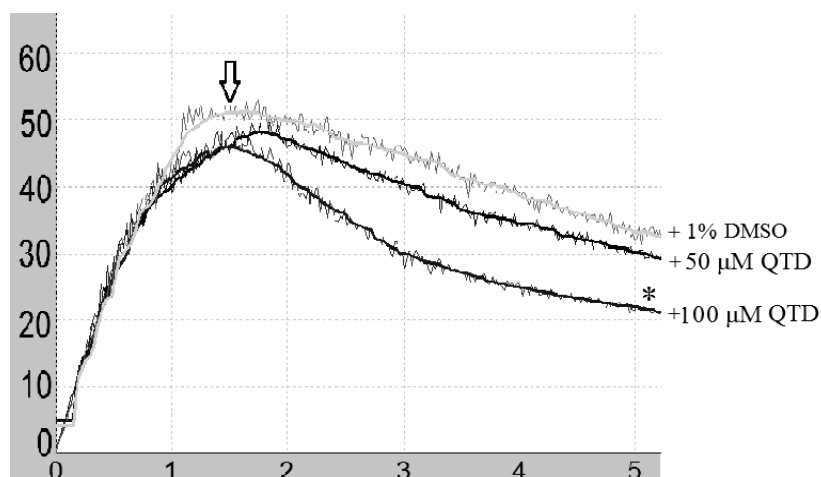


Fig. 5. Effect of 50 or 100 µM of studied quinoid thiosulfonate derivative (QTD) on platelet disaggregation

The moment of adding of effector into the ADP-stimulated PRP is indicated in Figure by the arrow

* – $P < 0.05$ vs 1% DMSO-treated PRP

Platelet aggregation is a result of complex signal transduction cascade reactions brought about by stimulants. One of the components in the cascade is ADP that is an important mediator of platelet aggregation and activation. ADP elicits its effects on the platelet through the membrane bound P2Y1 and P2Y12 receptors [14]. The P2Y1 receptor is coupled to Gq which regulates phospholipase C and intracellular Ca^{2+} mobilization and leads to aggregation and shape change. P2Y12 is coupled to Gi and leads to subsequent inhibition of adenylate cyclase and regulation of phosphoinositide 3-kinase. The importance of ADP in the process of thrombus formation has been demonstrated both by antiplatelet drugs that target the ADP receptors [14] and by patients with dysfunctional P2Y1/P2Y12 receptors [15]. ADP receptors may be important therapeutic targets. Moreover ADP receptor antagonists are in wide clinical use [11-13, 16-18]. However, several limitations of known synthetic ADP receptor antagonist have recently been discussed including inter-patient variability in antiplatelet effects and a relatively slow onset of action [19-21]. So, additional studies are needed and new selective platelet inhibitors with increased anti-thrombotic efficiency and safety profile must be developed. The results reported here indicate that S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl) 4-aminobenzenesulfonothioate can inhibit ADP-induced effects on platelet aggregation. But detailed mechanism of its action deserves additional investigations. Hopefully, our further research may give rise to numerous new selective platelet inhibitors with increased anti-thrombotic efficiency and safety profile.

Acknowledgment. This work was supported by the Ministry of Education and Science of Ukraine. We express our thanks to Aix-Marseille Université, especially Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire.

References

1. Platelets at work in primary hemostasis / K. Broos, H. B. Feys., S. F. de Meyer, K. Vanhoorelbeke, H. Deckmyn // *Blood Rev.* – 2011. – Vol. 25 (4). – P. 155–167.
2. Löwenberg E. C. Platelet-vessel wall interaction in health and disease / E. C. Löwenberg, J. C. Meijers, M. Levi // *Neth J Med.* – 2010. – Vol. 68 (6). – P. 242–251.
3. Kaplan Z. S., Jackson S. P. The role of platelets in atherothrombosis / Z. S. Kaplan, S. P. Jackson // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2011. – P. 51–61.
4. Angiolillo D. J. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis / D. J. Angiolillo, D. Capodanno, S. Goto // *Eur Heart J.* – 2010. – Vol. 31(1). – P. 17–28.
5. Lordkipanidzé M. Platelet turnover in atherothrombotic disease / M. Lordkipanidzé // *Curr Pharm Des.* – 2012. – Vol. 18(33). – P. 5328–5343.
6. Gresele P. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors / P. Gresele, S. Momi, E. Falcinelli // *Br J Clin Pharmacol.* – 2011. – Vol. 72 (4). – P. 634–646.
7. Ji X., Hou M. Novel agents for anti-platelet therapy / X. Ji, M. Hou // *J Hematol Oncol.* – 2011. – Vol. 4. – P. 44.
8. Association of quinone-induced platelet anti-aggregation with cytotoxicity / S. R. Kim, J. Y. Lee, M. Y. Lee, S. M. Chung., O. N. Bae, J. H. Chung // *Toxicol Sci.* – 2001. – Vol. 62 (1). – P. 176–182.
9. Thromboxane A2 synthase inhibition and thromboxane A2 receptor blockade by 2-[(4-cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15) in rat platelets / T. S. Chang, H. M. Kim, K. S. Lee, L. Y. Khil, W. C. Mar, C. K. Ryu, C. K. Moon // *Biochem Pharmacol.* – 1997. – Vol. 54 (2). – P. 259–268.
10. MacDonald J. A. Structure-activity relationships for selected sulfur-rich antithrombotic compounds / J. A. MacDonald, R. F. Langer // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2000. – Vol. 273 (2). – P. 421–424.
11. Inhibition of platelet function by A02131-1, a novel inhibitor of cGMP-specific phosphodiesterase, in vitro and in vivo / S. M. Yu, S. Y. Tsai, S. C. Kuo, J. T. Ou // *Blood.* – 1996. – Vol. 87 (9). – P. 3758–3767.
12. Wijeyeratne Y. D. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists / Y. D. Wijeyeratne, S. Heptinstall // *Br J Clin Pharmacol.* – 2011. – Vol. 72 (4). – P. 647–657.
13. Raju N. C. Platelet ADP-receptor antagonists for cardiovascular disease: past, present and future / N. C. Raju, J. W. Eikelboom, J. Hirsh // *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine.* – 2008. – Vol. 5 (12). – P. 766–780.
14. ADP receptors: targets for developing antithrombotic agents / S. P. Kunapuli, Z. Ding, R. T. Dorsam, S. Kim, S. Murugappan, T. M. Quinton // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol. 9. – P. 2303–2316.
15. Cattaneo M. ADP receptors and clinical bleeding disorders / M. Cattaneo, C. Gachet // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 2281–2285.
16. Platelet inhibitory activity and pharmacokinetics of prasugrel (CS-747) a novel thienopyridine P2Y12 inhibitor: A single ascending dose study in healthy humans / F. Asai, J. A. Jakubowski, H. Naganuma, J. T. Brandt, N. Matsushima, T. Hirota, S. Freestone, K. J. Winters // *Platelets.* – 2006. – Vol. 14 (4). – P. 209–217.
17. Alexopoulos D. p2y12 receptor inhibitors in acute coronary syndromes: from the research laboratory to the clinic and vice versa / D. Alexopoulos // *Cardiology.* – 2014. – Vol. 127 (4). – P. 211–219.
18. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel / P. Jaremo, T. L. Lindahl, S. G. Fransson, A. Richter // *J Intern Med.* – 2002. – Vol. 252. – P. 233–238.
19. Gurbel P. A., Bliden K. P. Durability of platelet inhibition by clopidogrel / P. A. Gurbel, K. P. Bliden // *Am J Cardiol.* – 2003. – Vol. 91. – P. 1123–1125.
20. Clopidogrel for coronary stenting: Response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity / P. A. Gurbel, K. P. Bliden, B. L. Hiatt, C. M. O'Connor // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 2908–2913.
21. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement / I. Muller, F. Besta, C. Schulz, S. Massberg, A. Schonig, M. Gawaz // *Thromb Haemost.* – 2003. – Vol. 89. – P. 783–787.

Т. Галенова, канд. біол. наук, І. Николаева, студ.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
К. Болибрух, асп., С. Половкович, канд. хим. наук, В. Новиков, д-р хим. наук
НУ "Львовская политехника", Львов, Украина

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ТИОСУЛЬФОНАТНОГО ПРОИЗВОДНОГО ХИНОНА НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Авторами обнаружено, что S-((1,4-диметокси-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-ил)метил)-4-аминобензенсульфонотиоат владеет антитромбоцитарной активностью. Для выяснения механизма его антиагрегационного действия, провели серию дополнительных экспериментов. Было установлено, что соединение ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Ингибирующий эффект зависит от концентрации препарата и времени преинкубации. Производное также оказывает дисагрегационное действие на агрегаты тромбоцитов предварительно сформированные в результате АДФ-стимуляции.

Ключевые слова: обогащенная тромбоцитами плазма, тиосульфатные производные хинона, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, антитромбоцитарные средства.

T. Halenova, PhD, I. Nikolaeva, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
K. Bolibrukh, PhD stud, S. Polovkovych, PhD, V. Novikov, DSc.
Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

EFFECTS OF NOVEL QUINOID THIOSULFONATE DERIVATIVE ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION

Recently, in a large scale screening test, we have found that S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-aminobenzenesulfonothioate, a chemically synthesized thiosulfonate derivative of quinone, possessed an antiplatelet activity. To elucidate the mechanism of its antiplatelet action, a series of experiments were performed. The compound was found to inhibit the ADP-induced platelet aggregation. The inhibitory effect was dose-dependent on concentration and preincubation time. The derivative also disaggregated the preformed platelet aggregates induced by ADP.

Key words: platelet rich plasma, quinoid thiosulfonate derivative, ADP-induced platelet aggregation, antiplatelet agents.

УДК 591.147; 612.4

І. Варенюк, канд. біол. наук, Н. Нужи́на, канд. біол. наук,
В. Варенюк, студ. М. Дзержинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ГІПОТАЛАМО-АДРЕНАЛОВУ СИСТЕМУ ПТАХІВ: ЕФЕКТ БЛОКАДИ ДОФАМІНОВИХ D1-РЕЦЕПТОРІВ

Показано, що ввечері та вдень (але не вночі та вранці) дофамін через D1-рецептори може опосередковувати вплив мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс птахів. Також дофамін через D1-рецептори може бути залучений до шляхів впливу мелатоніну на циркадну систему (супрахізматичне ядро та епіфіз) ввечері, але ці рецептори не залучені вночі, вранці та вдень.

Ключові слова: наднирники, гіпоталамус, епіфіз, мелатонін, дофамін, D1-рецептори.

Вступ. Циркадні ритми відіграють значну роль в життєдіяльності тваринного організму. Важливим компонентом системи, що задає добову ритміку в організмі хребетних, є епіфіз. Епіфіз секретує мелатонін з добовою періодичністю, задаючи цим самим добовий ритм роботи інших органів та систем органів [3]. З поглядом систем органів найбільш важливим є вплив мелатоніну на нейроендокринну систему, оскільки від її регуляторних впливів залежить злагоджена робота всіх інших систем в організмі. Однією зі складових нейроендокринної системи є гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова система. На сьогодні завдяки численним дослідженням багато відомо про особливості впливу мелатоніну на гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему [3, 5, 9, 10]. Проте спірні моменти залишаються, і не всі шляхи впливу цього епіфізарного гормону є до кінця з'ясованими. Зокрема, дослідження останніх років показали, що частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему може бути пов'язана з його впливом на синтез і виділення дофаміну, а останній вже діє безпосередньо через свої рецептори [4, 6, 7, 8, 11]. Для з'ясування можливості такої дії мелатоніну та дослідження ролі в цьому процесі дофамінових D1-рецепторів і проведено дане дослідження. Враховуючи наявність добової динаміки синтезу мелатоніну дослідження були проведені в 4 різних часових проміжках доби: вранці, вдень, ввечері та вночі.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження було проведено на самцях японських перепелів (*Coturnix coturnix japonica*) 5-тижневого віку. Птахів утримували в умовах одного віварію на стандартному раціоні (їжа – комбікорм пташиний виробництва Київсь-

кого комбікормового заводу, вода – ad libitum, температура – +22-23 °C). Світловий режим: 14 годин – світло (з 7 до 21 години), 10 годин – темрява (з 21 до 7 години).

Було сформовано 16 експериментальних груп по 5 птахів у кожній групі. Їм у відповідний час доби одноразово давали: 1.) фізіологічний розчин вранці (о 7:00) (контрольна група); 2.) мелатонін вранці (о 7:00) в дозі 10 мкг (тут і далі всі дози вказані з розрахунку на 100 г маси тіла); 3.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид (блокатор дофамінових D1-рецепторів) вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг; 4.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 7:00) в дозі 10 мкг; 5.) фізіологічний розчин вдень (о 13:00) (контрольна група); 6.) мелатонін вдень (о 13:00) в дозі 10 мкг; 7.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг; 8.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 13:00) мелатонін в дозі 10 мкг; 9.) фізіологічний розчин ввечері (о 19:00) (контрольна група); 10.) мелатонін ввечері (о 19:00) в дозі 10 мкг; 11.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг; 12.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 19:00) мелатонін у дозі 10 мкг; 13.) фізіологічний розчин вночі (о 1:00) (контрольна група); 14.) мелатонін вночі (о 1:00) в дозі 10 мкг; 15.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг; 16.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 1:00) мелатонін у дозі 10 мкг. Фізіологічний розчин вводили перитонеально в кількість 0,2 мл на птаха. R(+)-SCH 23390 гідрохлорид розчиняли у фізіологічному розчині і вводили за допомогою стереотаксичного приладу в порожнину третього шлуночка мозку. Мелатонін замішували у борошні

кульки і давали перорально. Через 2 години після введення відповідного препарату птахів декапітували (групи 1-4 – о 9:00, групи 5-8 – о 15:00, групи 9-12 – о 21:00, групи 13-16 – о 3:00). Для досліджень брали гіпоталамічну область мозку, епіфіз, та наднирники. Їх фіксували в фіксаторі Буена. Потім отриманий матеріал заливали в парафін і виготовляли парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи гіпоталамуса фарбували за методикою Ніссля, зрізи епіфіза – гематоксиліном Бемера, зрізи наднирників – гематоксиліном Бемера й еозинном [2]. Гістологічні препарати аналізували на світловому мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х і морфометричної установки з використанням комп'ютерної програми Promorph-Paradise for Windows. На зрізах гіпоталамуса вимірювали діаметр ядер нейронів аркуатного, супрахіазматичного і паравентрикулярного ядер, на зрізах епіфіза – площу перетину ядер пінеалоцитів, на зрізах наднирників – ширину тяжів інтерренальної тканини. Зростання діаметра чи площі перетину клітинних ядер нейронів гіпоталамічних ядер та пінеалоцитів епіфіза вважали свідченням зростання функціональної активності клітин відповідного гіпоталамічного ядра чи епіфіза, а зменшення діаметра чи площі перетину клітинного ядра вважали свідченням зниження функціональної активності даної структури [1 – стор. 138]. Аналогічно зростання ширини тяжів інтерренальної тканини наднирників вважали свідченням зростання активності коркових структур надниркових залоз, а зменшення даного показника вважали ознакою зниження активності кори наднирників.

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 5,0 for Windows. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Мелатонін вранці знижує, вдень і ввечері – не впливає, а вночі – підвищує ширину тяжів інтерренальної тканини у наднирниках (табл. 1). Неоднозначним є вплив мелатоніну при його введенні в різний час доби і на інші вивчені ланки гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи (аркуатне і паравентрикулярне ядра гіпоталамуса)

(табл. 1). Також неоднаковим є вплив мелатоніну на дві ключові ланки циркадної системи птахів – супрахіазматичне ядро і епіфіз. Так, ранкове введення мелатоніну не змінює площі перерізу ядер пінеалоцитів епіфіза; в той час як в інші періоди доби цей параметр зростає (табл. 1). Діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса зростає після ранкового, денного та вечірнього введення мелатоніну, однак не змінюється – після нічного введення мелатоніну (табл. 1). Можна помітити, що ввечері введення мелатоніну веде до підвищення діаметра нейронів аркуатного ядра; блокада дофамінових D1-рецепторів за допомогою R(+)-SCH 23390 гідрохлориду – не змінює цей параметр; проте при введенні мелатоніну на фоні заблокованих R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом дофамінових D1-рецепторів діаметр нейронів аркуатного ядра знижується (табл. 1). Таку різницю ми не можемо пояснити простою сумациєю ефектів від введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, а тому можемо припустити існування взаємодії між мелатоніном та дофаміном при впливі на вищезгаданий параметр у цей час доби. Подібною є ситуація і при аналізі у вечірній час доби зміни таких морфометричних параметрів як діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра та площі поперекового перетину ядер пінеалоцитів епіфіза, де активуючий вплив мелатоніну на ці параметри змінюється на гальмівний при його введенні після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом (табл. 1). Діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра та ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників не змінюються при вечірньому введенні мелатоніну та блокатора дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду (табл. 1). Однак при введенні у цей час доби мелатоніну після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом спостерігається достовірне зниження діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра та зростання ширини тяжів інтерренальної тканини наднирників (табл. 1). Отже, ввечері дофамінергічна система мозку може бути задіяна в реалізації ефектів мелатоніну на циркадну та гіпоталамо-адреналову системи із залученням дофамінових D1-рецепторів.

Таблиця 1. Морфометричні показники функціональної активності епіфіза і гіпоталамо-адреналової системи перепелів після введення мелатоніну та блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH-23390 гідрохлоридом у різний час доби

Умови експерименту	Площа перетину ядер пінеалоцитів епіфіза, мкм ²	Діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса, мкм	Діаметр ядер нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса, мкм	Діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, мкм	Ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників, мкм
ранкове введення препаратів					
фізіологічний розчин	19,8±0,7	7,2±0,2	7,7±0,1	7,2±0,6	39,6±0,5
мелатонін	19,1±0,2	8,0±0,1*	7,9±0,2	6,5±0,4	36,6±0,6*
R(+)-SCH-23390	18,8±0,4	7,0±0,1	6,7±0,1*	8,6±0,3	40,1±1,3
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	19,4±0,6	8,2±0,1*	7,2±0,1*^	7,6±0,3^	36,4±1,4*
денне введення препаратів					
фізіологічний розчин	18,8±0,3	7,7±0,1	7,9±0,1	6,7±0,5	37,5±0,8
мелатонін	20,3±0,4*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	8,6±0,4*	38,5±0,6
R(+)-SCH-23390	17,6±0,4*	7,3±0,1*	7,1±0,1*	7,8±0,3	41,4±1,3*
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	21,5±0,5*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	6,9±0,3^	34,1±1,6*^
вечірнє введення препаратів					
фізіологічний розчин	20,3±0,4	8,7±0,1	7,8±0,1	7,9±0,4	36,1±0,5
мелатонін	23,6±0,4*	9,5±0,1*	8,8±0,1*	9,1±0,6	36,1±0,5
R(+)-SCH-23390	19,3±0,3*	7,4±0,1*	7,6±0,1	7,8±0,4	37,0±2,1
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	16,5±0,4*^	7,2±0,1*^	7,0±0,1*^	5,8±0,3*^	43,9±3,8*^
нічне введення препаратів					
фізіологічний розчин	18,7±0,4	8,5±0,1	7,2±0,1	9,1±0,5	35,0±0,4
мелатонін	23,2±0,4*	8,5±0,2	7,6±0,1*	6,3±0,4*	36,9±0,4*
R(+)-SCH-23390	18,9±0,4	7,3±0,1*	7,1±0,1	6,0±0,3*	29,2±3,2
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	22,1±0,6*	8,8±0,1	7,4±0,1	7,3±0,3*	34,5±1,4

* – $P < 0,05$ (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі в той же час доби).

^ – $P < 0,05$ (порівняно з відповідним параметром у групі, якій вводили лише мелатонін в той же час доби).

Також можна припустити існування вищеописаної взаємодії і при впливі мелатоніну на паравентрикулярне ядро гіпоталамуса та на наднирники вдень. Так, після денного введення мелатоніну спостерігається зростання діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра. Але після денного введення мелатоніну і блокади D1-рецепторів спостерігається зниження діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра гіпоталамуса. Така різниця не може бути пояснена впливом блокади D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, оскільки його введення в цей час доби не змінює вищеописаний параметр (табл. 1). Аналогічно, ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників не змінюється після денного введення мелатоніну, зростає після денного введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, але знижується після денного введення мелатоніну та (+)-SCH 23390 гідрохлориду разом (табл. 1). Проте така взаємодія відсутня при впливі на циркадну систему піддослідних птахів, де діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра та площа перетину ядер пінеалоцитів не відрізняються після денного введення мелатоніну та після денного введення мелатоніну фоні блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом (табл. 1).

Вночі ефекти впливу мелатоніну на фоні блокади дофамінових D1-рецепторів на вивчені морфометричні параметри достовірно не відрізняються від ефектів введення тільки мелатоніну. Вранці вплив мелатоніну при блокаді дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом і без такої блокади на морфометричні параметри циркадної системи птахів (супрахіазматичне ядро та епіфіз) також не відрізняється. А достовірна різниця в цей час доби між діаметрами ядер нейронів аркуатного і паравентрикулярного ядер гіпоталамуса при введенні мелатоніну на фоні блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом і введенні лише мелатоніну може бути пояснена сумациєю ефектів від введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, оскільки після введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду разом отримано цифрові результати, проміжні між введенням мелатоніну та введенням R(+)-SCH 23390 гідрохлориду поодиночі (табл. 1). Отже, вночі та вранці дофамінові D1-рецептори не задіяні в реалізації ефектів мелатоніну на циркадну та гіпоталамо-адреналову системи піддослідних перепелів.

Висновки. Таким чином, мелатонін в різний час доби по-різному впливає на різні ланки гіпоталамо-адреналової та циркадної системи птахів. Встановлено існування значної синхронізації між активністю епіфіза і супрахіазматичного ядра гіпоталамуса, що є свідчен-

ням важливої ролі супрахіазматичного ядра у циркадній системі птахів. Найбільш ймовірно, що дофамінові D1-рецептори не залучені до шляхів впливу мелатоніну на систему супрахіазматичне ядро–епіфіз вночі, вранці та вдень, однак можуть бути залучені ввечері. Також показано, що частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс птахів реалізується через дофамінергічну систему головного мозку із залученням дофамінових D1-рецепторів, але має особливості в різний час доби. Вночі та вранці дофамінові D1-рецептори мабуть не залучені, а ввечері та вдень – залучені до шляхів впливу мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс.

Список використаних джерел

1. Загальна цитологія та гістологія / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К., 2010.
2. Микроскопическая техника / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М., 1996.
3. Угрюмов М. В. Механизмы нейроразнообразной регуляции / М. В. Угрюмов. – М., 1999.
4. Alexiuk N. A. Melatonin increases the in situ activity of tyrosine hydroxylase in the mediobasal hypothalamus of male Syrian hamsters / N. A. Alexiuk, M. Uddin, J. Vriend // Life Sciences. – 1996. – Vol. 59, № 8. – P. 687–694.
5. Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland / C. Campino, F. J. Valenzuela, C. Torres-Farfan, H. E. Reynolds, L. Abarzua-Catalan, E. Arteaga et al. // Horm. Metab. Res. – 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 337–342.
6. Dubocovich M. L. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals / M. L. Dubocovich, M. Markowska // Endocrine. – 2005. – Vol. 27, № 2. – P. 101–110.
7. Exposito I. Dopamine-glutamic acid interaction in the anterior hypothalamus: Modulatory effect of melatonin / I. Exposito, F. Mora, S. Oaknin // Neuroreport. – 1995. – Vol. 6, № 4. – P. 661–665.
8. Serotonergic and catecholaminergic interactions with co-localised dopamine-melatonin neurons in the hypothalamus of the female turkey / S. W. Kang, B. Leclerc, L. J. Mauro, M. E. El Halawani // J. Neuroendocrinol. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 10–19.
9. Madhu N. R. Pineal-adrenal interactions in domestic male pigeon exposed to variable circadian light regimes and exogenous melatonin / N. R. Madhu, C. K. Manna // Endocr. Regul. – 2010. – Vol. 44, № 3. – P. 121–127.
10. Pevet P. Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network / P. Pevet, E. Challet // J. Physiol. Paris. – 2011. – Vol. 105, № 4–6. – P. 170–182.
11. Effects of D1- and D2-dopamine receptor activation on melatonin synthesis in bovine pinealocytes / C. Santanavanich, B. Chetsawang, M. Ebadi, P. Govitrapong // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 35, № 3. – P. 169–176.

Надійшла до редколегії 25.09.14

И. Варениук, канд. биол. наук, Н. Нужина, канд. биол. наук, В. Варениук, студ., Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ГИПОТАЛАМО-АДРЕНАЛОВУЮ СИСТЕМУ ПТИЦ: ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ ДОФАМИНОВЫХ D1-РЕЦЕПТОРОВ

Показано, что вечером и днем (но не ночью или утром) дофамин через D1-рецепторы может опосредствовать влияние мелатонина на гипоталамо-адреналовый комплекс у птиц. Также дофамин через D1-рецепторы может быть задействован к путям влияния мелатонина на циркадную систему (супрахиазматическое ядро и эпифиз) вечером, но эти рецепторы не задействованы ночью, утром и днем.

Ключевые слова: надпочечники, гипоталамус, эпифиз, мелатонин, дофамин, D1-рецепторы.

I. Vareniuk, PhD., N. Nuzhyna, PhD., V. Vareniuk, stud., M. Dzerzhynsky, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF MELATONIN ON HYPOTHALAMIC-ADRENAL SYSTEM OF BIRDS: EFFECT OF DOPAMINERGIC D1-RECEPTORS BLOCKAGE

It was shown that dopamine via D1-receptors mediates the influence of melatonin on hypothalamic-adrenal axis in the evening and in the day, but it isn't in the morning and at the night. In addition dopamine via D1-receptors mediates the influence of melatonin on circadian system (suprachiasmatic nucleus and pineal gland) in bird in the evening.

Key words: adrenal gland, hypothalamus, pineal gland, melatonin, dopamine, D1-receptors. УДК 612.8; 612.82/83.

Т. Гончарова, студ., Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВІДМІННОСТІ В ЕЛЕКТРИЧНІЙ АКТИВНОСТІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЖІНОК ПРИ ТЕСТУВАННІ ПРОСТОЇ СЕНСОМОТОРНОЇ РЕАКЦІЇ ПІД ЧАС ФАЗ ОВУЛЯЦІЇ ТА ЛЮТЕЇНОВОЇ

У результаті обстеження 10 жінок 20±2 років в 2 фазах менструального циклу було виявлено, що у функціональній пробі "Проста сенсомоторна реакція" порівняно з функціональною пробою "Відкриті очі" під час фази овуляції відбулась активація фронто-парієтальної системи та формування системи top – down контролю під впливом підвищеного рівня тестостерону. В той час, як в лютеїновій фазі під впливом підвищеного рівня кортизолу спостерігалось формування право-півкульної нейромережі з залученням асоціативної кори, в рамках якої реалізувалась проста сенсомоторна реакція.

Ключеві слова: фази овуляції та лютеїнова, активність головного мозку, проста сенсомоторна реакція, реакція вибору.

Вступ. Регуляція менструальним циклом (МЦ) жінок здійснюється за обов'язкової участі п'яти ланок (або рівнів) регуляції, що являють собою сукупність взаємопов'язаних структур: кори головного мозку, гіпоталамуса, гіпофіза, яєчників, матки [1]. Ритмічні фізіологічні зміни у жінок впродовж МЦ мають відображення як в їх психофізіологічному стані, так і в соціальній поведінці. Так, передменструальний синдром охоплює широке коло циклічних та поточних фізичних, емоційних та поведінкових симптомів, які зустрічаються впродовж останньої лютеїнової фази (ЛФ) менструального циклу та зникають незабаром після початку менструації. Хоча цей синдром є широко визнаним, його етіопатогенез ще не зовсім є зрозумілим [2]. Більшість досліджень ґрунтуються на даних анкетних опитувань та самооцінки жінками свого психофізіологічного стану. В цих дослідженнях жінки вказували на погіршення своїх когнітивних можливостей впродовж певних періодів менструального циклу [3]. Крім того, зміни їх гормонального стану обумовлюють такі симптоми, як дратівливість, депресії, хронічна втома, підвищений рівень тривожності і т.п., тому, можливо, скарги на погіршення самопочуття та когнітивних можливостей можуть обумовлюватися суб'єктивними факторами. Для підтвердження, або спростування гіпотези щодо зв'язку стану центральної нервової системи (ЦНС) з певними фазами МЦ, необхідно отримати відповідні об'єктивні оцінки. При дослідженні функціонального стану нервової системи як базовий елемент виступають латентні періоди простих сенсомоторних реакцій, оскільки саме їх розглядають як показник збудливості центральної нервової системи [4]. Тому **метою** нашої роботи було дослідити електричну активність головного мозку жінок при тестуванні "Простої сенсомоторної реакції" (ПСМР) під час фази овуляції (ФО) та ЛФ.

Об'єкт та методи досліджень. В обстеженні брали участь 10 студенток Київського національного університету імені Тараса Шевченка у віці 20±2 роки, без скарг на стан здоров'я на момент обстеження, з регулярним менструальним циклом та нормальною вагою. Всі жінки не приймали протизаплідні засоби та інші гормональні препарати. Обстеження проводились на добровольцях та згідно етичних вимог до роботи з людьми. Кожна з жінок проходила 2 обстеження в ФО та ЛФ менструального циклу. Наявність і час овуляції в кожній із обстежуваних оцінювали за характером кристалізації слини згідно з даними тест-мікроскопу "Арбор" (реєстраційне свідоцтво МЗ України № 269/96). Під час проходження

функціональних проб "Відкриті очі" (ВО) та ПСМР проводили реєстрацію ЕЕГ за допомогою комплексу "Нейрон-Спектр-4/ВГ" (ЕС-сертифікат № RQ043131-V від 08.11.2004 р.). Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочі вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 Гц. Було використано мостикові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10-20 у 19 стандартних відведеннях. В кожному відведенні для частотних діапазонів ЕЕГ – дельта (0,5-3,9 Гц), тета (4,0-7,9 Гц), альфа (8-12,9 Гц), бета1 (13,0-19,9 Гц) та бета2 (20,0-35 Гц) обчислювались повна потужність спектру та домінуюча частота спектру у відповідному відведенні. Кожна з обстежуваних проходила функціональні проби ВО – 3 хв та ПСМР, в якій обстежуваний пред'являлись 100 подразників, а саме: на екрані комп'ютера давалась інструкція, за якою на появу зображення (квадрата) вона мусила якомога швидше натиснути на будь-яку клавішу. Пауза між зображеннями обиралась випадково з інтервалу 500 – 600 мс для того, щоб наступний сигнал був очікуваним, але не було настанови на ритм пред'явлення зображень.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілکا. Оскільки всі функціональні проби проходили одні й ті ж самі обстежувані в різні моменти часу, а розподіл практично всіх параметрів за критерієм Шапіро-Вілка був відмінний від нормального ($p < 0,05$), парні порівняння показників ЕЕГ проводили за допомогою критерію Вілкоксона. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$. Зважаючи на те, що переважна більшість параметрів мала розподіл відмінний від нормального, для опису вибіркового розподілу вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі: M_e [25%; 75%].

Результати та їх обговорення. В результаті статистичного аналізу отриманих даних було виявлено в ФО у функціональній пробі ПСМР порівняно з ВО значуще підвищення активності в дельта – діапазоні в правій задній скроневій зоні (Рис. 1). Оскільки активність в дельта – діапазоні пов'язують з формуванням вхідного сенсорного потоку та селективною увагою [5], можна припустити, що виконання функціональної проби, в якому відбувалась поява квадрату, активувало саме праву задню скроневу зону, яка і пов'язана з увагою до образної інформації.

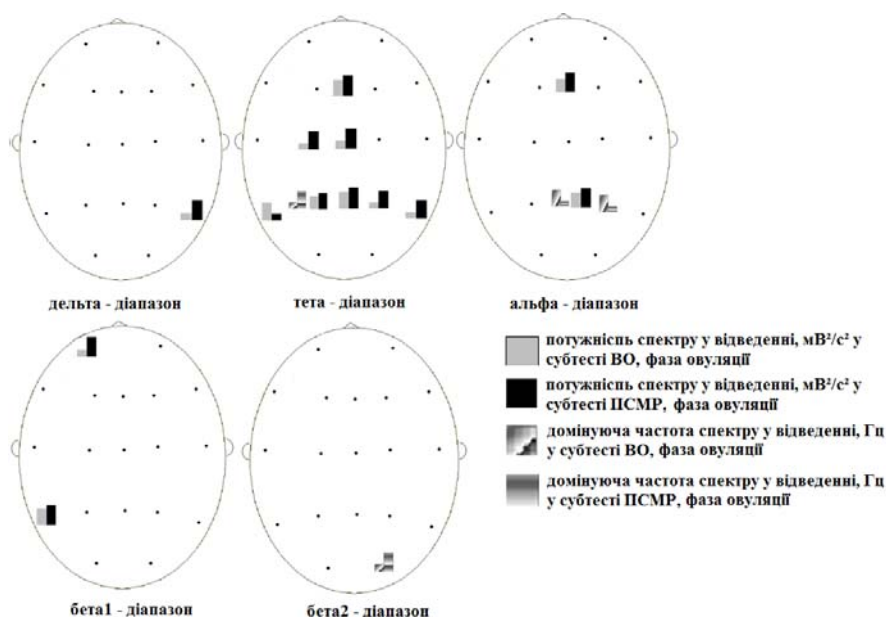


Рис.1. Значущі зміни активності головного мозку жінок (n=10) у функціональній пробі "Проста сенсомоторна реакція" (ПСМР) порівняно з функціональною пробою "Відкриті очі" (ВО) під час фази овуляції (ФО), відповідні медіани представлені стовпчиками

При цьому, активність в тета – діапазоні підвищилась в центральній фронто – парієтальній зоні та в лівій центральній та правій задній скроневій зонах (Рис.1). Активність в тета – діапазоні свідчить про формування нейромережі для виконання поставленої задачі з залученням top – down контролю [6]. Тому можна припустити, що формування простої сенсомоторної реакції відбувалось при активації системи контролю (відведення Fz та Cz), сенсомоторної кори лівої півкулі (C3), асоціативної кори (P3, Pz та P4) та системи просторової уваги та ідентифікації візуальної цілі з залученням right posterior intraparietal sulcus [7]. В ФО спостерігається значуще підвищення рівню тестостерону [8], що в свою чергу призводить до підвищення концентрації уваги. Можливо саме тому в ФО було виявлено формування системи top – down контролю при здійсненні ПСМР.

В ФО в функціональній пробі ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО було виявлено підвищення активності в альфа – діапазоні в центральних фронтопарієтальній та парієтальній зонах (відведення Fz та Pz) (Рис.1). Підвищення потужності (десинхронізацію) в альфа – діапазоні асоціюють з кортикальним пригніченням, але вона також пов'язана з високо-спеціалізованим сприйняттям, увагою та процесами запам'ятовування [9]. В [10] альфа – десинхронізацію розуміють як високо-специфічний фільтр, який пригнічує нерелевантну задачу інформацію, шум та забезпечує вибірку обробку інформації. Також зазначено, що event-related desynchronization (ERD) досягає максимуму впродовж вікна часу, коли відбуваються процеси релевантні поставленій задачі, наприклад, коли top-down процес ініціює управління виконанням завдання. Саме тому, можливо було виявлено реаліза-

цію top-down когнітивного контролю від фронтальних до потиличних зон мозку.

В ФО в функціональній пробі ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО було виявлено підвищення активності в бета1 – діапазоні в лівих префронтальній та задній скроневій зонах (Рис.1). В роботі [11] наводяться аргументи на користь гіпотези стосовно того, що активність в бета1 – діапазоні обслуговує статус-кво поточного сенсомоторного та когнітивного стану, когнітивного контролю та семантичного аналізу. Таким чином, можна припустити, що при формуванні відповідної реакції при появі квадрата жінки задіяли вербальний аналіз поточної ситуації з залученням слухової пам'яті (зони Верніке).

Зазначимо, що в бета2 – діапазоні не було виявлено значущих відмінностей в активності мозку, однак в правій потиличній зоні значущо підвищилась домінуюча частота. В роботі [12] показано, що активність в бета2 – діапазоні виявляє нейронну мережу високого рівня, яка приймає участь в простій пізнавальній задачі. В роботі [13] зазначено, що нейромережі різного розміру припускають осциляції різних частот, а саме: менші нейромережі генерують вищі частоти. Цей аргумент можна привести на користь припущення про певне звуження нейромережі, тобто відбулось формування специфічної локальної нейромережі обробки зорової інформації – зображення квадрату порівняно з функціональною пробою ВО.

Таким чином, в ФО при виконанні функціональної проби ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО було виявлено формування фронто-парієтальної мережі, в рамках якої реалізувалась сенсомоторна реакція.

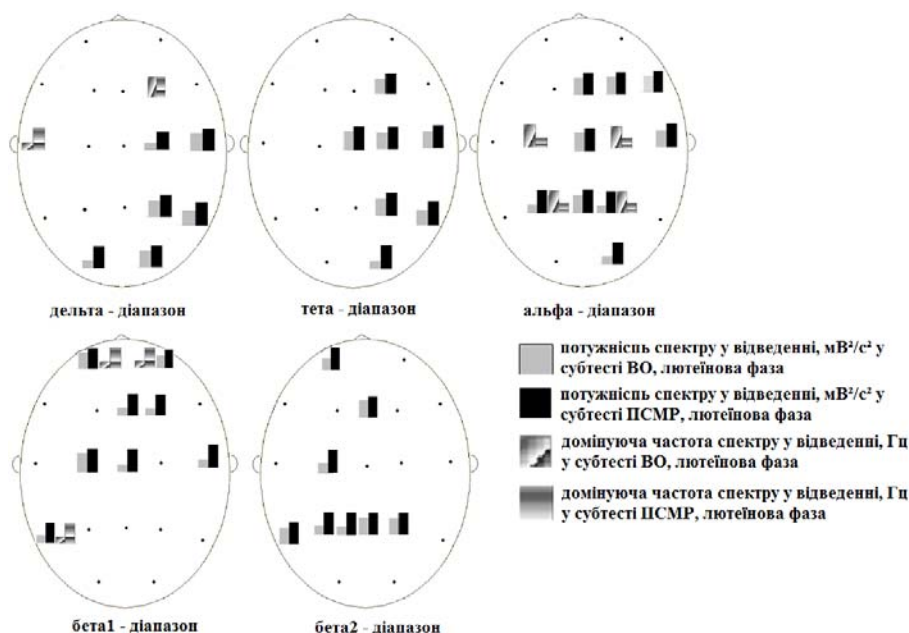


Рис.2. Значущі зміни активності головного мозку жінок (n=10) у функціональній пробі "Проста сенсомоторна реакція" (ПСМР) порівняно з функціональною пробою "Відкриті очі" (ВО) під час лютеїнової фази, відповідні медіани представлені стовпчиками

В ЛФ у функціональній пробі ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО в дельта – діапазоні було виявлено підвищення активності в правих скроневій, задній скроневій, центральній, тім'яній зонах та в потиличній зоні. Таким чином, в ЛФ у функціональній пробі ПСМР було виявлено формування широкого вхідного потоку релевантної візуальної інформації в правій півкулі (Рис.2). В тета – діапазоні було виявлено підвищення активності в правих фронтальній, скроневій, задній скроневій, центральній, тім'яній та потиличній зонах та в центральній зоні (відведення Cz) (Рис.2). Отже, top – down – контроль в ЛФ реалізувався переважно в межах правої півкулі. Можливо це пов'язано з підвищенням рівня кортизолу призводить до активації правої півкулі [15]. В альфа – діапазоні в ЛФ у функціональній пробі ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО було виявлено підвищення активності в правих фронтальній, передній скроневій, скроневій, тім'яній та потиличній зонах, а також в центральних зонах (відведення Fz, Cz, Pz) та в лівій потиличній, що може свідчити про підвищення специфічності обробки інформації в правій півкулі (Рис.2). При цьому в центральній –тім'яній зоні розмір відповідної нейромережі можливо збільшився, бо домінуюча частота значуще зменшилась. В бета1 – діапазоні активність підвищилась в центральній та правій фронтальних зонах (відведення Fz та F4), в центральній зоні лівої півкулі (відведення Cz та C3), правій скроневій та лівій задній скроневій зонах (відведення T4 та T5) (Рис.2). Це може свідчити про підвищення уваги до образної інформації з залученням зони Верніке. В бета2 – діапазоні було виявлено підвищення активності в тім'яній зоні, лівих фронтальній та задній скроневій (зоні Верніке) та центральній зоні лівої півкулі (відведення C3), а також в центральній фронтальній зоні (відведення Fz) (Рис.2). В бета2 – діапазоні здійснюється синхронізація активності між віддаленими нейронними ансамблями, яка має пряме відношення до пізнання *per se* [12]. Отримані резуль-

тати можливо свідчать про семантичний аналіз зорової інформації з залученням асоціативної кори.

Таким чином, в ЛФ при виконанні функціональної проби ПСМР порівняно з функціональною пробою ВО було виявлено формування право-півкульної нейромережі з залученням асоціативної кори, в рамках якої реалізувалась сенсомоторна реакція.

Висновки. За результатами проведених досліджень було виявлено, що у функціональній пробі "Проста сенсомоторна реакція" порівняно з функціональною пробою "Відкриті очі" під час фази овуляції відбулась активація фронто-парієтальної системи та формування системи top – down контролю під впливом підвищеного рівня тестостерону. В той час, як в лютеїновій фазі під впливом підвищеного рівня кортизолу спостерігалось формування право-півкульної нейромережі з залученням асоціативної кори, в рамках якої реалізувалась проста сенсомоторна реакція.

Список використаних джерел

1. Безнощенко Г. Б. Неоперативная гинекология / Г. Б. Безнощенко. – М. : Медицинская книга, 2001. – 392 с.
2. Matsumoto T. Altered autonomic nervous system activity as a potential etiological factor of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder / T. Matsumoto, T. Ushiroyama, T. Kimura et al. // BioPsychoSocial Medicine. – 2007. – Vol. 24, № 1. – P.1–24.
3. Minson C. Influence of the menstrual cycle on sympathetic activity, baroreflex sensitivity, and vascular transduction in young women / C. T. Minson, J. R. Halliwill, T. M. Young et al. // Circulation. – 2000. – Vol. 101. – P. 862–868.
4. Лоскутова Т. Д. Оценка функционального состояния центральной нервной системы человека по параметрам простой двигательной реакции / Т. Д. Лоскутова // Физиол.журн. СССР. – 1975. – Т. LXI, № 1. – С. 3–11.
5. Schroeder C. Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection / C. Schroeder, P. Lakatos // Trends in Neurosciences. – 2009. – V.32, № 1. – P. 9–18.
6. Klimesch, W. Eeg alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance / W. Klimesch // Brain Research Reviews. – 1999. – Vol. 29, № 2–3. – P.169–195.
7. Capotosto P. Differential Contribution of Right and Left Parietal Cortex to the Control of Spatial Attention: A Simultaneous EEG-rTMS Study / Paolo Capotosto, Claudio Babiloni, Gian Luca Romani, Maurizio Corbetta // Cerebral Cortex. – 2012. – Vol. 22. – P. 446–454.
8. Hong N. B. Dynamics of serum testosterone during the menstrual cycle evaluated by daily measurements with an ID-LC-MS/MS method and a 2nd generation automated immunoassay / N. B. Hong B., P. M. Sluss, S. Blincko et al. // Steroids. – 2013. – Vol. 78, № 1. – P. 96–101.

9. Sauseng P. What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? / P. Sauseng, W. Klimesch // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2008. – Vol. 32, № 5. – P. 1001–1013.
10. Klimesch W. EEG alpha oscillations: The inhibition–timing hypothesis / W. Klimesch, P. Sauseng, S. Hanslmayr // Brain Research Reviews. – 2007. – Vol. 53, № 1. – P. 63–88.
11. Engel A. Beta-band oscillations–signalling the status quo? / A. Engel, P. Fries // Neurobiology. – 2010. – Vol. 20, № 2. – P. 156–165.
12. Kukleta M. Cognitive Network Interactions and Beta-2 Coherence in Processing Non-Target Stimuli in Visual Oddball Task / M. Kukleta, M. Brázdil, R. Roman et al. // Physiol. Res. – 2009. – Vol. 58. – P. 139–148.

13. Sauseng P. What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? / P. Sauseng, W. Klimesch // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2008. – Vol. 32, № 5. – P. 1001–1013.
14. Joseph M. Menstrual cycle modulation of the relationship between cortisol and long-term memory / J. M. Andreano, H. Arjomandi, L. Cahill // Psychoneuroendocrinology. – 2008. – Vol. 33. – P. 874–882.
15. Hamid A. Alhaj, Anna E. Massey, R. Hamish McAllister-Williams. Effects of cortisol on the laterality of the neural correlates of episodic memory / Journal of Psychiatric Research. – 2008. – V.42. – P. 971–981.
16. Hamid A. Alhaj, Anna E. Massey, R. Hamish McAllister-Williams // Journal of Psychiatric Research. – 2008. – V.42. – P. 971–981.

Надійшла до редколегії 29.10.14

Т. Гончарова, студ., Н. Филимонова, канд. физ.-мат. наук
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОТЛИЧИЯ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖЕНЩИН ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ ПРОСТОЙ СЕНСОМОТОРНОЙ РЕАКЦИИ ВО ВРЕМЯ ФАЗ ОВУЛЯЦИИ И ЛЮТЕИНОВОЙ

В результате исследований 10 женщин 20±2 лет в 2 фазах менструального цикла было выявлено, что в функциональной пробе "Простая сенсомоторная реакция" по сравнению с функциональной пробой "Открытые глаза" во время фазы овуляции происходила активация фронто-париетальной системы и формирование системы top – down контроля под влиянием повышенного уровня тестостерона. В то время как в лютеиновой фазе под воздействием повышенного уровня кортизола наблюдалось формирование правополушарной нейросети с привлечением ассоциативной коры, в рамках которой реализовалась простая сенсомоторная реакция.

Ключевые слова: фазы овуляции и лютеиновая, активность головного мозга, простая сенсомоторная реакция, реакция отбора.

T. Honcharova, stud., N. Filimonova, Ph.D.
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine

DIFFERENCES IN ELECTRIC ACTIVITY OF WOMEN BRAIN UPON TESTING OF SIMPLE SENSOMOTOR REACTIONS DURING OVULATION AND LUTEIN PHASES

As a result of researches of 10 women 20±2 years in 2 phases of a menstrual cycle it was revealed, that in functional trial "Simple sensomotor reaction" in comparison with functional trial "The open eyes" during the ovulation phase took place the activation of the fronto – parietal systems and the formation of the system top – down control over influence of the increased level of testosterone. While in the lutein phase under the influence of the increased level of a cortisol the formation of the right – hemisphere neural network with attraction of the associative cortex in the context of which the simple sensomotor reaction was realized was observed.

Keywords: ovulation and luteal phase, the activity of the brain, a simple sensorimotor reaction, the reaction of the selection.

УДК: 612.325+616.345+620.3

О. Єфіменко, асп., Ю. Савченко, канд. біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
О. Курик, д-р мед. наук
ТОВ "КАПИТАЛ" – МЦ "Універсальна клініка "Оберіг", Київ,
М. Співак, член-кореспондент
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА І ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ДІЇ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ

Досліджено вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на морфологічний стан слизової оболонки шлунка та товстої кишки у щурів різного віку. Встановлено, що у старих щурів були виявлені дистрофічні і дисрегенераторні зміни (порушення співвідношення головних і парієтальних клітин), атрофічні або гіперпластичні зміни в слизовій оболонці шлунка. НДЦ відновлював процеси проліферації і диференціації клітин епітелію залоз шлунка. В контрольній групі старих щурів слизова оболонка товстої кишки була місцями потоншеною, в клітинах відмічались дистрофічні зміни, спостерігалась зміна ядерно-цитоплазматичного співвідношення клітин, були знайдені вогнища інфільтрації з лімфоцитів, макрофагів, плазматичних клітин. НДЦ у старих щурів викликав зменшення кількості клітин у стані дистрофії і апоптозу, збільшував проліферативну активність клітин та кількість келихоподібних клітин. Таким чином, НДЦ відновлював морфо-функціональну будову слизової оболонки шлунку та товстої кишки.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, шлунок, товста кишка, морфологія.

Вступ. У розвинених країнах середня тривалість життя становить більше 70 років. Насправді людина може прожити і 120 років, але цьому заважають збої в роботі різних систем організму, які відбуваються в другій половині життя. Вікові зміни призводять до хронічних і, в деяких випадках, смертельних захворювань.

На сьогодні достатня кількість робіт присвячена віковим змінам, що відбуваються в слизовій шлунка та товстої кишки людини. Фізіологічні і патологічні клітинні зміни, що відбуваються з віком в травному тракті можуть викликати запальний процес, що веде до пошкоджень слизової і регенеративної здатності епітелію. Крім того, результати сучасних наукових досліджень одержані на тваринах і на людях іноді суперечать один одному. Найменше суперечок є відносно вікових змін слизової шлунка. Так в дослідженнях показано, що під час старіння в слизовій оболонці шлунка зменшується секреція слизу і бікарбонату, знижує-

ться утворення простагландину, зменшується діяльність синтази оксиду азоту [1;2]. У товстій кишці щурів проліферація епітелію крипт і апоптоз виявилися найбільш активними на 3-му тижні життя [3], на думку авторів це пов'язано з розвитком шлунково-кишкового тракту. Результати Xiao і співав. [2001] суперечать цим даним, адже вони виявили, що кількість проліферативних епітеліальних клітин була вищою, а швидкість апоптозу нижчою у літніх щурів [4]. В дослідженнях слизової прямої кишки було зареєстровано, що у літніх людей знижується висота поверхневого епітелію [5].

Одним із сучасних напрямків досліджень є вплив наноматеріалів на біологічні системи [6]. До цієї групи речовин належить НДЦ. В дослідженнях на кардіоміоцитах та головному мозку показаний стрес протекторний вплив НДЦ [7;8]. Також встановлено, що НДЦ проявляє антиоксидантні властивості при дії на слизову оболонку шлунка, але морфологічні зміни при цьому не

досліджувались [9]. Досліджень відносно впливу НДЦ на слизову оболонку товстої кишки взагалі немає.

В зв'язку з вищеописаним **метою** роботи було дослідити вплив нанокристалічного діоксиду церію на морфологічний стан слизової стінки шлунка та товстої кишки у щурів різного віку.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 80 білих нелінійних щурах двох вікових груп: 3 місяці (маса 130-160 г, $n=40$) та 22-24 місяці (маса 390-450 г, $n=40$). Кожну вікову групу було поділено наступним чином: I – інтактні тварини, II – група тварин, яким вводили 2,9 мл дехлорованої води, III – група щурів, яким вводили стабілізуючий розчин в об'ємі 2,9 мл/кг, та IV – група тварин, яким вводили НДЦ (1 ммоль/мл), розчиненого в стабілізуючому розчині об'ємом 2,9 мл/кг. I, II та III групи тварин були контрольними. Всі речовини вводили протягом 10 днів, один раз на день внутрішньошлунково.

Всі роботи з тваринами проводилися відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996); вимогами GLP і директивою Ради ЄС 86/609 ЕЕС від 24 листопада 1986 про наближення законів, підзаконних актів і адміністрованих положень держав-членів ЄС щодо питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети. Протокол біоетичної комісії №8 від 03.04.2014.

Тварин умертвляли летальною дозою уретану (3 г/кг, внутрішньоочеревинно), після чого видаляли шлунок і товсту кишку. Шлунок розрізали по великій кривизні, брали шматочки з кардіального та пілоричного відділу шлунка; з товстої кишки вирізали фрагменти стінки з дистального відділу. Шматочки фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 1 доби. Далі препарати піддавали зневодненню у розчинах етилового спирту зростаючих концентрацій (50, 60, 70, 80, 90, 96 % – по одній годині у кожному розчині), та залишали на 12 год для просвітлення у ксилолі та хлороформі (1 год), просочували сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год 37°C) та чистим парафіном (2 год 56°C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи стінки шлунка і товстої кишки завтовшки до 4 мкм виготовляли на санному мікромомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином.

Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа у 100, 200 і 400 разів. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 ("Olympus Europe GmbH", Японія).

НДЦ синтезовано у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів ІМБ ім. Д.К.Заболотного НАН Украї-

ни. Синтезований золь містив 0,1 МНДЦ (в перерахунку на церій) розміром 2-7 нм, стабілізованих цитратом натрію, з дзета потенціалом мінус 20 мВ. Для роботи використовували розведення вихідного золю, які проводили у стерильній деіонізованій воді.

Результати та обговорення. При макроскопічному дослідженні слизової оболонки шлунка щурів у віці 3-х місяців в контрольній групі (інтактні) слизова оболонка шлунка була блідо-рожевою; складчатість поздовжня, добре виражена. Дефектів слизової, ерозій, крововиливів не виявлено.

У щурів шлунок поділяють на дві частини – кардіальний відділ, і пілоричний із власне залозистими утвореннями [10]. Кардіальний відділ вкритий багатощаровим плоским незроговілим епітелієм, який має нерівномірну товщину в залежності від ямок і виступів. В зоні западення слизової епітелій витончений, а на поверхні складок епітелій потовщений, складається з 4-5 шарів клітин. Поверхневі шари плоского епітелію більш світлі, клітини з слабо еозинофільною цитоплазмою, збільшені в розмірах. Ближче до базальної пластини клітини менших розмірів, з більш гіперхромними ядрами, збільшенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення в бік ядра. Під епітеліальним покривом визначається пухка сполучнотканнна основа з поодинокими м'язовими волокнами – підслизовий шар слизової оболонки кардіального відділу. М'язова оболонка складається з трьох шарів – внутрішнього і зовнішнього з поперечно розташованими волокнами, і середнього, де волокна йдуть у поздовжньому напрямку. Між м'язовим шаром і серозною оболонкою знаходяться судини і нерви.

Пілоричний відділ шлунка складається із залозистих трубочок і покривного циліндричного епітелію. Зовні слизова шлунка вистелена одношаровим циліндричним епітелієм, який в зоні шлункових ямок потовщується і переходить у призматичний епітелій. Шлункові ямки не глибокі, їх дно знаходиться на рівні шийної частини залозистих трубочок. Залози шлунка нормальної гістологічної будови – перешийок переважно з циліндричного епітелію; шийка представлена слизовими і поодинокими паріетальними клітинами; дно залоз утворено переважно головними клітинами, серед яких можна знайти невелику кількість паріетальних клітин. В поодиноких клітинах, переважно в шийці залоз, знайдені мітози. В області шийки залоз спостерігалась достатня кількість мукоцитів. Всі клітини залоз з чіткими контурами, гомогенною еозинофільною цитоплазмою, з ядром, яке чітко візуалізується. Лише в поодиноких клітинах спостерігались ознаки вакуолізації і дистрофічних змін. У власній пластинці слизової оболонки відмічалися інфільтрати з поодинокими лімфоцитами, гістіоцитами, плазматичними клітинами. Морфологічна картина слизової шлунка щурів описаної групи характерна для незміненої слизової оболонки (Рис.1.).

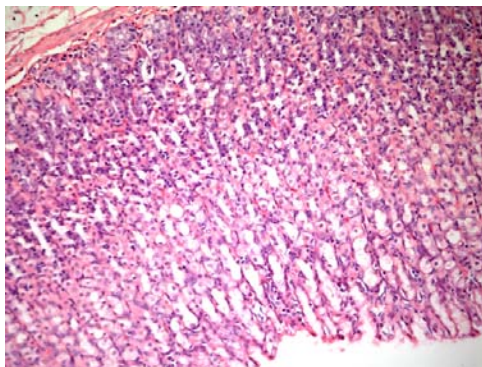


Рис. 1. Слизова оболонка шлунка 3-місячних щурів нормальної гістологічної будови. Забарвлення гематоксиліном-еозином. 36.x200

В групах умовного контролю 3-х місячних щурів, які отримували воду та стабілізуючий розчин, теж не було знайдено патологічних змін.

В групі інтактних щурів у віці 24-х місяців у кардіальному відділі відмічали потовщення багатошарового плоского покривного епітелію, місцями з появою ділянок зроговіння поверхневих шарів у вигляді нашарування щільних гомогенних еозинофільних мас. У місці переходу багатошарового плоского епітелію в залозисту частину з боку базальних клітин покривного епітелію спостерігались ділянки акантозу. У підслизовому шарі слизової оболонки відмічали більш виражену інфільтрацію лімфоцитами, гістіоцитами, плазматичними клітинами (Рис.2).

Відмічалось розширення шлункових ямок, контури яких були нерівними, складчастими, звивистими. При дослідженні залозистих утворень шлунка вогнищево відмічали дистрофічні зміни функціонуючих клітин, переважно головних, цитоплазма яких була вакуолізована, ядро без чітких контурів. Парієтальні клітини збільшені в розмірах, окремі із дистрофічними змінами цито-

плазми; ядро зберігає чіткі контури, знаходиться в центрі клітини. Відмічається порушення співвідношення головних і парієтальних клітин на користь останніх. Найбільш виражені дистрофічні зміни залозистих клітин спостерігали у місці переходу багатошарового плоского епітелію в залозисту частину. Майже в усіх щурів в області шийки залоз спостерігалась зменшення кількості мукоцитів. У частини щурів дно залоз було утворено головними клітинами з поодинокими парієтальними клітинами і малодиференційованими клітинами. В просвітах залоз зустрічались десквамовані клітини епітелію. В частині головних клітин відмічались ознаки дистрофії у вигляді вакуолізації цитоплазми; окремі клітини були зморщеними з пікнотичним ядром (Рис.2, А). В кількох препаратах знаходили кисти вивідних проток залоз (Рис.2, Б). В частині випадків відмічалось значне зменшення парієтальних клітин, які візуалізувались у вигляді невеликих груп. Серед них також зустрічались клітини з пікнотичним ядром і вакуолізованою цитоплазмою, що майже не забарвлювалась еозином.



Рис. 2. Морфологічні зміни слизової оболонки шлунка щурів 24 міс після дії нанокристалічного діоксиду церію, забарвлення гематоксиліном-еозином. 36.х200:

А – дистрофічні зміни в клітинах (не забарвлені ділянки, зруйновані клітини), контроль;

Б – киста вивідних проток залоз, контроль;

В – морфологічний стан слизової після 10-денного введення нанокристалічного діоксиду церію.

Слизова оболонка у кількох щурів даної групи була з ознаками дистрофічних змін у порівнянні з групою молодих щурів, у решти була без змін. Отже, в слизовій шлунка контрольної групи старих щурів відмічались дистрофічні і дисрегенераторні зміни (порушення співвідношення головних і парієтальних клітин), а також атрофічні або гіперпластичні зміни, які є віковими, а також такими, що могли стати набутими впродовж життя під впливом зовнішніх факторів, зокрема харчування і умов утримання експериментальних тварин. Причини цих ушкоджень можна пояснити ще дією реактивних форм кисню на епітеліальні клітини, в результаті чого і виникають атрофічні зміни [11].

В групі молодих щурів, які отримували НДЦ, знаходили картину нормальної гістологічної будови. Можна відмітити деяке збільшення кількості мукоцитів у шийній зоні залоз у порівнянні з групою молодих інтактних щурів. Помірне збільшення кількості мукоцитів, які продукують слиз, є позитивною динамікою, оскільки слиз має протекторні властивості і забезпечує захист слизової, що підтверджується даними літератури [12; 13].

Гістологічне дослідження слизової оболонки шлунка в експериментальній групі старих щурів віком 24 місяці, дало можливість оцінити дію НДЦ на слизову оболонку при порівнянні з контрольними групами щурів відповідної вікової групи. У кардіальному відділі покривний багатошаровий плоский епітелій визначався переважно як помірно потовщений, у порівнянні з контрольною групою були відсутні ознаки зроговіння епітелію, а також значно меншими за кількістю і поширеністю були вог-

нища акантоза – заглибленого росту багатошарового плоского епітелію з боку базального шару. В залозах спостерігалось значно менше змін, ніж у контрольних групах старих щурів. Дно залоз було утворено головними і парієтальними клітинами; клітини зберігали характерну для них цитологічну будову. Перешийок складався з циліндричного епітелію і додаткових клітин, що продукують муцин; відмічались лише поодинокі малодиференційовані клітини. Мітози зустрічались у поодиноких випадках. Клітин з дистрофічними змінами майже не було, ніж у тварин, яким не вводили НДЦ. Ядра практично всіх клітин були незмінними. У власній пластинці слизової оболонки інфільтрація була вогнищевою і досить помірною, складалася з лімфоцитів, гістіоцитів, поодиноких плазматичних клітин (Рис. 2, В).

Отже, у старих щурів, які отримували нанокристалічний діоксид церію, відмічається позитивна динаміка відновлення вікових змін, зокрема процесів проліферації і диференціювання клітин епітелію залоз шлунка, що забезпечує нормалізацію функціонального стану.

Враховуючи, що епітелій ШКТ є чутливим індикатором функціонального стану травної системи, був проведений морфологічний аналіз стану кишки, зокрема товстої кишки. Епітелій слизової товстої кишки – одношаровий призматичний, він складається з стовпчастих епітеліоцитів, келихоподібних екзокриноцитів, невеликої кількості ендокринних клітин і малодиференційованих (камбіальних) клітин. Морфофункціональний стан епітелію слизової оболонки у значній мірі визначається вмістом келихоподібних клітин, які виділяють слизистий секрет,

що полегшує проведення харчових мас по кишечнику. У власній пластинці слизової оболонки знаходяться дифузно розміщені лімфоцити, лімфоїдні скупчення і лімфоїдні фолікули, що відносяться до місцевої імунної системи. У підслизовій оболонці, яка представлена пухкою волокнистою сполучною тканиною, розташовуються нервові і судинні елементи. М'язова оболонка представлена циркулярним і повздожним шарами гладких м'язів.

В контрольних групах щурів у віці 3-х місяців (тварин, що отримували воду та стабілізуючий розчин) стінка тов-

стої кишки була нормальної гістологічної будови з добре розвиненими криптами. Призматичний епітелій слизової високий; клітини з чіткими контурами; ядра клітин добре візуалізуються, помірно гіперхромні; дистрофічні зміни практично відсутні. Спостерігалась значна кількість келихоподібних клітин зі світлою цитоплазмою. В стромі слизової оболонки зустрічаються поодинокі лімфоцити, а також лімфоїдні скупчення і невеликі лімфоїдні фолікули, окремі з генеративними центрами (Рис.3).

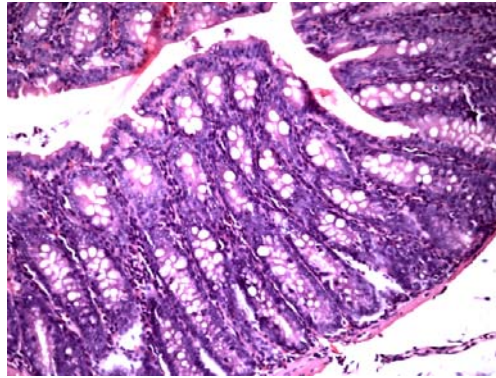


Рис.3. Стінка товстої кишки нормальної гістологічної будови у 3-місячних щурів – в слизовій поодинокі інфільтрати з лімфоцитів, гістіоцитів; достатня кількість келихоподібних клітин. Заб. гематоксиліном-еозином. x200

В контрольних групах старих щурів у віці 24 місяці слизова оболонка була вогнищево потоншеною; в клітинах відмічались дистрофічні зміни у вигляді зернистості, вакуолізованої цитоплазми; у багатьох клітинах спостерігались порушення ядерно-цитоплазматичного співвідношення. Місцями визначались епітеліальні клітини з ознаками деструкції – епітеліоцити без чітких контурів, ядра з ознаками конденсації хроматину; в цитоплазмі клітин знаходились великі оптично порожні вакуолі. Такі морфологічні зміни є проявом порушення процесів обміну в клітинах з подальшою загибеллю клітин за механізмом апоптозу. Келихоподібні клітини

були майже відсутні. В окремих випадках власна пластинка слизової оболонки була збільшена в розмірах, що може бути пов'язане з проліферацією фібробластів як прояв гіпоксії внаслідок порушення трофіки судинного ґенезу у старих експериментальних тварин. У власній пластинці слизової оболонки і у підслизовому шарі знаходились поодинокі лімфоцити, місцями лімфоїдні скупчення, без гермінативних центрів. У частині випадків були знайдені вогнища інфільтрації з лімфоцитів, макрофагів, плазматичних клітин, а в поодиноких випадках помірна дифузна інфільтрація лімфоцитами, макрофагами підслизової основи слизової оболонки.

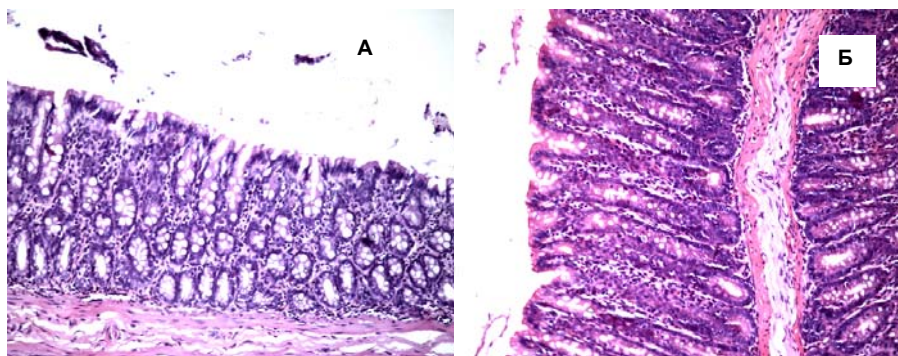


Рис.4. Морфологічні зміни слизової оболонки шлунка 24 місячних щурів після дії нанокристалічного діоксиду церію, забарвлення гематоксиліном-еозином. 36.x200:

А – зменшення товщини слизової; вогнищево дистрофічні зміни у призматичному епітелії (на поверхні) дистрофічні зміни в клітинах (не забарвлені ділянки, зруйновані клітини),

Б – морфологічний стан слизової після 10-денного введення нанокристалічного діоксиду церію.

В досліджуваній групі молодих щурів, які отримували НДЦ практично не спостерігалось змін у слизовій оболонці у порівнянні з контрольною групою.

В групі щурів у віці 24-х місяців після вживання НДЦ морфологічна картина слизової оболонки товстої кишки відрізнялась від такої старих тварин контрольних груп. Серед колоноцитів зустрічались лише поодинокі клітини з порушенням обмінних процесів, в цитоплазмі яких знаходились нечисленні дрібні оптично порожні вакуолі.

Переважає більшість клітин була з чіткими контурами, гомогенною еозинотильною цитоплазмою, помірно гіперхромним ядром. Також було відмічено збільшення кількості келихоподібних клітин. Щодо лімфоїдноклітинної інфільтрації, то спостерігались як поодинокі лімфоцити, невеликі скупчення, так і невеликі лімфоїдні фолікули з реактивними центрами.

Отже, після 10-денного введення НДЦ у старих щурів спостерігається зменшення кількості клітин у стані

дистрофії і апоптозу, збільшення проліферативної активності клітин, що може проходити за рахунок покращення обмінних процесів і характеризуватися як відновлення морфо-функціонального стану слизової оболонки товстої кишки.

Таким чином, з віком відбувається порушення нормальної морфологічної будови слизової шлунка та товстої кишки. Встановлений факт відновлення цих порушень НДЦ є надзвичайно цікавим. Відомо, що НДЦ має на своїй поверхні кисневі зв'язки і може виступати як антиоксидант [14]. Згідно з вільно-радикальною теорією старіння: причиною старіння організму є незворотні uszkodження клітин вільними радикалами. Оскільки НДЦ має антиоксидантні властивості, то можливо це є одним із механізмів відновлення морфологічних змін слизової з віком.

Висновки

1. З віком порушується морфологічна будова слизової оболонки шлунка та товстої кишки.

2. Нанокристалічний діоксид церію відновлював морфо-функціональну будову слизової оболонки шлунка та товстої кишки у старих щурів.

Acknowledgements: Робота виконана за фінансування Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках виконання науково-дослідної роботи "Експериментальне обґрунтування застосування нанокристалічного діоксиду церію в гастроентерології, проктології і геріатрії", № державної реєстрації 0113U006058.

Список використаних джерел

1. Tarnawski A. S. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target / A. S. Tarnawski, A. Ahluwalia, M. K. Jones // *Curr Med Chem.* – 2012. – Vol. 19(1). – P. 4–15.
2. Lee M. Age-related changes in gastric mucosal bicarbonate secretion in rats / M. Lee // *Age.* – 1996. – Vol. 19. – P. 55–58.

Е. Ефименко, асп., Ю. Савченко, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Е. Курик, д-р мед. наук

ТОО "КАПИТАЛ" – МЦ "Универсальная клиника "Оберег", Київ, Україна,

Н. Спивак, член-корреспондент

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Київ, Україна

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

В работе изучали влияние нанокристаллического диоксида церия (НДЦ) на морфологическое состояние слизистой оболочки желудка и толстой кишки у крыс разного возраста. У старых крыс были обнаружены дистрофические и дисрегуляторные изменения (нарушение соотношения главных и париетальных клеток), атрофические или гиперпластические изменения. НДЦ восстанавливал процессы пролиферации и дифференциации клеток эпителия желез желудка. В контрольной группе старых крыс слизистая оболочка толстой кишки была местами истонченной, в клетках отмечались дистрофические изменения, наблюдалось изменение ядерно-цитоплазматического соотношения клеток, были найдены очаги инфильтрации из лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток. НДЦ у старых крыс вызывал уменьшение количества клеток в состоянии дистрофии и апоптоза, увеличивал пролиферативную активность клеток и количество бокаловидных клеток. Таким образом, НДЦ восстанавливал морфо-функциональное строение слизистой оболочки желудка и толстой кишки.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, желудок, толстая кишка, морфология.

O. Iefimenko, postgraduate, O Savchenko, Ph.D., T. Falalayeva, Sc.D.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Kyric, Sc.D.

Co.Ltd "Capital" – MC "Unyversalnaya Clinic" Oberig", Kyiv, Ukraine,

M. Spivak, corresponding member

Danylo Zaboloty Institute of Microbiology and Virology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

MORPHOLOGICAL CHANGES OF GASTRIC AND COLONIC MUCOSA IN RATS OF DIFFERENT AGES UNDER THE ACTION OF NANOCRYSTALLINE CERIU DIOXIDE

We have studied the effect of nanocrystalline cerium dioxide (NCD) on the morphological state of the gastric mucosa and colon in rats of different ages. It was found the degenerative changes and dysregeneration (violation the ratio of value of major and parietal cells), atrophic or hyperplastic changes. NCD restored the processes of differentiation and proliferation of epithelial cells of gastric glands. In the control group of old rats mucosa of the colon was focal thinner, the cells had degenerative changes, it was observed the change in nuclear-cytoplasmic ratio of cells, were found foci of infiltration of lymphocytes, macrophages, plasma cells. NCD in old rats caused a decrease in the number of cells in a state of degeneration and apoptosis, increased proliferative activity of cells increased the number of goblet cells. Thus, NCD restored morpho-functional structure of the mucous of the stomach and colon.

Keywords: nanocrystalline cerium dioxide, stomach, colon, morphology.

3. Mandir N. Differences in the effects of age on intestinal proliferation, crypt fission and apoptosis in the small intestine and the colon of the rat / N. Mandir, A. J. FitzGerald, R. A. Goodlad // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 125–130.

4. Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa / Z. Q. Xiao, L. Moragoda, R. Jaszewski, J. A. Hatfield, S. E. Fligiel, A. P. Majumdar // *MechAgeingDev.* – 2001. – Vol. 122. – P. 1849–1864.

5. Milosevic P. D. A quantitative morphometric study of rectal mucosa in adult and aged healthy subjects / P. D. Milosevic, J. Trbojevic, N. M. Milicevic // *HistolHistopathol.* – 2007. – Vol. 22, N 4. – P. 433–436.

6. Estevez A. Y., Erlichman J. S. The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy / A. Y. Estevez, J. S. Erlichman // *Nanomedicine (Lond.)* – 2014. – Vol. 9(10). – P. 1437–1440.

7. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy / J. Niu, A. Azfer, L. M. Rogers, X. Wang, P. E. Kolattukudy // *Cardiovasc Res.* – 2007. – Vol. 1, N. 73(3). – P. 549–559.

8. Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain / K. L. Heckman, W. de Coteau, A. Estevez, K. J. Reed, W. Costanzo // *ACS Nano.* – 2013. – Vol. 7(12). – P. 10582–10596.

9. Cerium oxide nanoparticles protect gastro intestinal mucosa from ethanol induced gastric ulceration in vivo animal model / R. G. S. V. Prasad, R. Davan, S. Jothi, A. R. Phani, D. B. Raju // *NanoBiomedEng.* – 2013. – Vol. 5(1). – P. 46–49.

10. Ноздрачев А. Д. Анатомия крысы / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Полякова. – СПб.: Изд-во "Лань". – 2001. – 464 с.

11. Role of mitochondria in oxidative stress and aging / G. Lenaz, C. Bovina, M. D'Aurelio, R. Fato, G. Formigini // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 959. – P. 199–213.

12. Laine L. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside / L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 135. – P. 41–60.

13. Tarnawski A. S., Ahluwalia A., Jones M. K. Increased susceptibility of aging gastric mucosa to injury: the mechanisms and clinical implications / A. S. Tarnawski, A. Ahluwalia, M. K. Jones // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20(16). – P. 4467–4482.

14. Celardo I, Traversa E, Ghibelli L. Cerium oxide nanoparticles: a promise for applications in therapy // *Exp Ther Oncol.* – 2011. – Vol. 9(1). – P. 47–51.

Надійшла до редколегії 30.10.14

УДК 612.119+616.155.392-036.12+616.15-07

І. Свєженцева, асп., Д. Білько, канд. біол. наук, Н. Білько, д-р мед. наук
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ,
І. Дягіль, д-р мед. наук
ДУ "Науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ

ОСОБЛИВОСТІ ЕРИТРОПОЕЗУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ У РАЗІ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ

Проведено оцінку функціональної активності клітин еритроїдної ланки кровотворення пацієнтів при ХМЛ у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ (ІТК) першого та другого покоління. У зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії ІТК виявлено збільшення кількості еритроїдних колоній за умов наявності еритропоетину у середовищі для культивування. Крім того, було встановлено, що при стійкості до іматинібу та нілотинібу клітини лейкоїчного клону в культурі *in vitro* набувають здатності диференціюватися у еритроїдному напрямку за відсутності у середовищі для культивування екзогенного еритропоетину. Таким чином, визначення проліферативної активності еритроїдної ланки кровотворення у культурі клітин *in vitro* може слугувати важливим прогностичним фактором для подальшого вибору стратегії лікування.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, інгібітори тирозинкіназ, еритропоєз, культура клітин *in vitro*.

Вступ. Відомо, що при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ) виявляється збільшення в культурі клітин гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників, що свідчить про активацію мієлоїдної ланки гемопоєзу. Разом з тим, еритропоєз при ХМЛ в культурі клітин в залежності від способу лікування не вивчався, тому дослідження функціонування еритроїдної ланки гемопоєзу виявилось доречним. Молекулярний механізм ХМЛ полягає в тому, що захворювання виникає на рівні плюрипотентної стовбурової клітини-попередника мієлоїдної ланки кровотворення у результаті реципрокної транслокації між довгими плечима 9-ї та 22-ї хромосом [1]. Утворену при цій перебудові дериватну хромосому 22 називають Філадельфійською за місцем її виявлення [2]. На ній утворюється онкоген BCR-ABL, у результаті експресії якого формується онкопротеїн – BCR-ABL-тирозинкіназа. В наслідок її діяльності клітини лейкоїчного клону набувають проліферативної переваги, порівняно з нормальними клітинами кісткового мозку, незалежно від ростових та проапоптотичних факторів, а також характеризуються порушеною здатністю до диференціювання [1,2,3].

Загалом вважають, що ХМЛ – це захворювання, яке характеризується підвищенням кількості гранулоцитарно-макрофагальних клітин у кістковому мозку пацієнтів [4]. Однак, Філадельфійську хромосому також виявляють у еритроїдних клітинах, що свідчить про виникнення транслокації BCR-ABL у ранній клітині-попереднику, з якої походить еритроїдна, і гранулоцитарно-макрофагальна ланка кровотворення [5]. Крім того, у різних фазах ХМЛ кількість еритроїдних колоній відрізняється, як відрізняється й чутливість клітин-попередників еритропоєзу до еритропоетину [6]. Проте, вплив препаратів групи TKI на еритроїдну ланку кровотворення до кінця не вивчено.

Метою роботи було визначення особливостей функціонування еритроїдної ланки гемопоєзу в культурі клітин *in vitro* при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ.

Матеріали і методи. Досліджували пункти кісткового мозку 30 пацієнтів, котрі у якості протилейкемічної терапії отримували інгібітори тирозинкіназ (ІТК) – нілотиніб та іматиніб. Окрему групу складали пацієнти, у яких ХМЛ було діагностовано вперше (n=4). Для підтвердження діагнозу та оцінки відповіді на терапію ІТК здійснювали цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії, вираховуючи процентний вміст метафаз, що містять Ph-хромосому. Відповідно до показників цитогенетичного дослідження, пацієнти після 12 місяців прийому TKI підрозділялися на групи: ті, котрі мали оптимальну відповідь на терапію (кількість Ph-хро-

мосом у кістковому мозку складає 0%) та пацієнти, що характеризувалися відсутністю відповіді на лікування та стійкістю до препаратів, у кістковому мозку яких визначалося 1 – 100 % Ph⁺ клітин.

Зразки кісткового мозку поміщали у пробірку, що попередньо була оброблена гепарином (Sigma, США). Виділяли мононуклеари шляхом центрифугування у градієнті щільності Histopaque (Gibco, США) з густиною 1,077 г/мл. Отримані мієлокаріоцити культивували в метилцелюлозі та напіврідкому агарі *in vitro* за раніше опублікованими методиками [7]. Суспензію клітин для культивування готували із використанням середовища RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 20 % фетальної телячої сироватки (Invitrogen, Німеччина), 2 мМоль L-глутаміну (Sigma, США), пеніциліном та стрептоміцином (по 100 Од/мл) (Київмедпрепарат, Україна). Для культури в напіврідкому середовищі клітинну суспензію змішували з метилцелюлозою (Sigma, США) та проводили її культивування із розрахунку 1×10^5 клітин на комірку культурального планшету (Nunc, США), використовуючи 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (Sigma, США), 30 нг/мл еритропоетину (Sigma, США), по 20 нг/мл інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-9 (Sigma, США). Для культури в напіврідкому агарі суспензію клітин змішували з напіврідким агаром (Difco, США) концентрацією 0,33 % та гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором GM-CSF (Sigma, США) концентрацією 50 нг/мл. Культивування клітин кісткового мозку пацієнтів здійснювали у CO₂-інкубаторі (LEEC, Велика Британія) в умовах абсолютної вологості та 5% CO₂ у атмосфері, протягом 10 – 12 діб та оцінювали кількість клітинних агрегатів, а саме, кластерів (більше 5 клітин) та колоній (більше 50 клітин) за допомогою інвертованого мікроскопа (Olympus, Японія). За ефективність колонієутворення приймали кількість колоній, які формуються до 13-ї доби культивування на 1×10^5 експлантованих клітин.

Статистична обробка результатів проводилася за допомогою U-критерію Манна-Уїтні для порівняння непараметричних вибірок. Висновок про статистичну значущість результатів визначали при P<0,05.

Результати та їх обговорення. Внаслідок культивування отримували як гранулоцитарно-макрофагальні колонії та кластери, так і еритроїдні колонії – бурст утворюючі одиниці еритроїдні (БУО-Е), які складалися з дрібних клітин, що розміщувалися компактно та мали червоний відтінок за рахунок синтезу гемоглобіну клітинами-попередниками еритропоєзу (рис. 1). У комірці культурального планшету еритроїдні колонії переважно розміщувалися по периферії, біля стінок комірки.

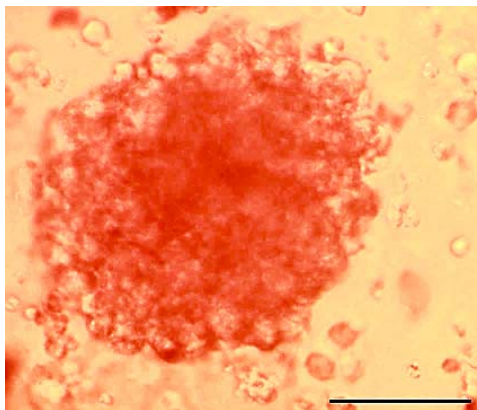


Рис. 1. Бурст-утворююча еритроїдна колонія при культивуванні в метилцелюлозі *in vitro* клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ першого та другого покоління. Інвертований мікроскоп. $\times 400$

У результаті аналізу функціональної активності клітин еритроїдної ланки кровотворення виявили, що у культурах гемопоетичних клітин різних груп їх кількість відрізняється (рис. 2). Так, у зразках кісткового мозку із вперше діагнованим ХМЛ кількість БУО-Е становила $51,3 \pm 1,8$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів. В

свою чергу, у культурах клітин кісткового мозку пацієнтів, що після терапії іматинібом та нілотинібом характеризувалися відсутністю клітин із Філадельфійською хромосомою, кількість БУО-Е була значно меншою та становила $17,2 \pm 0,8$ і $13,3 \pm 0,7$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів, відповідно.

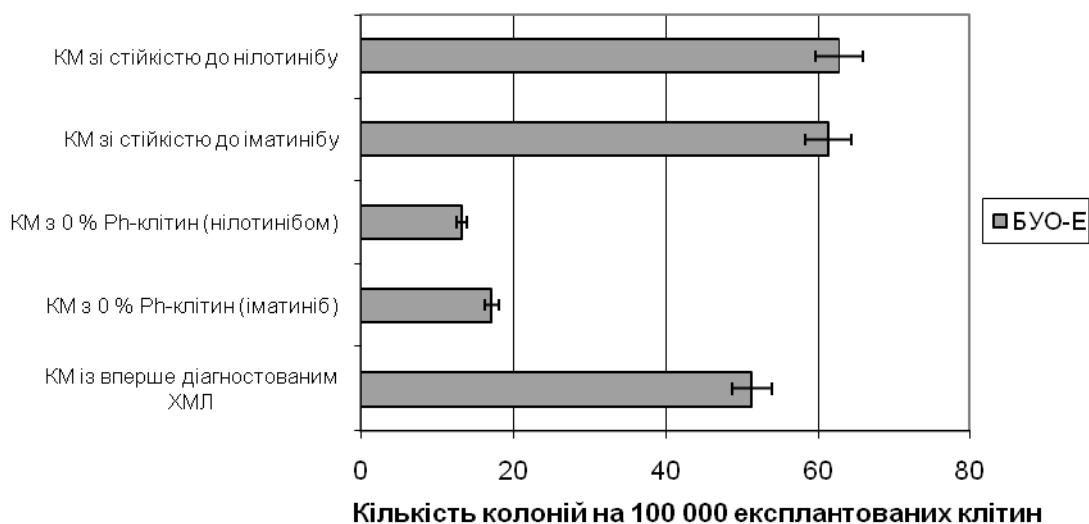


Рис. 2. Показники ефективності формування еритроїдних колоній кістковим мозком пацієнтів *in vitro*

Натомість у зразках кісткового мозку зі стійкістю до іматинібу кількість БУО-Е була значно вищою та становила $61,4 \pm 2,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, відповідно. У культурах кісткового мозку, що незважаючи на терапію нілотинібом містили клітини із Філадельфійською хромосомою, число БУО-Е сягало $62,8 \pm 3,2$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

Таким чином, при відновленні лейкоемічного клону внаслідок формування стійкості до препаратів групи ТКІ кількість еритроїдних колоній зростала порівняно з числом таких у зразках кісткового мозку, у яких, за даними цитогенетичного дослідження, не виявлялося клітин із Філадельфійською хромосомою. Наразі причини підвищення проліферативної активності клітин еритроїдного ростка кровотворення лишаються невідомими. Хоча в експериментальних дослідженнях виявляли пригнічення диференціювання гранулоцитарного ростка кровотворення та підвищення кількості БУО-Е у напіврідкому середовищі *in vitro* при введенні гену BCR-ABL у $CD34^+$ клітини кордової крові людини. Автори дослідження припустили, що процес перепрограмування ранніх клітин-попередників мієлоїдної

ланки кровотворення відбувається на користь еритроїдного ростка кровотворення [6]. Хоча в умовах *in vivo* зазвичай спостерігається розширення гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення. Ймовірно це відбувається за рахунок змін у спектрі регуляторних молекул кістково-мозкового мікрооточення [5].

З іншого боку, під час культивування мієлокаріоцитів у напіврідкому агарі *in vitro*, за умов присутності у культуральному середовищі лише гранулоцито-макрофагального росткового фактора та фетальної телячої сироватки, у культурах кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії іматинібом та нілотинібом спостерігалось спонтанне формування БУО-Е (рис. 3). Їх кількість була значно меншою, порівняно з культурами, що містили еритропоетин. Так, у зразках кісткового мозку, що незважаючи на терапію іматинібом містили клітини лейкоемічного клону, кількість БУО-Е становила $7,3 \pm 2,8$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів, а у культурах кісткового мозку зі стійкістю до нілотинібу число БУО-Е сягало $8,4 \pm 3,6$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

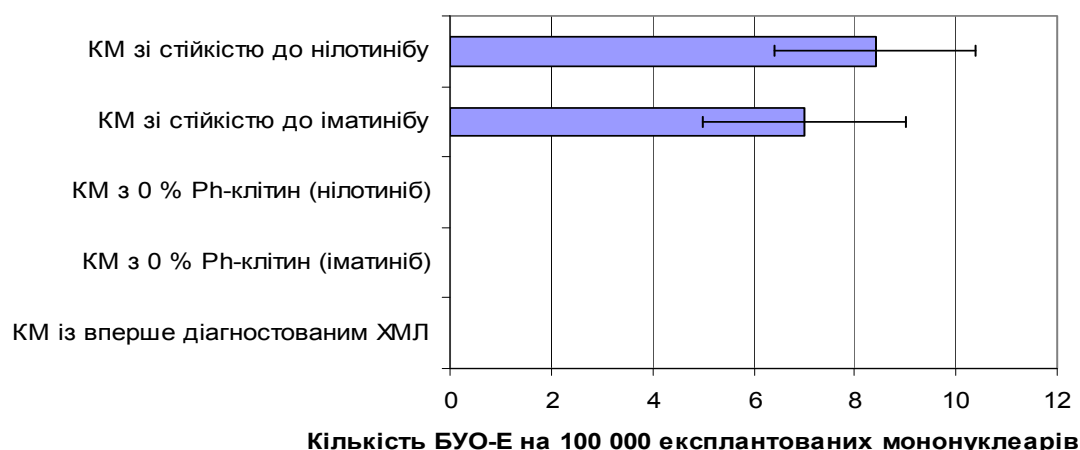


Рис. 3. Показники ефективності формування еритроїдних колоній зразків кісткового мозку досліджуваних груп за умов відсутності еритропоєтину у культуральному середовищі

З літературних джерел відомо, що фетальна теляча сироватка в суспензійній культурі *in vitro* сприяє синтезу гемоглобіну, але не сприяє диференціюванню мієлокаріоцитів у еритроїдному напрямку [6]. Однак, при ХМЛ наявність 10 % фетальної телячої сироватки може викликати спонтанне утворення еритроїдних колоній. Проте, у нашому дослідженні спонтанного утворення колоній у зразках кісткового мозку пацієнтів із вперше діагнованим ХМЛ не спостерігалось. Так, Ш. Ісаад та колеги припустили, що причиною еритропоєтиннезалежної появи КУО-Е у культурах клітин кісткового мозку при ХМЛ може бути підвищена кількість рецептора еритропоєтину на поверхні клітин лейкоемічного клону, яка викликана підвищеною експресією BCR-ABL [6]. Виходячи з цього твердження, ми можемо припустити, що у клітинах кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії ІТК могла відбутися ампліфікація гену BCR-ABL, що й могло призвести до його надекспресії та підвищення кількості рецепторів до еритропоєтину на поверхні лейкоемічних клітин. Визначені характерні відмінності у культивуванні гемопоетичних клітин кісткового мозку у пацієнтів зі стійкістю до препаратів ТКІ при ХМЛ свідчать про те, що еритроїдні клітини попередники є більш чутливими до еритропоєтину, який може синтезуватися в культурі *in vitro* у якості аутокринного фактору безпосередньо гемопоетичними та мікрооточення за умов наявності фетальної телячої сироватки.

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать, що при набутті клітинами лейкоемічного клону стійкості до іматинібу та нілотинібу кількість БУО-Е підвищується за умов наявності у культуральному середовищі еритропоєтину. Крім того, при відсутності екзоген-

ного еритропоєтину у культуральному середовищі клітини кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до зазначених тирозинкіназних інгібіторів набувають здатності диференціюватися у еритроїдному напрямку, що може бути зумовлено підвищенням експресії онкогену BCR-ABL. Отримані дані свідчать про те, що визначення функціональної активності еритроїдних клітин-попередників пацієнтів при ХМЛ може використовуватися у якості додаткового методу моніторингу відповіді пацієнтів на терапію інгібіторами тирозинкіназ.

Список використаних джерел

1. Deininger M. W. The Molecular Biology Of Chronic Myeloid Leukemia / M. W. Deininger, J. M. Goldman, J. V. Melo // Blood. – 2000. – Vol. 15 (10). – P. 3343–3356.
2. Goldman J. M. Chronic Myeloid Leukemia – Advances in Biology and New Approaches to Treatment / J. M. Goldman, J. V. Melo // The New England Journal of Medicine – 2003. – Vol. 15 (9). – P. 1451–1464.
3. Frazer R. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century / R. Frazer, A. E. Irvine, M. F. McMullin // Ulster Med. – 2007. – Vol. 76 (1). – P. 8–17.
4. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML / Catriona H. M. Jamieson, et al. // New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 351 (7). – P. 657–667.
5. Issaad C. Growth of erythroid colonies in chronic myelogenous leukemia is independent of erythropoietin only in the presence of steel factor / C. Issaad, W. Vainchenker // Blood. – 1994. – Vol. 84 (10). – P. 3447–3456.
6. Mayani H. In vitro biology of human myeloid leukemia / H. Mayani, E. Flores-Figueroa, E. Chavez-Gonzalez // Leukemia Research. – 2009. – Vol. 33. – P. 624–637.
7. Helgason C. D. Basic Cell Culture Protocols / Cheryl D. Helgason, Cindy L. Miller. – N. Y. : Humana Press. – 2004.

Надійшла до редколегії 30.10.14

И. Свеженцева, асп., Д. Билько, канд. биол. наук, Н. Билько, д-р мед. наук
Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина,
И. Дягиль, д-р мед. наук
ДУ "Научный центр радиационной медицины АМН Украины", Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА

ПРИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ

Проведена оценка функциональной активности клеток эритроидного звена кроветворения пациентов при ХМЛ при терапии ингибиторами тирозинкиназы первого и второго поколения. В образцах костного мозга пациентов с резистентностью к терапии ингибиторами тирозинкиназ показано увеличение количества эритроидных колоний при условии наличия в среде для культивирования эритропоэтина. Кроме того, было установлено, что при резистентности к иматинибу и nilotinibu клетки лейкоемического клона в культуре *in vitro* приобретают способность дифференцироваться в эритроидном направлении при отсутствии в среде для культивирования экзогенного эритропоэтина. Таким образом, определение пролиферативной активности эритроидного звена кроветворения в культуре клеток *in vitro* может служить важным прогностическим фактором для дальнейшего выбора стратегии лечения.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, ингибиторы тирозинкиназ, эритропоэз, культура клеток *in vitro*.

I. Sviezhentseva, PhD stud., D. Bilko, PhD, N. Bilko, DSc.
National University of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine,
I. Dyagil, DSc
ND "Scientific Center for Radiation Medicine, Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

FEATURES OF THE ERYTHROPOIESIS UPON TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA WITH TYROSINE KINASE INHIBITOR

A functional activity of erythroid hematopoietic cells of patients with chronic myeloid leukemia, who were treated with tyrosine kinase inhibitor of the first and second generation was investigated. Samples of bone marrow of patients with resistance to tyrosine kinase inhibitor treatment show an increase of erythroid colonies number provided that there is erythropoietin in the culture medium. Furthermore, it was found that clone cells in culture in vitro acquire the ability to differentiate towards erythroid direction in the absence of a culture medium culturing exogenous erythropoietin when they have a resistance to imatinib and nilotinib. Thus, the determination of proliferative activity of erythroid hematopoiesis level in cultured cells in vitro may serve as an important prognostic factor for the further choice of treatment strategy.

Key words: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, erythropoiesis, cell culture in vitro.

УДК 577.121.7

К. Дворченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЗМІНИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО БАЛАНСУ ПЕЧІНКИ ТА ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ПРИ ГІПОАЦИДНОМУ СТАНІ ШЛУНКА ТА ПОШУК ПІДХОДІВ ДО ЙОГО ВІДНОВЛЕННЯ

Встановлено, що у печінці та підшлунковій залозі щурів при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії порушується енергетичний баланс, про що свідчить зниження вмісту АТФ на фоні збільшення рівня АДФ та АМФ. Мультипробіотик "Симбітер®" сприяє відновленню рівноваги аденілових нуклеотидів у досліджуваних органах щурів з гіпоацидним станом шлунка.

Ключові слова: тривала шлункова гіпохлоргідрія, підшлункова залоза, аденілові нуклеотиди, мультипробіотик.

Вступ. Значне місце серед патологій травної системи займають гіпоацидні стани, які виникають внаслідок порушення секреції гідрохлоридної кислоти парієтальними клітинами шлунка. Шлункова гіпохлоргідрія має поліетіологічну природу та є наслідком ряду захворювань (атрофічний гастрит, інфекція *H. pylori*, аутоімунні порушення), розвивається при старінні та є результатом прийому фармакологічних препаратів, які гальмують продукування гідрохлоридної кислоти в шлунку (антагоністи H₂-рецепторів та інгібітори протонної помпи) [1, 2].

Шлункова гіпохлоргідрія призводить до цілої низки негативних наслідків у шлунково-кишковому тракті (ШКТ): зниження активації пепсину та інших протеолітичних ферментів, погіршення процесів розщеплення білків та утворення токсичних проміжних продуктів їх розпаду, порушення моторики шлунка та кишечника, зниження всмоктування мікроелементів (Cu, Zn, Se, ін.), вітаміну В₁₂, гіпергастринемії, розмноження патогенної мікрофлори та розвитку дисбіозів [3, 4, 5]. Таким чином, зниження рівня або ж повна відсутність гідрохлоридної кислоти у шлунковому соку є небезпечним станом для здоров'я людини. Зокрема, існує зв'язок між гіпоацидними станами шлунка та можливим розвитком патологічних змін у печінці та підшлунковій залозі [6, 7, 8]. Розвиток патологічних процесів супроводжується зміною енергетичного статусу клітин, від якого залежить баланс та сполучення перебігу біологічних процесів в організмі. Ядром енергетичного обміну клітин є метаболізм аденілових нуклеотидів [9]. Таким чином, баланс АТФ, АДФ та АМФ є інформативним показником при оцінці важкості перебігу патологічного процесу. Для корекції патологічних змін у печінці та підшлунковій залозі щурів з гіпоацидним станом шлунка ми використовували мультипробіотичний препарат ("Симбітер® ацидофільний" концентрований ("Симбітер®")), який здатний зменшувати розлади в травній та інших системах організму [10].

Тому метою роботи було визначити вміст аденілових нуклеотидів у печінці та підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та при введенні мультипробіотика "Симбітер®".

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г з дотриманням загальних етичних

принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Першій групі тварин (контроль) вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій один раз на добу упродовж 28 днів. Другій групі тварин (контроль на введення пробіотику) вводили перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик "Симбітер®", розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 днів. Третій групі тварин (модель тривалої шлункової гіпохлоргідрії) вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол один раз на добу упродовж 28 днів. Четвертій групі тварин сумісно вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол, розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій, та перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик "Симбітер®", розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 днів.

Розділення та кількісне визначення аденілових нуклеотидів у тканині печінки та підшлункової залози проводили методом тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинках UV-254 за методом [11]. Пряму денситометрію пластин у відбитому світлі здійснювали на швидкісному сканері денситометра CS-920 "Shimadzu" (Японія) у напрямку руху розчинника при довжині хвилі 260 нм. Вміст досліджуваних сполук у хроматографічних плямах визначали за допомогою калібрувальних кривих залежності площі плями від кількості нанесених хроматографічно чистих препаратів АМФ, АДФ та АТФ. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента [12].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у печінці щурів вміст АТФ знижується в 1,6 раза ($p < 0,01$), при цьому підвищується вміст АДФ та АМФ відповідно в 1,4 раза ($p < 0,01$) та в 1,3 раза ($p < 0,01$) відносно контролю (табл. 1). За даних умов експерименту у печінці сумарний вміст аденінінуклеотидів та енергетичний заряд клітин печінки знижується в 1,2 раза порівняно з контрольною групою (табл. 1). В умовах введення му-

льтипробіотика "Симбітер®" щурам з тривалим зниженням шлункової секреції гідрохлоридної кислоти баланс аденілових нуклеотидів у печінці частково відновлюється: вміст АТФ підвищується в 1,4 раза ($p < 0,05$), при цьому спостерігається тенденція до зниження вмісту

АДФ та АМФ в 1,2 раза ($p < 0,1$) відносно групи щурів з гіпоацидним станом шлунка (табл. 1). Поряд з цим у гепатоцитах сумарний вміст аденінінуклеотидів та енергетичний заряд клітин частково відновлюється (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст аденілових нуклеотидів у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії, мкмоль $\times$ г тканини⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Групи тварин	Контроль	Мультипробіотик	Омепразол	Омепразол + мультипробіотик
АТФ		$2,61 \pm 0,25$	$2,78 \pm 0,27$	$1,59 \pm 0,15^{**}$	$2,18 \pm 0,21^{*#}$
АДФ		$0,93 \pm 0,08$	$0,87 \pm 0,08$	$1,28 \pm 0,09^{**}$	$1,08 \pm 0,07^{*#}$
АМФ		$0,38 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,04^{**}$	$0,42 \pm 0,03^{*#}$
АТФ + АДФ + АМФ		$3,92 \pm 0,35$	$4,01 \pm 0,36$	$3,38 \pm 0,31$	$3,68 \pm 0,33$
Енергетичний заряд аденілатної системи		$0,78 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,07$

** – $p < 0,01$ відносно контролю; \$ – $p < 0,1$; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили омепразол

В умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі щурів спостерігається порушення рівноваги аденілових нуклеотидів: вміст АТФ знижується в 2,1 раза ($p < 0,01$), при цьому підвищується вміст АДФ та АМФ відповідно в 1,7 раза ($p < 0,01$) та в 1,5 раза ($p < 0,01$) відносно контрольної групи (табл. 2). За даних експериментальних умов у підшлунковій залозі знижується сумарний вміст аденінінуклеотидів та енергетичний заряд клітин, відповідно в 1,2 раза та в 1,3 раза порівняно з контролем (табл. 2).

У групі щурів з гіпоацидним станом, яким вводили мультипробіотик "Симбітер®", у підшлунковій залозі вміст досліджуваних компонентів аденілової системи повертається до фізіологічних значень: АТФ підвищується в 1,5 раза ($p < 0,05$), при цьому вміст АДФ та АМФ знижується відповідно в 1,3 раза ($p < 0,05$) та в 1,2 раза ($p < 0,05$) відносно групи щурів з тривалою шлунковою гіпохлоргідрією (табл. 2). У тканині підшлункової залози виявлено незначне відновлення сумарного вмісту аденілових нуклеотидів та енергетичного заряду (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст аденілових нуклеотидів у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії, мкмоль $\times$ г тканини⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Групи тварин	Контроль	Мультипробіотик	Омепразол	Омепразол + мультипробіотик
АТФ		$1,28 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,13$	$0,61 \pm 0,06^{**}$	$0,91 \pm 0,09^{*#}$
АДФ		$0,46 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,07^{**}$	$0,59 \pm 0,05^{*#}$
АМФ		$0,19 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,02^{**}$	$0,23 \pm 0,01^{*#}$
АТФ + АДФ + АМФ		$1,93 \pm 0,18$	$1,96 \pm 0,18$	$1,67 \pm 0,15$	$1,73 \pm 0,16$
Енергетичний заряд аденілатної системи		$0,78 \pm 0,07$	$0,81 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,06$

+ – $p < 0,1$; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили омепразол

Аналіз отриманих результатів свідчить, що в умовах нестачі гідрохлоридної кислоти у шлунковому соку у печінці та підшлунковій залозі змінюється баланс аденілового нуклеотидного фонду, що вказує на порушення енергетичного статусу клітин. Оскільки рівень АТФ, АДФ та АМФ відображає рівновагу між реакціями, які призводять до їх утворення та використання, то відповідно для оцінки отриманих результатів необхідно врахувати ряд факторів, що визначають кількість цих нуклеотидів у досліджуваних тканинах.

Рівновага в аденіловій системі та її пул залежать від двох типів реакцій в клітині: 1) реакції за участю фосфату; 2) реакції за участю аденіну. Перші умовно можна розділити на фосфоролітичні та пірофосфоролітичні. Якщо фосфоролітичні забезпечують в основному активний перенос різних речовин і деякі інші види роботи, то пірофосфоролітичні, головним чином, беруть участь в реакціях синтезу. Ці два типи реакцій (особливо фосфоролітичні) добре регулюються системними показниками аденілових нуклеотидів, які характеризують ступінь фосфорилування (енергетичний заряд Еткінсона, фосфатний потенціал). Реакції синтезу за участю аденілового кільця є типовими реакціями пірофосфоролізу – синтез РНК, піридинових і флавінаденінових нуклеотидів, коензиму А, синтез сполук типу полі-А. Пул нуклеотидів буде залежати від відношення швидкості реакцій притоку аденілових нуклеотидів та швидкості відтоку (синтез сполук за участю аденілового кільця, розпад

його до сечовини або перетворення в інозинові та гуанінові похідні) [13, 14].

Встановлене нами зниження вмісту АТФ у печінці та підшлунковій залозі щурів з омепразол-індукованою гіпоацидністю може відбуватись за рахунок його посиленого катаболізму та виходу з клітини. Можливий наступний механізм зменшення пула вільних нуклеотидів в клітинах: дефосфорилування АТФ та накопичення АДФ і АМФ, подальше дезамінування АМФ та утворення гіпоксантину, який в свою чергу проникає у позаклітинне середовище. Встановлене нами у попередніх дослідженнях [15, 16] накопичення окислених продуктів структурної організації мембран печінки та підшлункової залози взаємопов'язане з іншими мембраноушкоджуючими механізмами, зокрема, з дефіцитом енергії в клітині. Відомо, що зростання вмісту АМФ є фактором, який призводить до стимуляції процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в клітині. Взаємозв'язок процесів ліпідної пероксидації з порушенням в органах метаболізму багатих енергією сполук реалізується як через виникаючий енергодефіцит, так і через наростаючий ацидоз. Посилення процесів ПОЛ при енергодефіциті пов'язано з низкою факторів: порушенням роботи АТФ і втратою іонного гомеостазу (перевантаження клітини кальцієм), зміною структурної організації мембран через їх дефосфорилування, порушенням синтезу і ресинтезу мембранних фосфоліпідів [17, 18]. Оскільки АТФ є універсальним джерелом енергії, виявлене зниження

рівня АТФ у печінці та підшлунковій залозі в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії сприяє порушенню всіх біосинтетичних процесів та превалюванню катаболічних процесів в клітині.

Порушення балансу аденілових нуклеотидів може спричинити розлад іонного обміну в клітинах печінки та ПЗ. Зокрема, порушити транспорт калію, оскільки АТФ та АДФ у мікромолярних концентраціях пригнічують його транспорт АТФазами. Також, може змінюватись перенесення кальцію, оскільки АДФ є високоспецифічним стимулятором його транспорту, який здатний змінювати конформаційний стан гідрофільної та гідрофобної частин Са-АТФази. Такі зміни впливають і на міжбілкові взаємодії, що модифікують і властивості кальцієвих каналів, які можуть утворюватись на ділянках білок-білкових контактів. Так як тільки у присутності АТФ Са-АТФази знаходяться у зміненому конформаційному стані, то після виснаження цього субстрату молекули субстрату релаксують у вихідне положення. Процес релаксації відбувається повільно, тому ще деякий час канали функціонують [19, 20].

Зниження рівня АТФ також може спричинити порушення блебінгу плазматичних мембран клітин печінки та підшлункової залози, оскільки це енергозалежний процес [21, 22].

Аналіз направленості виявлених при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії змін стаціонарного стану системи АТФ-АДФ-АМФ у печінці та підшлунковій залозі вказує на створення у клітинах умов, за яких може змінюватись більшість біохімічних процесів: реакції фосфорилювання-дефосфорилювання білків (білків-каналів, білків-ферментів та інших білків), ліпідів, вуглеводів та ін. Також, порушення енергетичного обміну, зокрема зниження загального внутрішньоклітинного фонду аденіну-нуклеотидів, знижує адаптаційні можливості організму в умовах дії негативних факторів.

Мультипробіотик "Симбітер[®]" сприяє відновленню енергетичного балансу клітин печінки та підшлункової залози щурів з гіпоацидним станом шлунка за рахунок ряду механізмів: зниження розвитку окисного стресу, в результаті чого зменшуються потреби у макроергічних сполуках, та синтез бактеріями речовин, які є біологічно активними субстратами енергетичного обміну клітин [23]. Таким чином, досліджуваний мультипробіотичний препарат здійснює стимулюючий вплив на енергетичний обмін в клітині.

Висновки

Показано, що при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії порушується рівновага аденілових нуклеотидів у клітинах печінки та підшлункової залози, що супроводжується зростанням вмісту АДФ та АМФ на фоні зниження вмісту АТФ. За даних експериментальних умов зафіксовано зменшення енергетичного заряду клітин, що свідчить про порушення мітохондріального синтезу АТФ, розлади процесів фосфорилювання і дефосфорилювання макроергічних сполук та превалювання катаболічних процесів у досліджуваних органах.

Виявлено, що введення мультипробіотика "Симбітер[®]" щурам з гіпоацидним станом шлунка сприяє відновленню пулу аденілових нуклеотидів та енергетичного заряду клітин печінки та підшлункової залози. Отри-

мані дані вказують на те, що при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії дестабілізація енергетичного балансу печінки та підшлункової залози пов'язана з розвитком дисбіозу травної системи.

Список використаних джерел

1. Beales I. L. H. pylori-associated hypochlorhydria / I. L. Beales // *Gastroenterol.* – 1998. – Vol. 3. – P. 618–621.
2. Jensen R. T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas / R. T. Jensen // *Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol.* – 2006. – Vol. 98. – P. 4–19.
3. Williams C. Proton pump inhibitors and bacterial overgrowth / C. Williams, K. E. L. McColl // *Alimentary pharmacol. and Therapeutic.* – 2006. – Vol. 23. – P. 3–10.
4. Fossmark R. Gastric cancer: Animal studies on the risk of hypoacidity and hypergastrinemia / R. Fossmark, G. Qvigstad, H. L. Waldum // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14, № 11. – P. 1646–1651.
5. Canani R. Gastric acidity inhibitors and the risk of intestinal infections / R. Canani, G. Terrin // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 26, № 1. – P. 31–35.
6. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study / A. Sundstrom et al. // *Pharmacoepidemiol. Drug Safe.* – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 141–149.
7. Small intestine bacterial overgrowth in patients with chronic pancreatitis / A. Mancilla [et al.] // *Revista medica de Chile.* – 2008. – Vol. 136, № 8. – P. 976–980.
8. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease / V. Brauersreuther et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18, № 8. – P. 727–735.
9. Энергетический обмен клетки в норме и патологии. Возможности его оценки / Нагорная Н. В. [и др.] // *Здоровье ребенка.* – 2008. – Т. 6, № 15. – С. 69–71.
10. Янковский Д. С. Особенности отечественных мультипробиотиков / Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // *Соврем. педиатрия.* – 2009. – № 3, т. 25. – С. 79–86.
11. Майданюк А. В. Методичні аспекти ТШХ аденілових нуклеотидів на силкагелі / А. В. Майданюк // *Вісн. КНУ ім. Т. Шевченка. Біологія.* – 2002. – Вип. 36–37. – С. 94–97.
12. Плохинский М. А. Математические модели в биологии / М. А. Плохинский. – М.: Изд-во Моск. ун-та., 1981. – 265 с.
13. Evidence of a new phosphoryl transfer system in nucleotide metabolism / D. Vannoni et al. // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, № 1. – P. 271–285.
14. Energy metabolism in eukaryotes biochemistry and evolution of anaerobic / M. Müller et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2012. – Vol. 76, № 2. – P. 444–495.
15. Стрес-респонсивні системи підшлункової залози щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика "Симбітер[®]" / К. О. Дворченко, С. Є. Вакал, А. С. Драничина, С. А. Сенін, Л. І. Остапченко // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – Т. 85, № 2. – С. 62–71.
16. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF- β і HGF у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер[®] / К. О. Дворченко, О. О. Берник, А. С. Драничина, С. А. Сенін, Л. І. Остапченко // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114–123.
17. Effect of 5-nitroindole on adenylate energy charge, oxidative phosphorylation, and lipid peroxidation in rat hepatocytes / M. Dubin et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 48, № 7. – P. 1483–1492.
18. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress / B. Tavazzi et al. // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, № 3. – P. 684–689.
19. Interaction of ATP with the phosphoenzyme of the Na⁺,K⁺-ATPase / M. Khalid et al. // *Biochem.* – 2010. – Vol. 49, № 6. – P. 1248–1258.
20. Nucleotide activation of the Ca-ATPase / J. M. Autry et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 46. – P. 39070–39082.
21. Florine-Casteel K. Lipid order in hepatocyte plasma membrane blebs during ATP depletion measured by digitized video fluorescence polarization microscopy / K. Florine-Casteel, J. J. Lemasters, B. Herman // *FASEB J.* – 1991. – Vol. 5, № 7. – P. 2078–2084.
22. Changes in membrane properties during energy depletion-induced cell injury studied with fluorescence microscopy / Y. Wu et al. // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 71, № 1. – P. 91–100.
23. Cani P. D. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism / P. D. Cani, A. Everard, T. Duparc // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 13, № 6. – P. 935–940.

Надійшла до редколегії 15.10.14

К. Дворщенко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПРИ ГИПОАЦИДНОМ СОСТОЯНИИ ЖЕЛУДКА И ПОИСК ПОДХОДОВ К ЕГО ВОССТАНОВЛЕНИЮ

Установлено, что в печени и поджелудочной железе крыс при длительной желудочной гипохлоридрии нарушается энергетический баланс, о чем свидетельствует понижение содержания АТФ на фоне повышения уровня АДФ и АМФ. Мультипробиотик "Симбитер®" способствует восстановлению равновесия адениловых нуклеотидов в исследуемых органах крыс с гипоацидным состоянием желудка.

Ключевые слова: длительная желудочная гипохлоридрия, поджелудочная железа, адениловые нуклеотиды, мультипробиотик.

K. Dvorshchenko, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CHANGES OF ENERGY BALANCE OF RAT LIVER AND PANCREAS UPON GASTRIC HYPOACIDITY AND SEARCH OF APPROACHES FOR ITS RECOVERY

It was established that the energy balance was disturbed in liver and pancreas of rats with long-term gastric hypochlorhydria, suggesting a decreased of ATP content while ATP and AMP levels were increasing. Multiprobiotic "Symbiter®" restored adenine nucleotides balance in the analyzed organs of rats with gastric hypoacidity state.

Key words: long-term gastric hypochlorhydria, pancreas, adenine nucleotides, multiprobiotic.

УДК 577.151.042.5:612.115

N. Raksha, PhD, M. Burlova-Vasylieva, PhD student, E. Torgalo, PhD., A. Savchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE APPEARANCE OF MOLECULES OF PROTHROMBIN ORIGIN IN BLOOD UPON DEVELOPMENT OF ATHEROTHROMBOTIC AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE

Increase of molecules of prothrombin origin in patients with atherothrombotic and cardioembolic stroke subtypes had been shown. It was found the presence of protein fractions in the range of molecular weights corresponding to both prothrombin molecules and its degraded forms.

Key words: prothrombin time, molecules of prothrombin origin, atherothrombotic, cardioembolic stroke.

Introduction. Cerebrovascular diseases are currently the actual problem of modern medicine since they are one of the leading cause of disability and the second most common cause of mortality and morbidity among the working population aged 40-60 years [5]. A dominant role in the structure of all cerebrovascular diseases belongs to acute ischemic cerebrovascular accident – up to 70 % of all strokes are considered as ischemic (cerebral infarction). In accordance with the main mechanism of development there are atherothrombotic and cardioembolic stroke subtypes. In the first case, the acute cerebral blood flow failure is caused by blood clots formation and blockage of the lumen of blood vessels in the place of atherosclerotic plaque localization; occlusion of the arteries that nourish the brain by cardiac emboli takes place in the case of cardioembolic stroke [5]. Clinical features that support the diagnosis of these pathologies include motor, language, visual, coordination and cognitive impairments. More complete laboratory screening of patients with ischemic cerebrovascular disease for currently identified prothrombotic states will probably increase the percentage of strokes attributed to disorders of hemostasis. One of the leading pathogenetic factors of cerebrovascular ischemia is the disruption of homeostasis that results in intravascular thrombosis, changes in blood rheology and microcirculation disturbances in ischemic tissues [12]. Detailed definition of the molecular mechanisms underlying the development of these diseases is crucial not only in terms of the creation of new drugs directed action, guide the most effective care and therapy, but also will provide great perspectives in the field of clinical diagnostic of pathological manifestations of hemostasis.

Given that treatment of stroke is limited, the best way to reduce the negative effects of this pathological condition – timely primary prevention, individual approach to treatment and rehabilitation. Study of the causes and mechanisms of stroke development and search of new biomarkers that can

be used in diagnostics to identify individuals at high risk of disease development is very relevant for today.

Taking into account the involvement of blood coagulation system in the pathogenesis of ischemic strokes, the main goal of our work was to investigate the functional state of prothrombin – a precursor of key regulatory enzyme thrombin that converts soluble fibrinogen to fibrin monomers, further polymerization of that is the basis for the formation of a blood clots.

Materials and methods. Donor's plasma (n=66 for patients with atherothrombotic ischemic stroke and n=56 for patients with cardioembolic ischemic stroke) was obtained by cubital vein puncture using tubes with sodium citrate solution (38 g/l) in the final ratio of 9:1. Patients' plasma one day after the ischemic stroke was used in our experimental work. Determination of prothrombin time was supplied by kits and reagents of "Renam" company (Belarus). Prothrombin obtained by sorbing the vitamin K-dependent proteins on barium sulfate followed by extraction with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.2 M NaCl and 0.02 M EDTA. Electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate was performed according to the method Laemmli using tris-glycine system. Immunoenzymatic assay and Western blot method were carried out in consist of standard protocols for soluble proteins [8, 11]. Prothrombin and its derivatives identification was done using rabbit polyclonal antibodies (Shijin International, Mongolia) to prothrombin. Mathematical and statistical processing of obtained results was performed using the computer program Origin 7.0. The difference between groups was analyzed by standard Student's t-test. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Present data are typical for series of repeated experiments (at least five in each series).

Results and discussion. Hemostasis is one of the most complex physiological self-defense systems which ensure blood fluidity, the maintenance of the rheological

properties in the physiological ranges and rapidly induces hemostatic plug formation in order to stop or limit bleeding [4, 12]. Haemostatic imbalance in one or another direction, due to the influence of both internal and external factors increases the risk of bleeding or thrombosis. The study of the functional state of prothrombin causes of considerable interest because of prothrombin involvement not only in the realization of a number of physiological reactions but also because of interfering in major physiopathological processes, in particular, the regulation of vascular tone, wounds healing, immune response implementation, development of inflammation, tumors, Alzheimer's disease, atherogenesis and others [11]. The evolution of our knowledge of the physiology of hemostasis has numerous implications for therapy. It is known that changes in hemostatic system at ischemic stroke are accompanied by significant activation of blood coagulation system. Defects associated with the pathways of blood coagulation can be assessed with specific tests. In order to estimate the activity of factors of extrinsic pathway of blood coagulation,

we determined prothrombin time (PT) in patients suffering from atherothrombotic and cardioembolic strokes. Determination of the prothrombin time was performed at different time points, in particular on the 1th day after ischemic stroke as well as on the 7th and 14th day after stroke development. According to obtained results (Table 1) prolongation of PT was observed in patients with both subtypes of stroke but only on the first day after stroke development. So, prolongation of PT by 1.12 and 1.19 times was established respectively for atherothrombotic and cardioembolic stroke. As data of anamnesis of patients allowed excluding hereditary coagulopathy, disorders of the functional state of the liver, caused by illnesses of different etiologies, presence of disseminated intravascular coagulation syndrome, PT prolongation is mainly due to the application at the period of blood sampling anticoagulation medications or can indicate the presence of non-physiological inhibitors of coagulation cascade and phospholipid-dependent reactions in the bloodstream [7].

Table 1. Prothrombin time (sec) in patients with atherothrombotic and cardioembolic stroke (M±SEM, n=6)

	Control	Atherothrombotic stroke	Cardioembolic stroke
1 day after ischemic stroke	17,1±0,22	19,26 ± 0,69*	20,5 ± 0,58*
7 day after ischemic stroke		17,1 ± 0,38	17,9 ± 0,25
14 day after ischemic stroke		17,45 ± 0,22	17,7 ± 0,32

* – $p \leq 0,05$

So, one of the recently discovered and insufficiently studied risk factors for ischemic stroke development is a production of antibodies directed toward a phospholipid-binding protein, in particular to prothrombin. The ability of these antibodies reduce the functional activity of the target proteins promotes disturbance of pro- and anticoagulant balance. To clarify the characteristics of blood coagulation system, we measured the total pool of molecules of

prothrombin origin. Using of polyclonal antibodies allowed us to estimate the content not only directly prothrombin, but also molecules containing epitopes of prothrombin origin, in particular, intermediates of prothrombin activation, thrombin molecules and their complexes. As seen in the results presented in Figure 1, the increase of pool of prothrombin derivatives occurs at both types of stroke.

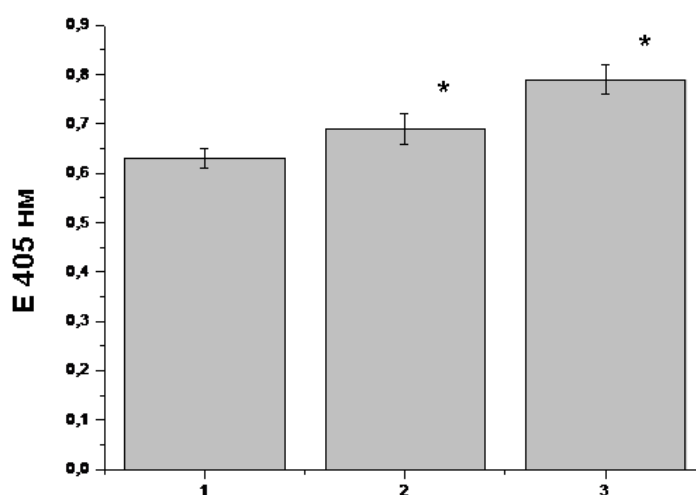


Figure 1. Level of prothrombin molecules pool:

1 – control; 2 – patients with atherothrombotic stroke; 3 – patients with cardioembolic stroke; * – $p \leq 0,05$

Level of prothrombin pool at atherothrombotic stroke exceeded control value by 10%, while the development of cardioembolic stroke was accompanied by an increase in the content of prothrombin by 25% compared to the same reference group. As more expressed changes in prothrombin derivatives content were observed in the case of

cardioembolic stroke we attempted to detail the composition of prothrombin molecules origin pool exactly under this pathology. Typical blotograma of plasma proteins separation of individuals that suffer from cardioembolic stroke is shown in Figure 2 (track 2, 3).

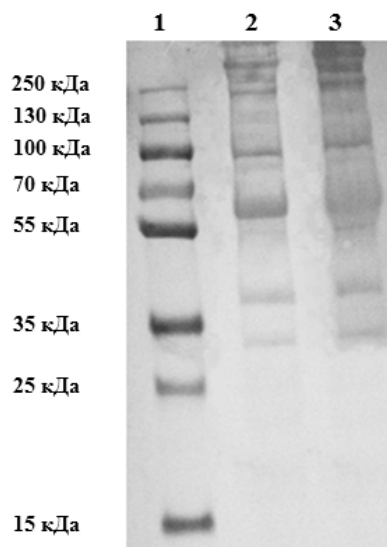


Figure 2. Blotogram of blood plasma of patients with cardioembolic stroke:

1 – molecular weight markers (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 kDa); 2, 3 – prothrombin molecules pool

Analysis of Western blot results using specific polyclonal antibodies to prothrombin showed the presence of protein fractions in the range of molecular weights corresponding to both prothrombin and its degraded forms. Thus, the data presented in blotogram provide evidence that protein fractions with molecular weight about 72 and 37 kDa (track 2, 3) are formed, respectively, by prothrombin and thrombin molecules [4]. It should be noted that generation of thrombin can be confirmed by accumulation in plasma N-terminal part of prothrombin molecule – fragment F₁₊₂ [9], the molecular weight of that is about 40 kDa. Physiological activation of prothrombin, except formation of thrombin, can be accompanied by accumulation of a number of intermediates, some of that possess enzymatic activity (meizothrombin, meizothrombin 1) and other one belongs to the functionally inactive derivatives (prethrombin 1, 2, fragments 1, 2, 1+2). Protein fractions with molecular weight about 50 and 37 kDa (track 2, 3) may consist of prethrombin 1 and 2, which is agreed with literature, according to that their appearance in the bloodstream serves as an early marker of intravascular coagulation [4]. Meizothrombin (mol. weight about 70 kDa) is one of the transient intermediates that are produced during the conversion of prothrombin to thrombin in systems composed of purified factor Xa and factor Va that are quantitatively assembled on an anionic phospholipid surface. An undisputed and potentially important role for meizothrombin is as a mediator of vascular constriction. Meizothrombin has potent vasoconstrictive activity, approximately fivefold greater than α -thrombin. Meizothrombin participation in the mechanisms of thrombogenesis is related to its ability to influence on platelet hemostasis. Causing a secondary irreversible platelet aggregation meizothrombin helping to attract new platelets in formation of blood clots [3]. The insensitivity of meizothrombin to the action of the main physiological thrombin inhibitors acquires special importance during anticoagulation therapy. An additional factor that results in increase of procoagulant potential of hemostasis under conditions of meizothrombin accumulation is the ability of meizothrombin to activate factors V, VIII, XIII of blood coagulation [2, 3], and to catalyze the conversion of fibrinogen into insoluble fibrin, that promotes the formation and stabilization of fibrin clots.

Taking into account the fact that meizothrombin has both pro- and anticoagulant properties, that are depend on the degree of saturation of the molecule by sodium ions, it should be emphasized that hypersodemia (characteristic feature of thrombotic states) causes realization mainly procoagulative activity of meizothrombin [2, 6]. Presence in blotogram fractions with molecular weights about 100, 130, 250 kDa may be result of formation of prothrombin and its derivatives complexes with proteins at the term of cardioembolic stroke progression. So, for example, the appearance in the bloodstream of thrombin-antithrombin III complexes (molecular weight of 100 kDa) is regarded as one of the diagnostic criteria for thrombosis development [4].

Conclusion. Disruption of the delicate balance between the components of the hemostatic system in the direction of activation of blood coagulation provides conditions for further progression of procoagulant state. Accumulation in the bloodstream of patients with ischemic stroke molecules of prothrombin origin and their complexes with proteins allows considering these molecules as one of additional marker indicating the development of thrombosis – state which greatly complicates the pathogenesis of the underlying disease. On the other hand, monitoring of prothrombin derivatives will improve the effectiveness of anticoagulant therapy and can also be used to better understand the mechanisms that regulate hemostasis.

References

1. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2001. – С. 245–251.
2. Колодзейская М. В. Мезотромбин – производное протромбина – Na⁺⁺-зависимый аллостерический фермент / М. В. Колодзейская, Е. И. Юсова, Т. В. Гриненко // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 5. – С. 9–18.
3. Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів // Д. С. Корольова, В. О. Чернишенко, О. В. Горницька та др. // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 58–65.
4. Современные представления о системе гемостаза / Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова, А. Н. Савчук та ін. – К.: Наук. думка, 2005. – 296 с.
5. Arboix A. Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis / A. Arboix, J. Alió // Curr. Cardiol. Rev. – 2010. – 6 (3). – P. 150–161.
6. Bradford H. N. Meizothrombin is an unexpectedly zymogen-like variant of thrombin / H. N. Bradford, S. Krishnaswamy // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 31, № 287 (36). – P. 30414–30425.
7. Detecting anti-prothrombin antibodies in young women with acute ischemic stroke / M. Cojocaru, M. Cojocaru, R. Tănăsescu et al. // Rom. J. Intern. Med. – 2008. – 46 (4). – P. 337–341.
8. Harlow E. Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press / E. Harlow, D. Lane. – N. Y., 1988. – P. 345–405.

9. Prothrombin activation fragment 1+2 as a marker of coagulation activation in cord blood collection for banking / S. Juutistenaho, E. Vahtera, K. Aranko et al. // *Transfus. Med.* – 2010. – 20 (4). – P. 250–257.

10. Lasne D. From normal to pathological hemostasis / D. Lasne, B. Jude, S. Susen // *Can J. Anaesth.* – 2006. – 53 (6 Suppl). – P. 2–11.

11. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. Cold Spring Harbor Laboratory Press. – N. Y., 1993. – 680 p.

12. Stassen J. M., Arnout J., Deckmyn H. The hemostatic system / J. M. Stassen, J. Arnout, H. Deckmyn // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – 11(17). – P. 2245–2260.

Надійшла до редколегії 08.10.14

Н. Ракша, канд. біол. наук, М. Бурлова-Васильєва, асп., Е. Торгалло, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ПОЯВА В КРОВІ МОЛЕКУЛ ПРОТРОМБІНОВОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ТА КАРДІОЕМБОЛІЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Показано зростання вмісту молекул протромбінового походження у пацієнтів з атеротромботичним та кардіоемболічним підтипами інсульту. Виявлено присутність у плазмі хворих білкових фракцій у діапазоні молекулярних мас, що відповідають молекулам протромбіну та продуктам його активації.

Ключові слова: протромбіновий час, молекули протромбінового походження, атеротромботичний та кардіоемболічний підтипи інсульту.

Н. Ракша, канд. биол. наук, М. Бурлова-Васильева, асп., Е. Торгалло, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПОЯВЛЕНИЕ В КРОВИ МОЛЕКУЛ ПРОТРОМБИНОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ РАЗВИТИИ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО И КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Показано увеличение содержания молекул протромбинового происхождения у пациентов с атеротромботическим и кардиоэмболическим подтипами инсульта. Обнаружено присутствие в плазме больных белковых фракций в диапазоне молекулярных масс, которые соответствуют молекулам протромбина и продуктам его активации.

Ключевые слова: протромбиновое время, молекулы протромбинового происхождения, атеротромботический и кардиоэмболический подтипы инсульта.

УДК 616. 342-002. 44(043. 3)

А. Маркевич, асп., Л. Богун, канд. біол. наук, О. Харченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
К. Кудрявцев, канд. хім. наук
Московський державний університет ім. М. В. Ломоносова, Москва, РФ

ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ОРГАНІЧНОЇ СПОЛУКИ 2-(2-ГІДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛІНАТ НАТРІЮ НА СТИМУЛЬОВАНУ КАРБАХОЛІНОМ ШЛУНКОВУ СЕКРЕЦІЮ У ЩУРІВ

Показано ефекти низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) на шлункову секрецію гідрохлоридної кислоти і пепсину та на активність H^+, K^+ -АТФази, за умов стимуляції карбахоліном. На 20 білих лабораторних щурах досліджували стимульовану карбахоліном секрецію гідрохлоридної кислоти методом перфузії ізольованого шлунка, дебіт пепсину колориметричним методом за Тіном упродовж 120 хвилин та активність H^+, K^+ -АТФази оцінювали спектрофотометрично за рівнем неорганічного фосфату. Введення НМОС призводило до зменшення стимульованого карбахоліном дебіту гідрохлоридної кислоти та пепсину, а також до зниження активності H^+, K^+ -АТФази. Досліджуючи НМОС, було виявлено її антисекреторну властивість, яка є одним з механізмів антивиразкової дії.

Ключові слова: низькомолекулярна органічна сполука, стимульована секреція, гідрохлоридна кислота, пепсин, H^+, K^+ -АТФаза.

Вступ. Кислотозалежними прийнято вважати захворювання, у виникненні яких значну роль грають патологічні ефекти гідрохлоридної кислоти шлункового соку. У сучасній клініці найбільш часто зустрічаються такі захворювання, як гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), ерозивно-виразкові ураження гастродуоденальної зони, гастропатії, пов'язані з вживанням нестероїдних протизапальних препаратів, гострі стресові виразки, етанолові виразки, функціональна диспепсія. В їх лікуванні використовуються засоби, що пригнічують виділення гідрохлоридної кислоти [1].

При лікуванні гіперсекреції гідрохлоридної кислоти використовують антацидні або антисекреторні препарати. Найефективнішими антисекреторними препаратами вважають інгібітори протонної помпи (ІПП), які дозволяють на довгий час пригнічувати продукцію гідрохлоридної кислоти. Проте ІПП мають ряд побічних ефектів, а також ряд пацієнтів є не чутливими до блокаторів H^+, K^+ -АТФази [1].

ІПП можуть призвести до зниження в крові рівня антивірусних та протипухлинних ліків, абсорбція яких у кров є кислотозалежною. Зниження шлункової кислоти спричинює порушення всмоктування вітаміну В12, кальція, заліза та магнія [2]. У людей, які приймають

ІПП спостерігаються рецидиви інфекції *Clostridium difficile*, переломи, обумовлені остеопорозом, інтерстиціальний нефрит і рецидиви пневмонії [3, 4]. Ще одним негативним ефектом ІПП є компенсаторна реакція організму і посилення секреції гідрохлоридної кислоти після припинення прийому цих ліків [4]. Довготривале використання ІПП може також призвести до летальних випадків, особливо у людей похилого віку, які страждають на численні хронічні захворювання [5]. Є дані, що свідчать про ймовірність рецидиву інфаркту при одночасному лікуванні клопидогрелем і ІПП [6].

Наведені дані свідчать про необхідність пошуку нових ліків в лікуванні кислотозалежних захворювань, щоб звести побічні ефекти наявних препаратів до мінімуму.

В попередніх роботах нами була встановлена антивиразкова дія низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію [7, 8, 9], але механізми її дії не відомі. Оскільки посилення кислото-пептичного фактору є однією з ланок виразкового процесу, метою роботи було дослідити вплив НМОС (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію на стимульовану карбахоліном секрецію гідрохлоридної кислоти, дебіт пепсину та H^+, K^+ -АТФазу активність.

© Маркевич А., Богун Л., Харченко О., Кудрявцев К., 2014

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводилося на білих нелінійних лабораторних щурах розведення віварію Навчально-наукового центру "Інституту біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах акредитованого віварію згідно "Стандартним правилам з упорядкування, обладнання та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Всі роботи з тваринами проводилися з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" [10] та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами [11]. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Дослідження було проведене на 20 щурах, які поділені на 2 групи:

1 група тварин – контроль. Щурам за 30 хвилин до спостереження стимульованої секреції кислоти внутрішньоочеревинно (в/о) вводили 0,4 мл фізіологічного розчину на 200 г ваги щура – самця (10 тварин);

2 – дослідна група. Щурам за 30 хвилин до спостереження стимульованої секреції кислоти в/о вводили НМОС (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію в дозі 1 мг/кг, в об'ємі 0,4 мл на 200 г щура – самця щурів (10 тварин). Досліджувана сполука була синтезована Хімічним факультетом Московського державного університету імені М.В. Ломоносова.

Дослідження стимульованої шлункової секреції кислоти у щурів проводили методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом (1958) упродовж 120 хв [12]. Схема експерименту була наступною: 1) щурів наркотизували уретаном в дозі 1,15 г/кг ваги (внутрішньоочеревинно); 2) 30 хв досліджували базальну секрецію, після чого вводили НМОС в дозі 1 мг/кг; 3) через 30 хв після введення НМОС вводили карбахолін у дозі 0,001 мг/кг (SigmaChemicalCo, St. Louis, USA) та вимірювали дебіт кислоти, яка виділилася впродовж 120 хвилин стимульованої секреції. У зібраних 10-хвилинних пробах електротитриметрично визначали вміст гідрохлоридної кислоти за допомогою іономіра EB-74 з використанням 0,01 N розчину гідроокису натрію (NaOH) та концентрацію пепсину колориметричним методом за Тіном (1986) [13]. Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-ти хвилинній пробі, дорівнювала дебіту гідрохлоридної кислоти, виділеної шлу-

нком за даний період часу. В зібраних пробах обчислювали дебіт пепсину шлункового соку, що виділювався за 120 хв стимульованої секреції.

При дослідженні активності H^+ , K^+ -АТФази щурам міряли 30 хв базальний рівень активності H^+ , K^+ -АТФази; після цього контрольній групі вводили фізіологічний розчин, а дослідній групі – НМОС, і ще через 30 хв вводили карбахолін в обидві групи. Через 120 хв після введення стимулятора у щурів здійснювали забір слизової оболонки шлунка (СОШ). Парієтальні клітини виділялись за описаною методикою (ферментативне відщеплення загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка з наступним ультрацентрифугуванням на сахарозо-фікольному градієнті) [14]. Фракцію плазматичних мембран отримували на градієнті сахарози (30%) за рекомендаціями [15]. Активність H^+ , K^+ -АТФази оцінювали спектрофотометрично за рівнем неорганічного фосфату, який утворюється в результаті проходження ферментативної реакції [16].

Всі кількісні та якісні показники, зареєстровані в журналі досліджень, підлягали статистичній обробці за допомогою пакету програм Statistica 8.0. Отримані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки дані були параметричні, то для їх порівняння використовували t-критерій Стюдента для незалежних вибірок, рівень значущості становив $p < 0,05$. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і помилки середнього (m).

Результати та їх обговорення. Встановлено, що дебіт гідрохлоридної кислоти за умов в/о введення карбахоліну у дозі 0,001 мг/кг в контрольній групі щурів становив $152,1 \pm 13,5$ мкмоль/120 хв (рис.1). В результаті дії стимулятора секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів зросла на $468,9 \pm 40,4\%$ ($p < 0,001$) порівняно з базальним рівнем секреції $33,1 \pm 2,0$ мкмоль/120 хв (рис.2).

Дебіт гідрохлоридної кислоти в групі щурів, яким вводили НМОС, за умов карбахолінової стимуляції становив $111,7 \pm 13,0$ мкмоль/120 хв. Отриманий показник був на 26,6% ($p < 0,05$) нижчим за рівень контролю, що свідчить про антисекреторний вплив НМОС (рис.1). Карбахолін збільшував секрецію гідрохлоридної кислоти в дослідній групі щурів на $325,2 \pm 28,5\%$ ($p < 0,001$) порівняно з базальною секрецією (рис.2). Отже, стимулюючий ефект карбахоліну на секрецію під впливом досліджуваної сполуки був меншим на 30,6% ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою (рис.2).

Таким чином, досліджувана субстанція ефективно зменшує стимульовану холіноміметиком секрецію гідрохлоридної кислоти.

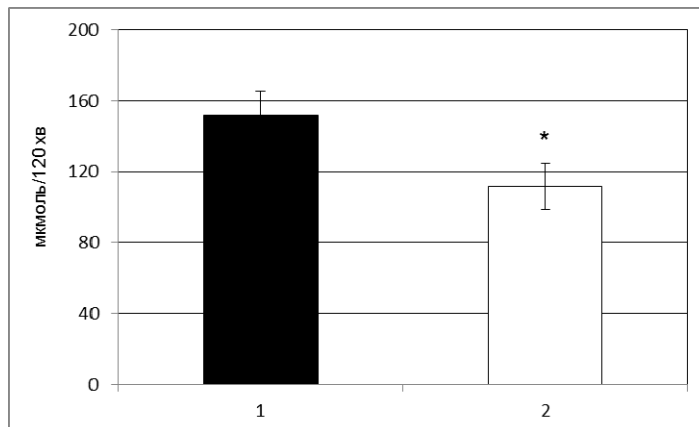


Рис. 1. Дебіт гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів за умов введення карбахоліну (0,001 мг/кг, в/о) та низькомолекулярної органічної сполуки (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 10$ у кожній групі)
1 – контроль, 2 – дослідна група

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

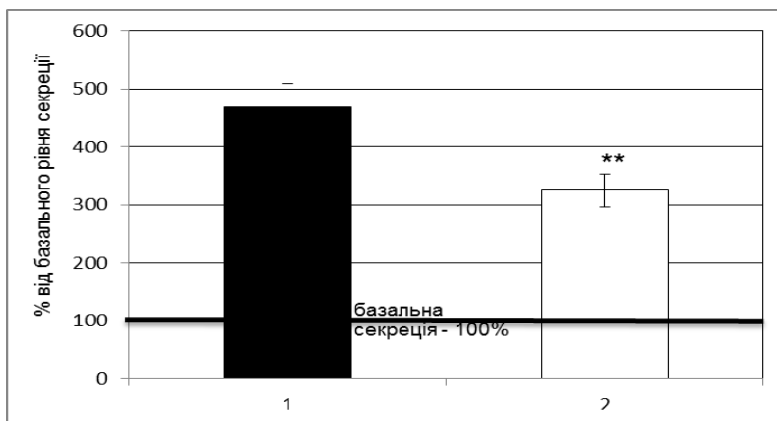


Рис. 2. Функціональна відповідь парієтальних клітин на стимульовану карбахоліном (0,001 мг/кг, в/о) секрецію гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів у відсотках від рівня базальної секреції за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 10$ у кожній групі)
1 – контроль, 2 – дослідна група

Примітка: ** – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

В механізмах виділення H^+ парієтальними клітинами, а отже, синтезу гідрохлоридної кислоти, ключову роль відіграє H^+, K^+ -АТФаза, фермент, локалізований на апікальній поверхні обкладкових клітин [16]. Тому наступним етапом було дослідження активності даного фермента за умов введення НМОС та карбахоліна. В результаті біохімічного аналізу мембран парієтальних клітин СОШ було встановлено, що базальний рівень

активності H^+, K^+ -АТФази досягав значення $10,6 \pm 0,9$ нмоль ФН/(хв×мг білка). Після введення карбахоліну активність збільшилась і становила $48,5 \pm 5,5$ нмоль ФН/(хв×мг білка). Введення досліджуваної сполуки за 30 хв до стимулятора суттєво пригнічувало активність протонної помпи, яка за даних умов складала $24,5 \pm 3,7$ нмоль ФН/(хв×мг білка), що на 49,5% ($p < 0,01$) менше порівняно з контролем (рис. 3).

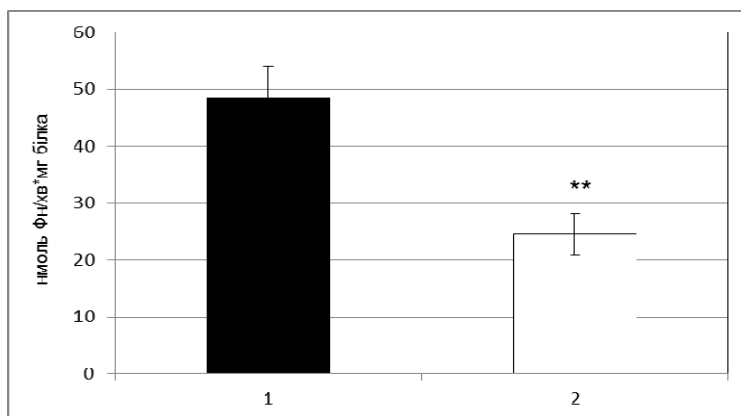


Рис. 3. Активність H^+, K^+ -АТФази в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки (2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію (1 мг/кг, в/о) та карбахоліну (0,001 мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 10$ у кожній групі)
1 – контроль, 2 – дослідна група

** – $p \leq 0,01$ у порівнянні з контролем

Отже, одним з механізмів антисекреторної дії є інгібування H^+, K^+ -АТФази. Отримані результати можуть свідчити про наявність функціональних груп в досліджуваній сполуці, які здатні сполучатися з протонної помпою та пригнічувати її активність.

Пепсин є фактором агресії шлунку, його активує гідрохлоридна кислота, чим посилюється ураження і виникає пептична виразка [17]. Тому, далі нами досліджувалась дія НМОС на дебіт пепсину.

Дебіт пепсину в групі щурів, яким вводили фізіологічний розчин, за умов введення карбахоліну становив

4091 ± 1330 мкг/120 хв. Таким чином, карбахолін посилює секрецію пепсину на 46% ($p < 0,001$) порівняно з базальним рівнем 2801 ± 560 мкг/120 хв. Введення НМОС в дослідній групі щурів дебіт пепсину становив 2300 ± 677 мкг/120 хв, що на 56% ($p < 0,05$) менше порівняно з тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (рис. 4). Отже, досліджувана сполука зменшувала дебіт пепсину за умов стимуляції карбахоліном до рівня базальної секреції.

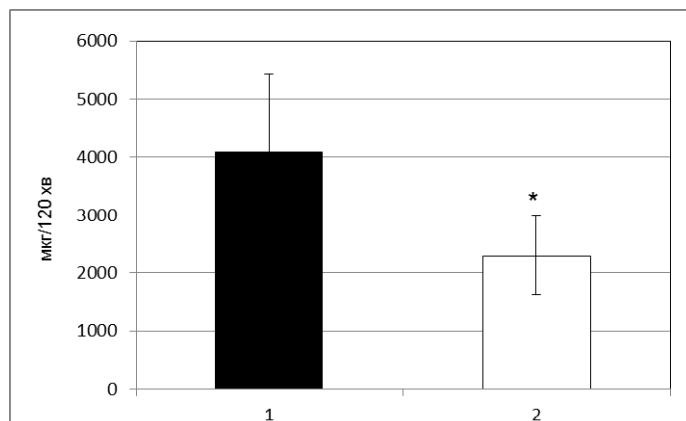


Рис. 4. Дебіт пепсину в шлунку щурів за умов стимуляції карбахоліном (0,001 мг/кг, в/о) та введення низькомолекулярної органічної сполуки (2-(2-гідроксифенокс)ацетил)-L-пролінат натрію (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 10$ у кожній групі)
1 – контроль, 2 – дослідна група

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Висновок. Отримані результати свідчать, що досліджувана сполука ефективно зменшує стимульовану карбахоліном секрецію гідрохлоридної кислоти та дебіт пепсину. Механізмом антисекреторного впливу НМОС є пригнічення активності H^+ , K^+ -АТФази. Встановлений вплив на кислото-пептичний фактор виразкоутворення є одним з механізмів профілактичного впливу НМОС на ерозивно-виразкові ураження в СОШ.

Список використаних джерел

- Shi S. Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics / S. Shi, U. Klotz // Eur J Clin Pharmacol. – 2008. – № 64. – P. 935–951.
- Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemochromatosis / C. Hutchinson [et. al] // Gut. – 2007. – № 56 (9). – P. 1291–1295.
- Proton pump inhibitors and risk for recurrent Clostridium difficile infection / A. Linsky [et. al] // Arch Intern Med. – 2010. – № 170 (9). – P. 772–778.
- Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture / Y. Yang [et. al] // JAMA. – 2006. – № 296 (24). – P. 2947–2953.
- Use of proton pump inhibitors and mortality among institutionalized older people / J. Bell [et.al] // Arch Intern Med. – 2010. – № 170 (17). – P. 1604–1605.
- A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel / D. Juurlink [et.al] // CMAJ. – 2009. – № 180 (7). – P. 713–718.
- Использование новых низкомолекулярных органических соединений в профилактике вызванных аспирином эрозивно-язвенных поражений у крыс / К.В. Кудрявцев [и др.] // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2012. – № 5 (113). – С. 458–465.
- Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в лікуванні виразок на лабораторних тваринах / О.П. Гаділія [та ін.] // Світ медицини та біології. – 2013. – № 3 (39). – С. 16–20.
- Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка / А.О. Маркевич [та ін.] // Вісн. проблем біології та медицини. – 2013. – № 3, т. 1 (102). – С. 116–121.
- ЗУ от 21.02. 06 № 3447-IV "Про захисту животних от жестокого обращения": 2006.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington DC : National Academy Press, 1996.
- Ghosh M. N. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. / M. N.Ghosh, H. O. Schild // Br J Pharmacol Chemother. – 1958. – Vol. 13, № 1. – P. 54–61.
- Тин В. П. Метод определения пепсина в желудочном соке с использованием колориметрии / В. П. Тин // Лаб. дело. – 1986. – № 11. – С. 656–657.
- Клеточная локализация аденилатциклаза, стимулируемая гистамином / М. М. Таиров [и др.] // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 6. – С. 1035–1041.
- Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран / В. К. Рыбальченко, Н. М. Коганов // Практикум. – К., 1988. – С. 216–221.
- Functional Expression of Gastric H,K-ATPase and Site-directed Mutagenesis of the Putative Cation Binding Site and the Catalytic Center / S.Asano [et. al] // J. B. C. – 1996. – Vol. 271, № 5. – P. 2740–2745.
- Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development / T. Kageyama // Cell Mol Life Sci. – 2002. – Vol. 59, № 2. – P. 288–306.

Надійшла до редколегії 31.10.14

А Маркевич, асп., Л. Богун, канд. биол. наук, О. Харченко, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
К. Кудрявцев, канд. хим. наук
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, РФ

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ 2-(2-ГИДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛИНАТ НАТРИЯ НА СТИМУЛИРОВАННУЮ КАРБАХОЛИНОМ ЖЕЛУДОЧНУЮ СЕКРЕЦИЮ У КРЫС

Показано эффекты низкомолекулярного органического соединения (НМОС) на желудочную секрецию гидрохлоридной кислоты и пепсина, а также на активность H^+ , K^+ -АТФазы, в условиях стимуляции карбахоліном. На 20 белых лабораторных крысах исследовали стимулированную карбахоліном секрецию гидрохлоридной кислоты методом перфузии изолированного желудка, дебит пепсина колориметрическим методом за Тином в течении 120 минут и активность H^+ , K^+ -АТФазы оценивали спектрофотометрически по уровню неорганического фосфата. Введение НМОС приводило к уменьшению стимулированного карбахоліном дебита гидрохлоридной кислоты и пепсина, а также к снижению активности H^+ , K^+ -АТФазы. Исследуя НМОС было обнаружено его антисекреторное свойство, которое является одним из механизмов антиязвенного действия.

Ключевые слова: низкомолекулярное органическое соединение, стимулированная секреция, гидрохлоридная кислота, пепсин, H^+ , K^+ -АТФаза.

A. Markevych, PhD student., L. Bogun, PhD., O. Harchenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
K. Kudryavtsev, PhD
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

EFFECT OF LOW MOLECULAR WEIGHT ORGANIC COMPOUND SODIUM 2-(2-HYDROXYPHENOXY)ACETYL)-L-PROLINATE ON RAT GASTRIC SECRETION STIMULATED BY CARBACHOL

To investigate the effects of low molecular organic compound (LMOC) on gastric acid secretion (GAS), pepsin output and the activity of H^+,K^+ -ATPase in the conditions of carbachol stimulation. GAS stimulated by carbachol was measured by method of isolated perfused stomach, pepsin output was analyzed by colorimetric method for 120 minutes and the activity of H^+,K^+ -ATPase was assessed spectrophotometrically by the level of anorganic phosphate on 20 white laboratory rats. GAS, pepsin output and the H^+,K^+ -ATPase activity were decreased under the carbachol stimulation after injection of LMOC. LMOC decreases the gastric acid and pepsin secretion in terms of carbachol stimulation. The inhibition of H^+,K^+ -ATPase activity is considered as mechanism of antisecretory property of LMOC.

Keywords: low molecular weight organic compound, stimulated secretion, hydrochloride acid, pepsin, H^+,K^+ -ATPase.

UDK 577.15

Ya. Raetska, PhD, O. Morgaienko, PhD, T. Ischuk, PhD student, L. Ostapchenko, Doctor of sciences
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

AMINOTRANSFERASE ACTIVITY IN RAT BLOOD SERUM UNDER MALIGNANT GUERIN'S CARCINOMA GROWTH UPON TREATMENT WITH ANTIOXIDANT DRUG "GRIN"

The malignant growth of Guerin's carcinoma was shown to induce increase of aminotransferases' enzymatic activities. It was established that introduction of the antioxidant substance "GRIN" led to normalization of aminotransferases' activities in blood serum and also had essential inhibitory effect on the tumor growth.

Key words: Guerin's carcinoma, aminotransferases, an antioxidant.

Introduction. Annually there are nearly 6 million new registered cases of malignant disease all over the world. Meanwhile uterine cancer (adenocarcinoma) is a widespread disease among women ranking 4th place after breast, skin, and gastrointestinal cancers.

The rate of uterine cancer incidence increases steadily. In Ukraine, this value is 26.4 per 100,000 population. Women are starting to get sick at the age of 40-54 years old, the peak of the disease occurs at the age of 60-64 years [1,2]. At the present time Guerin's carcinoma (GC) is known to be an optimal model of this pathology for research. GC is a strain of modified cancer derived from the rat spontaneous adenocarcinoma.

Nowadays natural substances are proved by experimental and clinical studies to be promising in combination therapy of cancer. Drugs increasing antitumor resistance, preventing metastasis development and cancer recurrence, attenuating chemotherapy toxicity are of particular interest. So use of drugs that have ability to normalize physiological antioxidant system and increase resistance to malignization is important for oncology [3, 4].

Biochemical parameters of animal and human organisms are known to change under tumor growth [5]. So the aim of the research was to reproduce experimental model of adenocarcinoma and to determine activities of aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) in rat blood serum under tumor growth in condition of studied substance "GRIN" administration.

Blood serum activities of hepatic enzymes AST and ALT are known to be informative characteristics of pathological process because the liver plays a major role in metabolism and is involved into dysfunction of an organism under tumor growth. Herewith AST and ALT values indicate the effect of test substances under malignization [6,7].

Materials and methods. The experiments were conducted on 130 female white rats with weight 180 ± 20 g, which were kept on the standard vivarium diet. GC obtained from donor rats was inoculated to the animals by subcutaneous injection (20% suspension of tumor cells in 0.9% NaCl) in rat hindlimb [8].

Some animals had been treated daily with the studied substance at various doses for 23 days after tumor transplantation. The animals from control group were administered with 1 ml of 0.9% NaCl. At the 7th day after inoculation tumor volume had been measured for period till 25th day. The animals were decapitated under light ether anaesthesia on the 23rd day after tumor transplantation.

To obtain rat blood serum peripheral blood was kept in thermostat for 40 min at 28°C and then underwent centrifugation at 2500g for 30 min [9].

Enzymatic activities were measured using the biochemical analyzer "Humalyser 3000" with kits for colorimetric determination of AST and ALT activities and were expressed as equivalent units per liter (EU/L) [10].

Statistical analysis was performed using software for statistical analysis in Microsoft Excel. Unpaired Student's t test was used to compare values of different groups, and P values < 0.05 were considered to be significant [4].

Results and discussion. Treatment with drugs normalizing physiological antioxidant system and increasing resistance to malignization is important in medicine and represents one of the directions of complex oncology research [11, 12]. The substance "GRIN" designed by "World grinization system" company (Ukraine) is a powder form of the purified protein fractions from the Far-Eastern Holothurian and the worm culture made by special multistage, non-enzymatic, low temperature technology, that allows to avoid denaturation of proteins, to increase their bioavailability, and to retain their globular state with preservation of nuclear DNA's regulatory peptides and their functional properties.

The first step of investigation was determining effect of the substance "GRIN" on tumor growth in rats with inoculated CG. The following results were obtained (Figure 1).

We found out that studied substance stabilized growth of GC. Such effect was observed predominantly at 18th and 23rd days after tumor inoculation in compare to GC control. Average tumor volume was increased steadily reaching the peak meaning at the 23rd day. Administration with "GRIN" in dose 200 mg/kg led to tumor volume decrease on 39.1% in compare to tumor control (rats with GC).

Comparing the dose effects of the substance "GRIN" on rats with inoculated GC we concluded that the most effective dose in our experiments was 200 mg/kg. The conclusion was based on 2 criteria: index of tumor growth inhibition and prolonging of lifespan in compare to control values.

Obtained results demonstrate expedience to research biochemical mechanisms of the substance's effect. Blood biochemical parameters are an integral characteristic responsible for condition of an organism. Particularly aminotransferases's activities are informative characteristics.

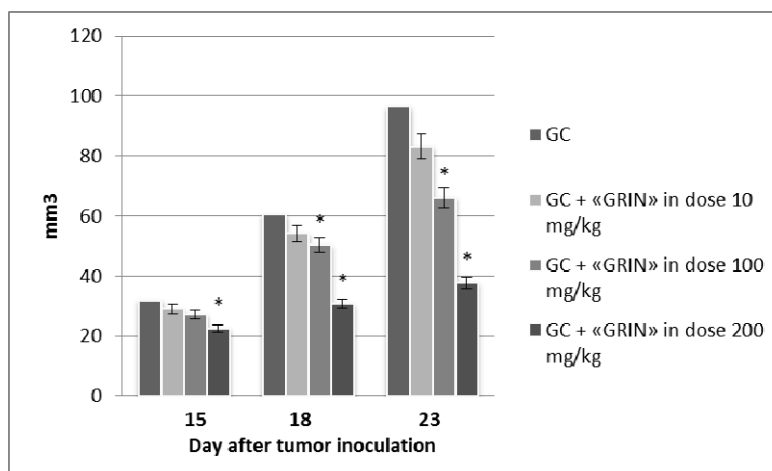


Figure 1. Average volumes of Guerin's carcinoma (GC) in rats under studied substance "GRIN" treatment

* – $P < 0.05$ compared to GC

The next stage of the study was determination of aminotransferases' (AST and ALT) activities in blood serum of rats with GC under substance "GRIN" treatment (Figure 2, 3).

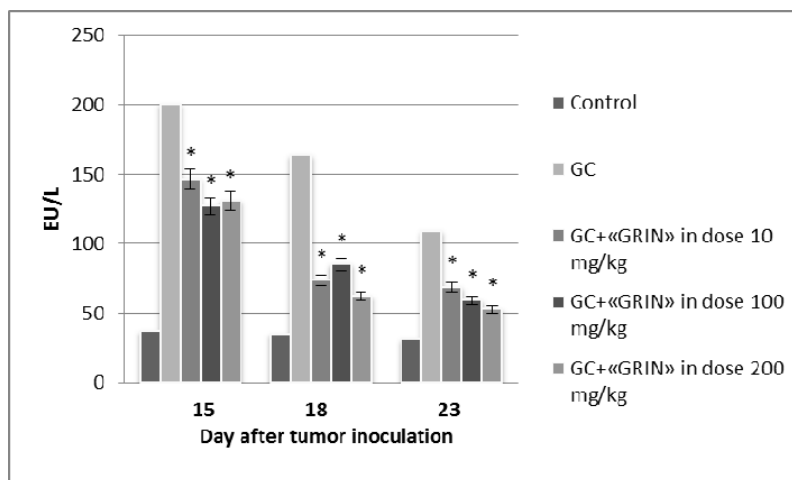


Figure 2. AST activity in blood serum of rats with Guerin's carcinoma GC (EU/L) under substance "GRIN" treatment

* – $P < 0.05$ compared to GC

Data presented reveal increase of AST activity in blood serum of rats with GC about 5-fold at the 15th and 18th days after tumor inoculation (from 37.1 ± 0.12 to $200.6 \pm 0.6^*$ EU/L, and from 35.12 ± 0.2 to $163.7 \pm 0.5^*$ EU/L, respectively), and about 3-fold (from 31.1 ± 0.1 to $109.1 \pm 0.1^*$ EU/L) at the 23rd day compared to control. Meanwhile AST activity in blood serum of rats with GC under "GRIN" treatment was shown to change in a dose-dependent manner. The doses 100 mg/kg and 200 mg/kg caused gradual decline of AST activity at 18th and 23rd days after

tumor inoculation comparing to rats with GC, while they were approaching the normal values.

In groups of rats administered with the substance "GRIN" in doses 100 mg/kg and 200 mg/kg AST activity was decreased about 2-fold at the 23rd day after tumor inoculation in compare to GC group (from 109.1 ± 0.1 to $59.2 \pm 0.3^*$ EU/L, and from 109.1 ± 0.1 to $53.1 \pm 0.1^*$ EU/L, respectively) that may indicate functional recovery of liver, heart and skeletal muscles.

ALT determination in rat blood serum under tumor growth revealed following changes (Figure 3).

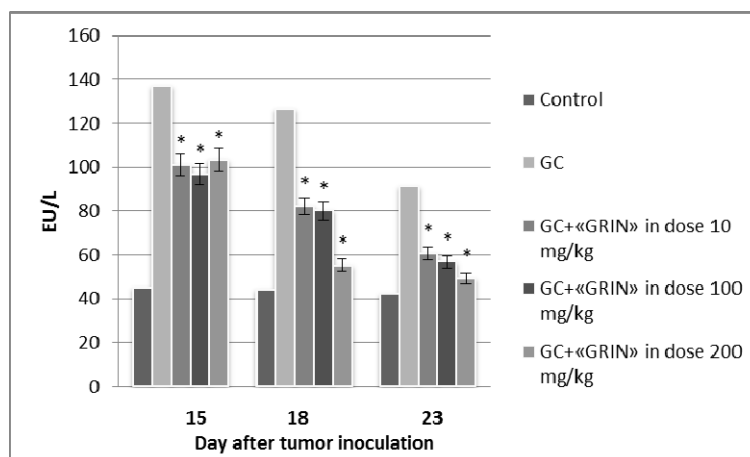


Figure 3. ALT activity in blood serum of rats with Guerin's carcinoma (GC) under studied substance "GRIN" administration

* – $P < 0.05$ compared to GC

ALT activity in blood serum of rats with GC was increased about 3-fold at 15th and 18th days after tumor inoculation (from 45.1 ± 3.13 to 137.1 ± 0.1 EU/L, and from 44.3 ± 3.1 to 126.7 ± 0.3 EU/L, respectively), and 2-fold (from 42.1 ± 2.1 to $91.2 \pm 0.1^*$ EU/L) at the 23rd day in compare to control group meanings. Administration with the studied substance "GRIN" in different doses (10 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg) led to gradual changes of ALT activity. The doses 100 mg/kg and 200 mg/kg caused 1.5-2-fold decrease of ALT activity in blood serum at the 23rd day after tumor inoculation in compare to rats with GC approaching to physiological normal value (from 91.2 ± 0.1 to $56.8 \pm 0.6^*$, and from 91.2 ± 0.1 to $49.2 \pm 0.9^*$, respectively). Stabilization of studied parameters in range close to normal values was found, and differences between groups were significant ($P < 0.05$). Essential changes in AST and ALT activities were established. In the case of rats with GC administered with the substance "GRIN" in dose 200 mg/kg, significant attenuation of ALT and AST activities were observed ($P < 0.01$) in compare to tumor control (rats with GC). We demonstrated the substance "GRIN" inhibited tumor growth. Such effect was observed predominantly at 18th and 23rd days after GC inoculation. So, it was established that malignization led to augmentation of AST and ALT activities in blood serum. Meanwhile administration of the studied substance in doses 100 mg/kg and 200 mg/kg resulted in attenuation of investigated enzymatic activities with tendency to approach the normal values. It occurred at the background of tumor growth inhibition.

We suggest that changes observed had occurred as a result of positive effect of the substance "GRIN" on blood flow organs and microcirculation of the internal organs and on prevention of catabolic reactions accompanying cancerogenesis. Decrease of AST and ALT activities is considered to follow the liver function recovery. It can be realized by mechanisms involving inhibition of oxidative reactions, stabilization of mitochondria functions, restore of hepatocyte membrane structures by such compounds of the natural substance "GRIN" as amino acids, vitamins, peptides [13].

Conclusions. Decrease of GC average volume in rats under administration with "GRIN" in different doses in dynamics was established. Obtained results indicate the dose

200 mg/kg as the most effective. An administration of this dose substance led to about 3-fold GC growth inhibitory.

AST and ALT activities were shown to increase in rat blood serum under GC growth. Administration with the natural substance "GRIN" led to decline of AST and ALT activities in blood serum of rats with GC. The dose 200 mg/kg was determined to be the most efficient approaching the enzymatic activities to control values.

References

1. The biochemical parameters of blood, antioxidant system and lipid peroxidation processes under malignization in rats in condition of antioxidant substance treatment. Przemyśl / Ya. B. Raetska, O. O. Morgaienko, R. S. Demyanenko, L. I. Ostapchenko // Journal Nauka i Studia. Biologiczne nauki. – 2012. – № 4. – P. 17–20.
2. Grogan B. T. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer / B. T. Grogan B. Gilmartin, D. N. Carney // Biochim Biophys Acta. – 2008. – №1 785. – P. 96–132.
3. EUROCORE – 4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995 – 1999. Results and commentary / M. Sant et al. // International Journal of Cancer – 2012. – Vol. 131. – P. 173–185.
4. Verdecchia A. Recent cancer survival in Europe: a period analysis 2000 – 02 of the EUROCORE – 4 data / A. Verdecchia et al. // Lancet Oncol. – 2007. – Vol. 43. – P. 784–96.
5. Shijie Fan. The influences of SE infection on layers production performance, egg quality and blood biochemical indicators / Shijie Fan, Ji-angxia Zheng, Zhongyi Duan. // Journal of Animal Science and Biotechnology – 2014. – Vol. 5, №1. – P. 1–4.
6. Preventive effect of hydrazinocurcumin on carcinogenesis of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in male SD rats / J. A. Zhao, L. Peng, C. Z. Geng et al. // Asian. Pac. J. Cancer Prev. – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 2115–2121.
7. Efficacy of maximal androgen blockade versus castration alone in the treatment of advanced prostate cancer: a retrospective clinical experience from a Chinese medical centre / Xue-Qin Chen et al. // Asian. J. Androl. – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 718–727.
8. Qinlan G.J., Mumby S., Martin G.S. et al. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury // – 2004. – Vol. 32, № 3. – P. 755–759.
9. Карпищенко А. И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справочник : в 2 т. / А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – С. 27–28.
10. Instructions for use of biochemical analyzer Humalyzer 3000.
11. Use of multi-nutrient functional peptide complex "GRINIZATION" for treatment and prevention of viral infections. Bioactive natural products, use of multinutrient functional peptide complex (MFPC) "GRINIZATION" for treatment and prevention of viral infections / V. Lozitsky, A. Fedchuk, I. Gomolyako et al. // World Scientific Publishing Co. Pt. Ltd. – 2012. – P. 401–443.
12. Барабой В. А. Перекисное окисление и радиация / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. – К. : Наук. думка, 1991. – 256 с.
13. High. Immunohistochemical Expression of TGF-β1 Predicts a Poor Prognosis in Cervical Cancer Patients who Harbor Enriched Endoglin Microvessel Density Lin. / H. Lin, C. C. Huang, Y.C. Ou et al. // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2012. – № 5. – P. 482–489.

Надійшла до редколегії 18.11.14

Я. Раєцька, канд. біол. наук, О. Моргаєнко, канд. біол. наук, Т. Іщук, асп., Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ТРАНСАМІНАЗ ПРИ ЗЛОЯКІСНОМУ РОСТІ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОГО "GRIN"

Показано збільшення ферментативної активності трансаміназ при злоякісному рості. Було встановлено, що введення антиоксидантного препарату "GRIN" сприяє нормалізації активності трансаміназ в сироватці крові, а також має істотну гальмівну дію на ріст пухлини.

Ключові слова: злоякісний ріст, трансамінази, антиоксидант.

Я. Раецкая, канд. биол. наук, А. Моргаенко, канд. биол. наук, Т. Ищук, асп., Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИНАЗ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ "GRIN"

Показано увеличение ферментативной активности трансаминаз при злокачественном росте. Было установлено, что введение антиоксидантного препарата "GRIN" способствует нормализации активности трансаминаз в сыворотке крови, а также оказывало тормозящее действие на рост опухоли.

Ключевые слова: злокачественный рост, трансаминазы, антиоксидант.

УДК: 57.017.642:636.52/.58:615.9

С. Зінабадінова, старш. лаб.
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ,
Т. Сегеда, д-р біол. наук
Київський університет ім. Бориса Грінченка, Київ

ВИКОРИСТАННЯ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ, СПРИЧИНЕНИХ ДІЄЮ АЗБЕСТУ ТА ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОВОЛОКОН

Структурна подібність вуглецевих нановолокон та волокон азбесту викликає серйозні хвилювання щодо їх безпечності. Відомі на сьогодні дані про дію азбесту стосуються переважно досліджень дихальної системи. Саме тому ми використали курячі ембріони, щоб мати змогу оцінити реакції організму на матеріали на великій кількості клітинних популяцій. За результатами дослідження встановлено, що амфіболовий азбест, який має прямі волокна, становить найбільшу небезпеку. Також в дослідженні продемонстровано, що вуглецеві нановолокна потенційно здатні поводити себе як амфіболові волокна.

Ключові слова: біологічні ефекти, хризотилловий азбест, амфіболовий азбест, нановолокна, курячий ембріон.

Вступ. На сьогоднішній день в усьому світі зростає увага до розвитку нанотехнологій. Одними із найперспективніших є волокнисті вуглецеві наноматеріали. Враховуючи, що обсяги їх виробництва постійно розширюються, і надалі очікується тісний контакт людини та інших біологічних об'єктів із наночасточками, вивчення потенційних ризиків їх використання розглядається як одне з першочергових завдань [1]. Аналогічна ситуація, проте з природним волокнистим матеріалом – азбестом, спостерігалась в минулому у зв'язку з його активним впровадженням у будівництво та інші сфери людської діяльності. Ентузіазм світової спільноти різко впав після виявлення канцерогенних властивостей цього матеріалу. Тож цілком закономірно, що все більше дослідників працюють над проблемою порівняння біологічних ефектів і властивостей азбесту та вуглецевих нановолокон – найближчого структурного аналога азбесту серед наноматеріалів [2].

Відомі на сьогодні дослідження негативних впливів азбесту на живі організми стосуються переважно пневмоконіозів – хронічних захворювань легень, зумовлених тривалим вдиханням пилу. Вважається, що довжина та форма азбестового волокна визначають його фізичні властивості і біологічну агресивність. Так, волокна азбесту амфіболового типу більш щільні, довгі, практично не розчиняються в кислотах та біологічних рідинах. Хризотилловий азбест вважають інертним щодо живих організмів, оскільки його волокна "м'якші" за амфіболові, розчиняються у біологічних рідинах, краще виводяться з організму [3-5].

З огляду на відмічену специфіку вивчення патогенної дії азбесту, більшість відомих на сьогодні досліджень щодо порівняння його біологічних впливів з вуг-

лецевими наноматеріалами стосуються змін у дихальній системі [6]. Проте у літературі зустрічаються поодинокі документування фактів спроможності азбесту проникати через біологічні бар'єри, спричиняти злоякісні переродження у шлунково-кишковому тракті [7], у жіночій статевій системі [8], та викликати рак гортані [9]. Для вуглецевих нановолокон також існують беззаперечні підтвердження їх високої проникаючої здатності, тобто можливості легко проходити крізь мембрани клітин та долати різні біологічні бар'єри [10].

Отож, наголосимо на відсутності необхідного об'єму знань та доцільності розширення сфери вивчення біологічних ефектів, спричинених дією азбесту і вуглецевих наноматеріалів.

Матеріали і методи.

Експеримент здійснено на курячих ембріонах, інкубованих з яєць лінії Хай-Лайн. Матеріал був розділений на чотири групи:

I група – інтактна (ІГ), Об'єкти у групі (у кількості 43 штук) інкубувались без будь-якого зовнішнього втручання.

II група – експериментальна (ЕГ-Д). Об'єктам (у кількості 19 штук) вводили суспензію біосумісного декстрану.

III група – експериментальна (ЕГ-Х). Об'єктам (у кількості 19 штук) вводили суспензію хризотилового азбесту.

IV група – експериментальна (ЕГ-А). Об'єктам (у кількості 29 штук) вводили суспензію амфіболового азбесту.

V група – експериментальна (ЕГ-В). Об'єктам (у кількості 35 штук) вводили суспензію вуглецевих нановолокон.

Використана біологічна модель розроблена за методикою В.П. Терещенко, патент України №49464. Об'єктам у експериментальних групах на третю добу інкубації (терміни зумовлені закономірностями розвитку

кровеносної системи) вводили суспензії на біосумісному декстрані хризотилового і амфіболового азбесту, вуглецевих нановолокон. Доза введених речовин для кожного об'єкту складала 0,31 мг в 0,2 мл декстрану. Розрахунок дозування був здійснений аналогічно прийнятих в медико-біологічній практиці розрахунків разової підтримуючої дози АВ (активованого вугілля) 1 г при вазі людини 70 кг, у перерахунку на вагу жовтка яйця (22 г): $22 \times 1:70 \ 000 = 0,31$ мг.

Стерилізація матеріалу здійснювалась за $t^\circ 120^\circ\text{C}$ впродовж 60 хвилин.

Кількість рідини, що вводилася (0,2 мл) є допустимою для введення у експериментах з курячими зарод-

ками [11]. Відбір зародків проводили на 6, 14 та 20 доби інкубації. Задіяно комплексні дослідження, що включають морфологічні методи та статистичну обробку даних

Результати та їх обговорення. За результатами проведених досліджень характеристики зародків в ІГ та у групі із введенням декструну не відрізнялись (Таблиця 1). Таким чином, в експерименті була підтверджена біосумісність декструну та доведена ефективність обраного способу введення матеріалів (оскільки він не викликає травмування тканин і не впливає на розвиток зародків). Надалі вважаємо доцільним порівнювати показники експериментальних груп з показниками ІГ.

Таблиця 1. Порівняльна характеристика зародків інтактної групи та групи із введенням декстрану

Параметри	Якісна оцінка	Кількість зародків, у %		t Стюдента	t для p=0,95	Наявність достовірної різниці
		ІГ	ЕГ-Д			
Стан зародка	Мертвий	6,97%±0,039	10,53±0,07	0,4427	2,0003	немає
	Відсутні	2,33±0,023	5,26%±0,051	0,5218		немає
Стан судин жовткової оболонки	Дифузне запустіння	4,65%±0,032	10,53%±0,070	0,7597		немає
	Норма	69,77%±0,070	68,42%±0,107	0,1058		немає
	Гіперемія	23,25%±0,064	15,78%±0,084	0,7076		немає

При макроскопічному дослідженні ЕГ-Х були виявлені тератогенні властивості хризотилового азбесту – більшість загиблих зародків зупинили свій розвиток на ранніх стадіях інкубації (впродовж трьох діб після введення суспензії). Вважаємо, що азбест механічно уражуючи судини жовткового кола (як першої біологічної структури, що взаємодіє з введеними у жовтковий мішок хризотиловими волокнами) викликав загибель зародків, порушуючи їх нормальне живлення.

В нашому експерименті ми спостерігали ознаки значного відставання у розвитку зародків, які не загинули на ранніх строках інкубації. Припускаємо, що здатність хризотилових волокон частково розчинятись у біологічних рідинах [3-5] переводить їх вплив у мікро- та навіть нановимір, таким чином викликаючи довготривалі хронічні реакції. Так, зародки ЕГ-Х мали велику кількість необробленого жовтка, у той час як у всіх зародків інтактної групи на відповідних термінах інкубації жовток мав неоднорідну консистенцію, яка свідчила про початок

його ферментативної обробки (найбільші зміни спостерігались вздовж судин жовткового мішка). Таким чином, у живих ембріонів при відсутності видимих патологій судин жовткової оболонки, більша частина жовтка залишилась в незміненому вигляді.

Значна частина зародків у даній групі при відборі виявлялась мертвою, ембріони мали маленькі розміри, які відповідали приблизно 6-8 добам інкубації. У всіх мертвих зародків спостерігалось дифузне запустіння або цілковита відсутність судин жовткової оболонки.

Серед об'єктів, відібраних у ЕГ-А більшість зародків була виявлена мертвою із значними ознаками патології. Жоден з зародків даної експериментальної групи не зміг розвинути до пізніх стадій інкубації. Розміри замерлих зародків відповідали приблизно 6 добі інкубації, стан зародків характеризувався значним лізисом тканин і помутнінням амніотичної рідини. Судини жовткової оболонки у всіх мертвих зародків були значною мірою спустошені або взагалі відсутні (Рис. 1).

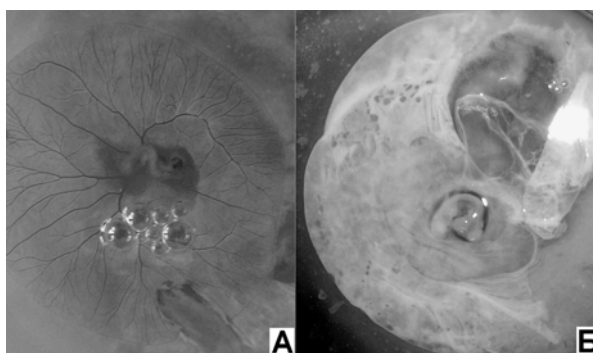


Рис. 1. Зародки 6-денного строку інкубації:

А – ІГ: чітко простежується судинний малюнок жовткової оболонки, добре помітне пігментоване око;

Б – ЕГ-А: судини жовткової оболонки відсутні, тканини ембріону зі значним лізисом

Цікавим є той факт, що у зародків, які виявлялись живими на момент відбору спостерігались схожі із замерлими ембріонами ознаки патології – дифузне запустіння судин жовткової оболонки та помутніння амніотичної рідини.

В експерименті продемонстрована здатність амфіболового азбесту до поширення в організмі через кровоносну систему. Так, амфіболові волокна не тільки механічно уражували судини жовткової оболонки – першої ланки на шляху їх потрапляння безпосередньо

до ембріону, а й потрапляли до внутрішньоамніотичного кровообігу. Пошкодження судин зародкового кола, викликало імбібіцію тканин кров'ю. Просякнення тканин кров'ю, в свою чергу, могло спричинити їх швидкий лізис, що ми і спостерігали у замерлих зародків.

При постановці експерименту із введенням суспензії нановолокон, зважаючи на заявлені в літературі унікальні характеристики наночастинок [10] (особливо на їх високу проникаючу здатність), ми вважали необхідним скорегувати стандартну схему відбору матеріалу. Для

ЕГ-НВ ми додали ще один термін відбору – через 2 години після введення НВ, для того щоб мати змогу оцінити можливі миттєві реакції від їх впливу. Вже при макроскопічному дослідженні у зародків відібраних через 2 години після введення НВ, ми відзначали порушення у кровоносній системі: магістральні судини жовткової оболонки були знекровлені, серед дрібних судин спостерігались ділянки із запустінням, чітко проглядались лише судини крайової зони жовткової оболонки. При цьому зародки були живими, спостерігалось активне серцебиття. Розміри зародків відповідали нормі. Таким чином, як і у випадку із волокнами амфіболового азбеста, НВ перш за все викликали патології розвитку кровоносної системи.

Отримані дані при подальшому відборі зародків на інших строках інкубації підтверджують наші спостере-

ження. Переважна більшість зародків ЕГ-НВ виявилась мертвою із значними патологіями кровоносної системи. Розвиток більшості завмерлих зародків відповідав 6-денному строку інкубації. Серед порушень нами були виявлені імбібіція кров'ю, значний лізис тканин зародка (як і у групі із введенням амфіболових волокон азбесту), відсутність судин жовткової оболонки. Для таких завмерлих зародків були характерними значні скупчення НВ у матеріалі жовтка.

Цікаві дані ми отримали при вивченні зародків, які на момент відбору виявлялись живими. Так на ранніх стадіях (6 доба інкубації) спостерігалось значне кровонаповнення судин жовткової оболонки (особливо магістральних). На пізніх строках (20 доба) ми відмічали ознаки гіперпродукції жовчі печінкою, яка обумовила зелений колір жовтка (Рис. 2).

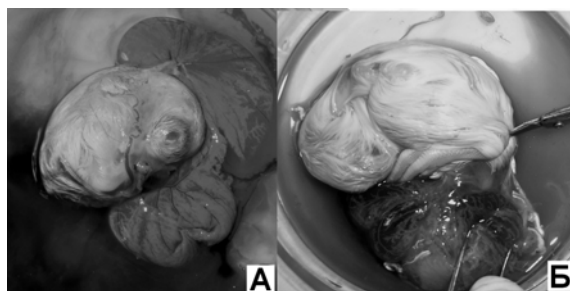


Рис. 2. Зародки 20-денного строку інкубації: А – ІГ; Б – ЕГ-НВ

У живих зародків скупчення НВ у жовтку були меншого розміру, аніж у завмерлих, а самі агрегати НВ – дифузно розсіяні. Розміри зародків із означеними характеристиками були дещо більші ніж в нормі. Розвиток зародків також випереджував показники інтактної групи. Можливим поясненням такої кардинально різної дії НВ (спричинення загибелі або навпаки посилення розвитку органів, що мають контакт із НВ), на нашу думку, є різниця концентрацій НВ у організмі зародків. Ембріони, які одразу отримали велику кількість НВ, загинули на ранніх стадіях. Зародки, які вижили, імовірно змогли ферментативно або завдяки іншим механізмам зупинити агрегацію НВ, отже наночасточки потрапляли до їх організму дозовано. Такі малі дози могли спричинити ефекти подібні до дії гомеопатичних препаратів – активувати процеси обміну речовин та вплинути на розвиток ембріонів.

З метою доповнення вищеписаних морфологічних спостережень, наведемо результати статистичної об-

робки даних. Всі види інтродукованих часточок викликали порушення нормального кровообігу зародків. Як видно з рис. 3 найбільша кількість зародків із нормально розвиненими судинами жовткової оболонки серед експериментальних груп була виявлена у групі із введенням хризотилового азбесту, який, вочевидь, найменше травмує судини. Однак, зауважуючи, що статистичний аналіз не виявив достовірної різниці між даними показниками в інтактній групі та ЕГ-Х, в останній все ж спостерігається виражена тенденція до зниження кількості зародків із нормально розвиненими судинами. Також результати статистичного аналізу демонструють схожий вплив на кровоносну систему волокон амфіболового азбесту та НВ. Так, за кількістю зародків із нормально розвинутою судинною системою дані експериментальні групи суттєво відрізняються від інтактної групи, проте є кореляційно подібними між собою.

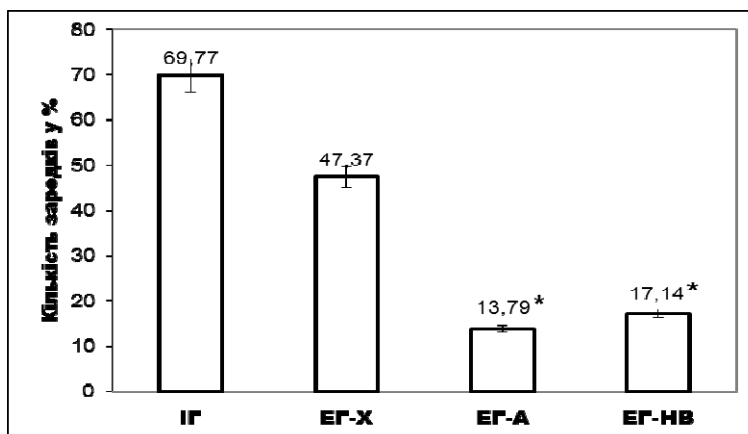


Рис. 3. Характеристика зародків із нормально розвиненими судинами жовткової оболонки

Примітка: тут і далі * – різниця між інтактною та експериментальними групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Стан судин жовткової оболонки є високоінформативним показником, який характеризує найперші реакції організму на вплив введених волокон. Саме тому, ми не просто вираховували кількість зародків із зміненими

судинами, а й виокремлювали кожний вид виявлених нами патологій. Як було зазначено, при морфологічному описі ми спостерігали гіперемію, дифузне запустіння та відсутність судин жовткової оболонки.

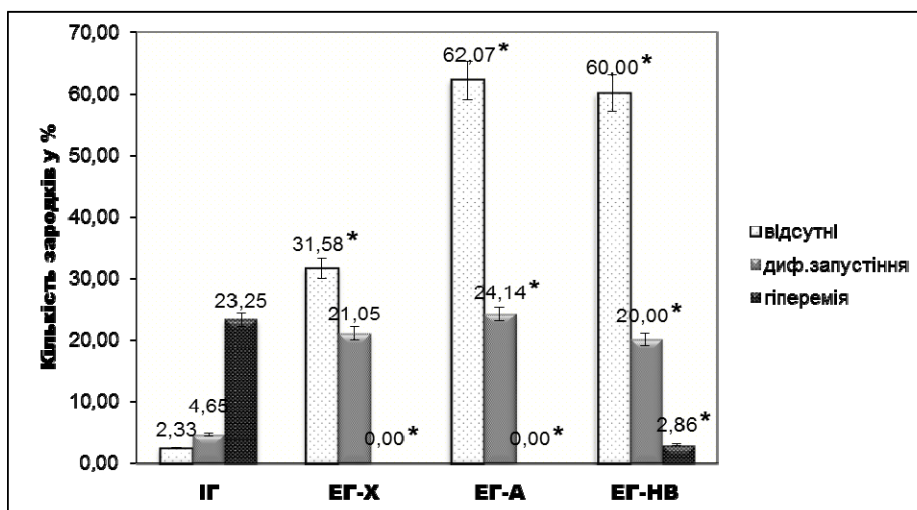


Рис. 4. Характеристика зародків із патологічно розвиненими судинами жовткової оболонки

Зауважимо, що велика кількість судин із гіперемією у інтактній групі, на нашу думку, була проявом особливих характеристик кросу Хай-Лайн, а саме – посиленого розвитку на ранніх стадіях. Для експериментальних груп продемонстровано, що всі типи волокон на перших етапах потрапляння в організм зародків починали діяти однаково (достовірної різниці в кількості судин із дифузним запустінням в експериментальних групах немає). Ми вважаємо, що механічно уражуючи судини, волокна викликали локальні порушення (запустіння) у кровопостачанні жовткової оболонки. Насамперед, такі зміни відбувались у мікроциркуляторному руслі. Подальше надходження часточок, особливо волокон амфіболового азбесту та НВ в організм зародків, призводило до поширення руйнування їх судинної сітки. Саме в цих групах спостерігається кореляція між показниками кількості випадків повного руйнування судин жовткової оболонки. Тотальна деградація судин під впливом хризотилітичних волокон виявлялась у вдвічі меншій кількості зародків.

Висновки. Узагальнюючи та підсумовуючи результати макроскопічних досліджень, відмітимо, що всі види введених волокон викликають патології розвитку, уражуючи насамперед кровоносну систему. Найбільш схожі ефекти спостерігались у групах із введенням волокон амфіболового азбесту та НВ. Нами було показано, що дані види волокон мають найбільшу здатність до поширення в організмі та спричиняють масштабні порушення і загибель зародків вже після короткотривалої дії волокон. Вплив волокон хризотилітичного азбесту з достовірною різницею виявився менш уражуючим, аніж дія амфіболового. Однак, результати нашого дослідження доводять, що хризотилітичний азбест є вкрай небезпечним для живих об'єктів. Його волокна здатні спричинити

значні пошкодження тканин та структур, викликаючи сублетальні та незворотні морфологічні зміни.

Список використаних джерел

1. Картель М. Т. Концепція методології ідентифікації та токсичних досліджень наноматеріалів і оцінки ризику для людського організму та довкілля при їх виробництві та застосуванні / М. Т. Картель, В. П. Терещенко // Хімія, фізика і технологія поверхності. – К.: Наук. думка, 2008. – Вып. 14. – С. 565–583.
2. Asbestos-like Pathogenicity of Long Carbon Nanotubes Alleviated by Chemical Functionalization / Hanene Ali-Boucetta, Antonio Nunes, Raquel Sainz et al. // Angewandte Chemie International Edition. – 2013. – Vol. 52, № 8. – P. 2274–2278.
3. Гігієнічні проблеми використання хризотилітичного азбесту в Україні / Ю. І. Кундієв, В. І. Чернюк, Т. К. Кучерук, А. Н. Каракашян // Гігієна і санітарія. – 2008. – Т. 4, № 16. – С. 116–124.
4. Greillier L. Mesothelioma and asbestos-related pleural diseases / L. Greillier // Respiration. – 2008. – Vol. 76, № 1. – P. 3–15.
5. Pfau J. C. Directions and needs in asbestos research / J. C. Pfau, M. Pershouse, E. A. Putnam // Immunotoxicol. – 2008. – Vol. 2, № 5. – P. 123–127.
6. The toxicological impact of nanoparticles / S. E. Miles, A. Sandrini, A. R. Johnson et al. // Occup. Med. Toxicol. – 2008. – Vol. 8, № 3. – P. 201–212.
7. Chrysotile-asbestos induces cytogenetic effects in the rat's mesothelial cells in vitro and in vivo / L. N. Pylev, O. V. Smirnova, L. A. Vasileva et al. // Гігієна і санітарія. – 2014. – № 2. – С. 97–100.
8. Rai A. J. Association of malignant mesothelioma and asbestos related conditions with ovarian cancer: shared biomarkers and a possible etiological link / A. J. Rai // Chem Lab Med. – 2011. – V. 49, № 1. – P. 5–17.
9. Sturgis E. M. Asbestos exposure and laryngeal cancer / E. M. Sturgis // Ear Nose Throat J. – 2010. – Vol. 89, № 3. – P. 104.
10. Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects / S. Barua, S. Mitragotri // Nano Today. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 223–243.
11. Практикум з курсу "Ембріологія" для студентів біологічного факультету / М. Е. Держинський, С. М. Гарматіна, Н. О. Бузинська, К. Ю. Воронін. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2000. – 85 с.

Надійшла до редколегії 18.11.14

С. Зинабадинова, старш. лаб.
Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина
Т. Сегеда, д-р биол. наук
Киевский университет им. Бориса Гринченка, Киев, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ, КОТОРЫЕ ВОЗНИКАЮТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АСБЕСТА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОВОЛОКОН

Очевидное структурное сходство углеродных нановолокон и волокон азбеста вызывает серьезные опасения по поводу их безопасности. Известные на сегодня данные про действие азбеста касаются преимущественно исследований дыхательной системы. Именно поэтому мы задействовали куриные эмбрионы, чтобы оценить реакции организма на материалы на большом количестве клеточных популяций. По результатам исследования установлено, что амфиболовый азбест, который содержит прямые волокна, является наиболее опасным. В исследовании также продемонстрировано, что углеродные нановолокна потенциально способны вести себя как амфиболовые волокна.

Ключевые слова: биологические эффекты, хризотилітичний азбест, амфіболовий азбест, нановолокна, куриный эмбрион.

S. Zinabadinova, lab.
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine
T. Segeda, DSc.
Borys Grinchenko Kyiv University, Kyiv, Ukraine

THE USING OF CHICKEN EMBRYO FOR THE DETERMINATION OF BIOLOGICAL EFFECTS WHICH ARE CAUSED BY ASBESTOS FIBERS AND CARBON NANOWIRES

The apparent structural link between carbon nanowires and asbestos fibers has generated serious doubts about their safety profile. Until today data on asbestos concerns researches mostly of respiratory system. Therefore we used a chicken embryo because it enables to evaluate the body's reaction to materials on a large number of cell population. The results show that the straight fiber asbestos (amphibole) poses the greatest danger. Also our research demonstrate that carbon nanowires have the potential to behave like amphibole asbestos fibers.

Key words: biological effects, chrysotile asbestos, amphibole asbestos, nanowires, chicken embryo.

УДК 612.766.1:577.21:796.015

С. Дроздовська, канд. фіз. виховання
Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ АНГІОТЕНЗИНКОНВЕРТУЮЧОГО ФЕРМЕНТУ, ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ ТА А-РЕЦЕПТОРА, ЩО АКТИВУЄТЬСЯ ПРОЛІФЕРАТОРАМИ ПЕРОКСИСОМ, З ПОКАЗНИКАМИ АДАПТАЦІЙНИХ РЕАКЦІЙ КАРДІОРЕСПІРАТОРНОЇ СИСТЕМИ СПОРТСМЕНІВ ДО ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ

Вивчено особливості прояву адаптаційних реакцій кардіореспіраторної системи спортсменів з різними генотипами на фізичні навантаження. Досліджено вплив поліморфізмів генів ACE, eNOS, PPARA, PPARG, HIF-1α, PPARGC1B на показники газоаналізу у спортсменів під час фізичних навантажень. Встановлено асоціацію I/D поліморфізму гена ACE, T/C поліморфізму гена eNOS та G/C поліморфізму гена PPARA з показниками аеробної продуктивності кваліфікованих спортсменів. Розглянуто можливість визначення схильності до прояву високих аеробних здібностей за допомогою молекулярно-генетичних маркерів.

Ключові слова: поліморфізми генів, реакції кардіореспіраторної системи, спортивний добір.

Вступ. Залежність характеру адаптаційних можливостей кардіореспіраторної системи у відповідь на фізичні навантаження від спадкової схильності була встановлена ще у 80-ті роки минулого століття [3; 6]. Адаптаційні реакції кардіореспіраторної системи спортсменів є проявом їх аеробних можливостей. Дослідженнями К. Бушара і співр. у 80-х – 90-х роках доведено, що приріст аеробної працездатності під впливом фізичних тренувань, виражений в показниках МСК (максимальне споживання кисню), має високу генетичну залежність ($H=0,77$) [11].

Бурхливий розвиток молекулярно-біологічних методів за останнє десятиріччя дозволяє визначити гени, що сприяють розвитку високих аеробних можливостей [8; 14]. Згідно сучасних уявлень молекулярної генетики фізичної активності, вважається, що індивідуальні відмінності у ступені розвитку тих чи інших фізичних і психічних якостей людини обумовлені ДНК-поліморфізмами, яких нараховується більше 60 мільйонів [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. На теперішній час генетична карта фізичної активності людини нараховує 214 генів, поліморфізми яких асоційовані з розвитком і проявом фізичних якостей, а також, морфофункціональними і біохімічними характеристиками, що змінюються під впливом фізичних навантажень різної спрямованості [9].

Результати досліджень за програмою "Heritage Family Study" свідчать, що спадковість впливає на зростання рівня максимального споживання кисню під час 20-ти тижневої тренувальної програми на 47% [10]. Виявлено, що асоціації з приростом МСК мають 39 поліморфізмів. Статистичний аналіз дозволив ідентифікувати перелік з 21 поліморфізму, які обумовлюють 49% різноманітності відповідей на тренування. У осіб, які мали менше ніж 9 сприятливих алелей з цих 21 поліморфізмів, МСК збільшувався на 221 мл/хв., а у тих, осіб, які мали 19 та більше з цих алелей, приріст МСК становив у середньому 604 мл/хв. Загалом, у літературі описано 59 молекулярно-генетичних маркерів, асоційо-

ваних з розвитком і проявами витривалості [1; 15; 16]. Більшість генетичних маркерів встановлено шляхом пошуку асоціацій поліморфізмів генів з статусом елітних спортсменів (випадок – контроль) і не підтверджені функціональними дослідженнями (генотип-фенотип). Тому існує потреба у експериментальному підтвердженні інформативності встановлених маркерів. Крім того, оскільки сила біологічного ефекту генетичного маркера (поліморфізма) визначається етно- або популяційно-специфічними факторами як генетичної, так і негенетичної природи (гаплотип, взаємодія ген-ген та ген – середовище), у кожній популяції слід проводити пошук власних генетичних маркерів [5]. Новизна роботи полягає у тому, що вперше було досліджено асоціацію поліморфізмів генів з параметрами показників кардіореспіраторної системи українських спортсменів. Крім того, досліджувалися властивості поліморфізмів, які раніше не розглядалися у якості маркерів м'язової діяльності.

Метою роботи було вивчення особливостей адаптаційних реакцій кардіореспіраторної системи спортсменів з різними поліморфними варіантами генів.

Матеріали і методи. Оцінка рівня загальної фізичної працездатності і особливостей реакції кардіореспіраторної системи проводилася у 72 висококваліфікованих спортсменів, які займаються видами спорту, що вимагають прояву витривалості (23 спортсмени мали кваліфікацію майстрів спорту України міжнародного класу, 33 – майстри спорту України, 16 – кандидати у майстри спорту України), з них: 26 жінок та 46 чоловіків.

ДНК виділяли з букального епітелію за допомогою набору реактивів Diatom™ DNA Prep (Biokom). Поліморфізми генів визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR), з подальшою обробкою рестриктазами та наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Ампліфікати після рестрикції розділяли у 2,5 % агарозному гелі, який містив $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ бромистого етидію. Візуалізація ДНК після горизонтального електрофореза (160 V на протязі

40 хв) проводилася за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія) і відеосистеми ViTran (Росія). Генотипування спортсменів виконувалося на базі молекулярно-генетичної лабораторії відділу загальної і молекулярної патофізіології інституту фізіології імені О.О. Богомольця Національної академії наук України.

Реакції кардіореспіраторної системи (КРС), міра ацидемичних зрушень при виконанні граничних (максимальних) і стандартних фізичних навантажень, що дозволяють визначити аеробні можливості організму, вивчалися на експериментальній базі лабораторії "Теорії методики спортивної підготовки та резервних можливостей спортсменів" НДІ НУФВСУ. Потужність аеробних механізмів енергозабезпечення фізичної роботи характеризувалася максимальною аеробною потужністю – максимальним рівнем споживання кисню (VO_{2max}) і потужністю "критичного" навантаження ($W_{кр.}$) при виконанні тестового навантаження із ступінчато зростаючою потужністю, тривалістю 14-20 хв до моменту "довільної відмови від роботи", а також потужністю навантаження на рівні анаеробного порогу ($W_{ПАН}$). Поріг анаеробного обміну (ПАН), як початок інтенсивного приросту концентрації лактату та момент переходу організму на переважно анаеробні джерела ресинтезу АТФ, визначали за початком нелінійного приросту легеневої вентиляції та підвищенням вентиляційного еквіваленту для O_2 (EQO_2). Навантаження виконувалися на тредмілі "Laufband" (Німеччина). Тестування проводилося після дня відпочинку при стандартизованому режимі харчування і питного режиму. Спортсмени були інформовані про зміст тестів і дали згоду на їхнє проведення.

Реакції КРС на фізичні навантаження оцінювали за допомогою ергоспірометричного комплексу "MetaMax3B" (Німеччина). Визначали легеневу вентиляцію (VE), частоту дихання (fT), дихальний об'єм (VT), концентрацію CO_2 і O_2 у видихуваному (FEO_2 , $FECO_2$) і в альвеолярному повітрі (FAO_2 , $FACO_2$), споживання O_2 (VO_2), виділення CO_2 (VCO_2), газообмінне відношення ($RQ=VCO_2/VO_2$),

вентиляційні еквіваленти для O_2 ($EQO_2=VE/VO_2-1$) і для CO_2 ($EQCO_2=VE/VCO_2-1$), кисневий пульс (O_2 -пульс= $VO_2/ЧСС$). Реєстрація частоти серцевих скорочень (ЧСС, уд./хв-1) проводилась за допомогою "Sport Tester Polar" (Фінляндія). Статистичний аналіз результатів дослідження проведено за допомогою програмного пакету SPSS ver.17.0. Показники газообміну були перевірені на нормальність за допомогою тесту Шапіро-Вілкс. Гомогенність дисперсій була проаналізована за допомогою тесту Лівайна з наступним проведенням дисперсійного аналізу (ANOVA). У випадку гетерогенності дисперсій було проведено модифікації дисперсійного аналізу (тести Брауна – Форсайта і Уельча).

Результати та їх обговорення. Нами проаналізовано вплив 6 поліморфізмів на показники кардіореспіраторної системи спортсменів. Проведений аналіз наукової літератури дозволив віднести до генетичних маркерів, що можуть обумовлювати аеробні можливості спортсменів, наступні поліморфізми: I/D поліморфізм гена ангіотензинконвертуючого фермента (ACE), T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізм гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), Pro₁₂→Ala поліморфізм гена γ-рецептора, що активується проліфераторами пероксисом (PPARG), G/C поліморфізм 7-го інтрону гена α-рецептора, що активується проліфераторами пероксисом (PPARA), Pro₅₈₂→Ser (C/T) поліморфізм гена гіпоксіяіндуцибельного фактору (HIF-1α), Ala₂₀₃→Pro поліморфізм гена β-коактиватора PPARγ (PPARGC1B).

Побудова множинних регресійних моделей показників кардіореспіраторної системи спортсменів дозволила виявити, що взаємодія поліморфізмів генів PPARG і eNOS статистично вірогідно впливає на показник легеневої вентиляції (VE max) ($p=0,040$), що є проявом реактивності кардіореспіраторної системи спортсменів. Інша модель свідчить про те, що поліморфізм гена eNOS впливає на величину вентиляційного коефіцієнта за киснем (EQO_2) ($P=0,046$), що характеризує економічність системи дихання (рис.1).

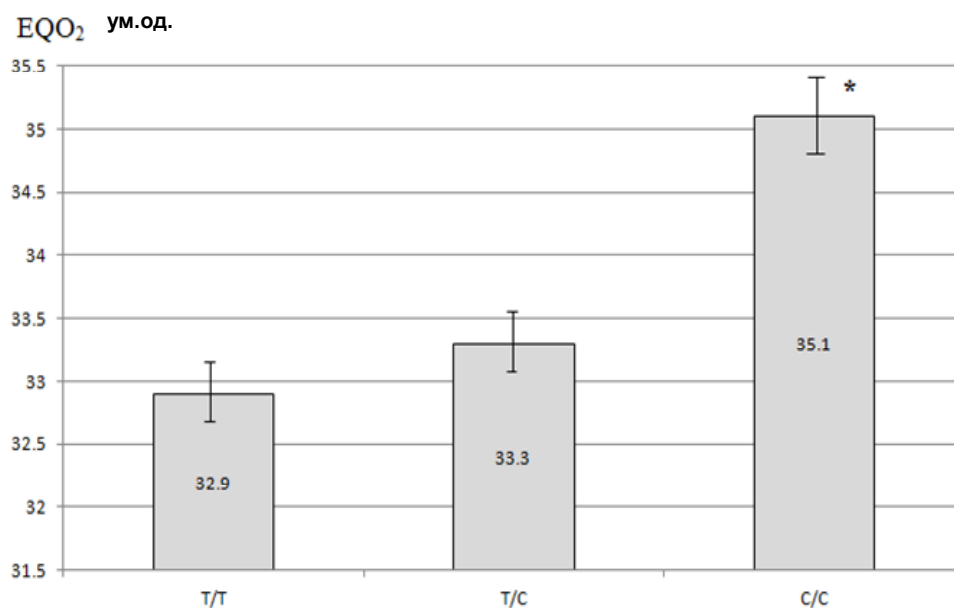


Рис.1. Вентиляційний еквівалент для O_2 у спортсменів з різними генотипами за T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізмом гена eNOS

* – вірогідні відмінності у порівнянні зі спортсменами з генотипом T/T, $p < 0,05$

Отримані дані дозволяють стверджувати, що наявність C-алеля T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізму гена eNOS у гомозиготному стані приводить до погіршення економічності

легеневої вентиляції при фізичних навантаженнях ступінчато-зростаючої потужності. Результати, отримані нами, добре пояснюються тим фактом, що, C-алель

сприяє зниженню активності гена eNOS, а недостатність кількості ендотеліальної NO-синтази, що при цьому виникає, є причиною зменшення синтезу і вивільнення оксиду азоту і дисфункції ендотелію судин [23].

Порівняння показників газоаналізу у спортсменок з генотипом T/T та спортсменок – носіїв алеля C (генотипи T/C та C/C) свідчить, що алель C призводить до погір-

шення як аеробної продуктивності, так і економічності кардіореспіраторної системи під час фізичної роботи, що виявляється у зменшенні потужності виконаної роботи на 7% при зростанні VE_{max} та VO_{2max} відповідно на 7 та 6%; збільшенні $VE_{пано}$ на 16,9%, $VO_{2 пано}$ на 6,3%, ЧСС $пано$ на 8% ($p=0,05$), $\%VO_{2 пано} / VO_{2max}$ на 4% (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристики реакцій кардіореспіраторної системи спортсменок з різними генотипами за $T^{786} \rightarrow C$ поліморфізмом гена eNOS під час фізичного навантаження

Показник	Од	Спортсменки з T/T-генотипом	Спортсменки з генотипами T/C і C/C
W_{max}	Вт	294,94±10,08	302,78±13,47
$W_{max} \text{ кг}^{-1}$	Вт·кг ⁻¹	4,37±0,20	4,08±0,17
VE_{max}	л·хв ⁻¹	113,34±6,31	121,43±4,04
$VE_{max} \text{ кг}^{-1}$	л·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	1,66±0,05	1,70±0,05
VO_{2max}	л·хв ⁻¹	3,39±0,12	3,61±0,11
$VO_{2max} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	50,38±2,17	51,16±1,92
VCO_{2max}	л·хв ⁻¹	3,96±0,18	3,96±0,11
$VCO_{2max} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	58,56±2,45	56,04±2,15
$ЧСС \cdot VO_{2max}^{-1}$	уд·хв ⁻¹	185,51±5,28	189,08±1,80
$VO_{2max} \cdot HR^{-1}$	мл·уд ⁻¹	18,18±0,64	19,26±0,66
EQO_2	-	32,78±1,01	33,13±0,88
$V'CO_2/V'O_2 \text{ фн}$	-	1,16±0,03	1,11±0,05
$W_{пано}$	Вт	219,23±10,35	231,99±7,03
$W_{пано} \text{ кг}^{-1}$	Вт·кг ⁻¹	3,26±0,18	3,28±0,13
$VE_{пано}$	л·хв ⁻¹	77,42±6,60	90,46±5,96*
$VE_{пано} \text{ кг}^{-1}$	л·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	1,12±0,07	1,26±0,07
$VO_{2 пано}$	л·хв ⁻¹	2,85±0,16	3,03±0,11
$VO_{2 пано} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	42,22±2,46	42,72±1,83
$ЧСС_{пано}$	уд·хв ⁻¹	162,42±7,28	176,82±2,49*
$VO_{2 пано} / VO_{2max}$	%	80,22±3,94	84,21±30,94

* – вірогідно у порівнянні з T/T-генотипом, $p < 0,05$

У спортсменів, носіїв C-алеля, спостерігається незначне збільшення аеробної потужності, при зниженні економічності роботи КРС системи. У осіб з T/C- та

C/C- генотипом EQO_2 перевищує на 5%, $VE_{пано}$ на 6%, аналогічні показники осіб з T/T-генотипом. Але $VO_{2 пано}$ є нижчим на 4% (табл. 2).

Таблиця 2. Показники газоаналізу спортсменів-чоловіків з різними генотипами за $T^{786} \rightarrow C$ поліморфізмом гена eNOS під час фізичного навантаження

Показник	Одиниці	Спортсмени з T/T-генотипом	Спортсмени з генотипами T/C і C/C
W_{max}	Вт	383,54±30,65	388,35±40,02
$W_{max} \text{ кг}^{-1}$	Вт·кг ⁻¹	4,39±0,47	4,43±0,54
VE_{max}	л·хв ⁻¹	164,68±27,64	173,29±38,31
$VE_{max} \text{ кг}^{-1}$	л·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	1,87±0,24	1,95±0,30
VO_{2max}	л·хв ⁻¹	5,05±0,58	5,06±0,54
$VO_{2max} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	57,40±7,20	57,64±6,22
VCO_{2max}	л·хв ⁻¹	5,64±0,61	5,53±0,87
$VCO_{2max} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	64,99±7,16	63,90±9,09
$ЧСС \cdot VO_{2max}^{-1}$	уд·хв ⁻¹	190,44±6,86	189,44±6,13
$VO_{2max} \cdot HR^{-1}$	мл·уд ⁻¹	26,46±3,31	26,90±3,30
EQO_2	-	32,42±3,67	33,99±5,01
$V'CO_2/V'O_2 \text{ фн}$	-	1,12±0,08	1,09±0,14
$W_{пано}$	Вт	302,94±39,17	305,81±56,00
$W_{пано} \text{ кг}^{-1}$	Вт·кг ⁻¹	3,49±0,67	3,49±0,73
$VE_{пано}$	л·хв ⁻¹	121,87±27,12	129,75±39,97
$VE_{пано} \text{ кг}^{-1}$	л·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	1,39±0,28	1,46±0,40
$VO_{2 пано}$	л·хв ⁻¹	4,36±0,73	4,23±0,73
$VO_{2 пано} \text{ кг}^{-1}$	мл·хв ⁻¹ ·кг ⁻¹	50,06±8,88	48,04±6,69
$ЧСС_{пано}$	уд·хв ⁻¹	172,54±17,18	174,47±12,65
$VO_{2 пано} / VO_{2max}$	%	86,36±9,45	84,62±9,87

Високий рівень максимального споживання кисню є необхідним для досягнення спортивних результатів у тих видах, що вимагають розвитку витривалості, але визначальна необхідність високого рівня VO_{2max} переоцінюється [2]. У різних видах спорту, що вимагають витривалості, змагальна діяльність ставить свої вимоги до компонентів функціональної підготовленості. В академічному веслуванні проходження змагальної дистанції на 70% забезпечується за рахунок аеробного метаболізму [12]. У лижних гонках на довгі дистанції співвід-

ношення аеробної та анаеробної роботи складає 95% та 5%, а в академічному веслуванні 70% на 30% [2]. Певні поліморфізми можуть відігравати ключову роль при виконанні вправ у конкретному виді спорту, що вимагає витривалості, але не мати ніякого значення для іншого виду спорту цієї ж класифікаційної групи. Тому для кожного виду спорту необхідно розробити свої критерії аеробних здібностей і орієнтуватися на специфічні для кожного виду молекулярно-генетичні маркери.

Для вияву поодинокого впливу поліморфізмів генів на показники газоаналізу під час виконання тестуючих навантажень був використаний метод однофакторного дисперсійного аналізу. За допомогою цього методу було встановлено, що поліморфізм гена *ACE* вірогідно впливає на показник вентиляційного еквіваленту за киснем (EQO_2) під час роботи зі ступінчасто-зростаючою потужністю навантаження ($p=0,02$) (рис.2).

Найбільшими величинами цього показника, тобто, найнижчою ефективністю легеневої вентиляції характеризувалися спортсмени з I/I- генотипом. Середньогруповий показник спортсменів з генотипом I/I переважав аналогічний показник у групі з I/D- генотипом на 11,5%. Між показниками вентиляційного еквіваленту за киснем у групах спортсменів з I/D- та D/D- генотипами вірогідної різниці не спостерігалось.

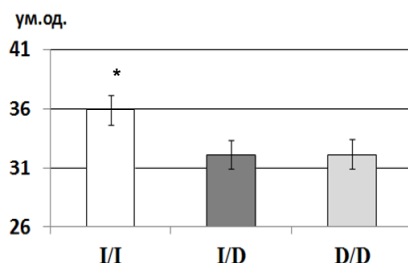


Рис.2. Залежність величини вентиляційного еквіваленту за киснем від поліморфізму гена *ACE*

*– вірогідні відмінності від показників спортсменів з D/D-генотипом

Крім того, встановлено, що I/D – поліморфізм вірогідно впливає на величину ЧСС_{max} , яку вважають корелятом аеробної потужності ($p=0,029$) (рис.3).

Найбільшою ЧСС_{max} характеризуються спортсмени з I/I – генотипом; їх показники перевищують аналогічні у спортсменів з D/D – генотипом на 6,5%. Виявлено тенденцію до прояву більш високого $\text{VO}_2 \text{ max}$ спортсменами з I/I – генотипом і зниження його у спортсменів з I/D – та D/D – генотипами. Таким чином, I – алель I/D поліморфізму гена *ACE* асоційована з максимальною ае-

робною потужністю. Даний факт цілком зрозумілий, враховуючи, що білковий продукт даного гена – ангіотензинперетворюючий фермент – приймає участь у судинорухових реакціях, впливає на метаболізм міокарду. I/D поліморфізм вивченого гена не є структурним, але впливає на рівень експресії даного гена. У осіб з D/D генотипом визначається максимальний рівень АПФ, у осіб з I/I генотипом – вдвічі нижчий, а у гетерозигот – проміжний [13;17].

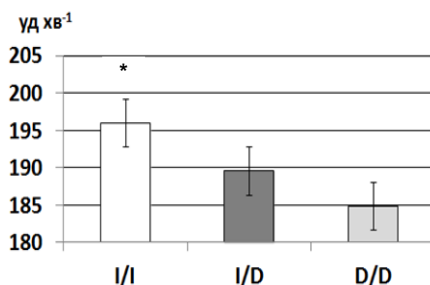


Рис. 3. Залежність ЧСС_{max} спортсменів від поліморфізму гена *ACE*

*– вірогідні відмінності від показників спортсменів з D/D-генотипом

За допомогою методу однофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що фактор поліморфізму гена *PPARA* вірогідно впливає як на абсолютну ($p=0,04$), так і на відносну величину потужності роботи (у перерахунку на кг маси тіла спортсмена) ($p=0,009$), що виконується на рівні ПАНО. У деяких видах спорту, де аеробна витривалість є основною вимогою до функціонального стану спортсменів, потужність виконуваної роботи на рівні лактатного порогу є кращим показником успіху у порівнянні з максимальною аеробною потужністю [7]. Серед носіїв G-алеля найменшим рівнем потужності роботи, що виконується на рівні лактатного порогу характеризувалися спортсмени з G/G-генотипом ($209,4 \pm 4,8$ Вт). На 20,3% абсолютна величина $W_{\text{ПАНО}}$ у спортсменів з даним генотипом була нижча за аналогічний показник у спортсменів з G/C генотипом. $W_{\text{ПАНО}}/\text{кг}$ маси тіла у спортсменів з G/G генотипом складала ($3,05 \pm 0,12$) Вт/кг; тоді як у спортсменів з G/C генотипом

($3,67 \pm 0,19$) Вт/кг. Таким чином, можна стверджувати, що G/C поліморфізм гена *PPARA* асоційований з потужністю навантаження роботи, що виконується на рівні ПАНО. Це явище можна пояснити тим, що вказаний ген контролює активність генів, що приймають участь у жировому та вуглеводному обміні, а швидкість досягнення порогу анаеробно-аеробного обміну залежить від інтенсивності цих процесів.

Висновки. Аналіз отриманих результатів свідчить про вплив поліморфізмів генів на адаптаційні реакції кардіореспіраторної системи у видах спорту з переважним розвитком витривалості. Встановлена асоціація поодиноких поліморфізмів на різні характеристики аеробних можливостей організму кваліфікованих спортсменів: I/D поліморфізм гена *ACE* асоційований з максимальною аеробною потужністю, T/C поліморфізм гена *eNOS* асоційований з ефективністю легеневої вентиляції для утилізації O_2 з повітря, G/C поліморфізм гена *PPARA* асоційований з роботоздатністю на рівні

порогу анаеробного обміну. Отримані результати можуть бути використаними для створення системи молекулярно-генетичної діагностики схильності юних спортсменів до занять видами спорту з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення.

Список використаних джерел

1. Ахметов И. И. Молекулярная генетика спорта : монография / И. И. Ахметов. – М., 2009.
2. Волков Н. И. Биоэнергетика спорта : монография / Н. И. Волков, В. И. Олейников. – М., 2011.
3. Платонов В. Н. Система подготовки спортсменов в олимпийском спорте. Общая теория и её практические приложения / В. Н. Платонов. – К., 2004.
4. Серебровская Т. В. К исследованию генотипической обусловленности показателей газового состава и кислотно-основного состояния крови при различных воздействиях на / Т. В. Серебровская, М. М. Филиппов // Физиолог. журн. – 1983. – Т. XXIX, № 1. – С. 48–52.
5. Степанов В. А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина / В. А. Степанов // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2, № 4 (7). – С. 18–34.
6. Филиппов М. М. Про співвідношення факторів генотипу та середовища в реакціях організму до фізичних навантажень / М. М. Филиппов // Українське наукове товариство. XII з'їзд. – К. – Наук. думка, 1982. – С. 423.
7. Физиологическое тестирование спортсменов высокого класса / под ред. Дж. Д. Мак-Дугалла, Г. Э. Уэнгера, Г. Дж. Грина. – К., 1998.
8. Ahmetov I. I. Sport genomics: current state of knowledge and future directions / I. I. Ahmetov // Cellular and Molecular Exercise Physiology – 2012. – № 1. – P. 1–24.

9. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update / M. S. Bray, J. M. Hamberg, L. Perrusse, et. al. // Medicine & Science in Sports & Exercise. – 2009. – Vol. 41, № 1, – P. 35–73.

10. Genomic Predictors of Maximal oxygen Uptake response to standardized exercise training programs / C. Bouchard, M. A. Sarzynski, T. K. Rice et. al. // J. Appl. Physiol. – 2010.

11. Aerobic performance in brother, dizygotic and monozygotic twins. / C. Bouchard, R. Lesage, G. Lortie et. al. // Medicine and Science in Sports and Exercise – 1986 – № 18. – P. 639–646.

12. Hagerman F. C. Applied physiology of rowing / F. C. Hagerman // Sports Med. – 1984. – Vol. 1 (4). – P. 303.

13. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training / H. Montgomery, P. Clarkson, M. Barnard et. al. // Lancet. – 1999. – Vol. 353. – P. 541–545.

14. Endurance Performance: Genes or Gene Combinations / F. Gómez-Gallego, C. Santiago, M. González-Freire et. al. // Int. J. Sports Med. – 2009 – № 30. – P. 66–72.

15. Advances in Exercise, Fitness, and Performance Genomics / T. Rankinen, S. M. Roth, M. S. Bray et. al. // Medicine and Science in Sports and Exercise. – 2010. – № 42 (5). – P. 835–846.

16. Using molecular classification to predict gains in maximal aerobic capacity following endurance exercise training in humans / J. A. Timmons, S. Knudsen, T. Rankinen et. al. // J. Appl. Physiol. – 2010. – Jun.; 108 (6). – P. 1487–96.

17. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin converting enzyme gene (ACE) controls plasma ACE / L. Tiret, B. Rigat, S. Visvikis et. al. // Am. J. Hum. Genet. – 1992. –

Надійшла до редколегії 18.11.14

С. Дроздовская, канд. физ. восп.

Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев, Украина

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНГИОТЕНЗИН-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ И А-РЕЦЕПТОРА, АКТИВИРУЕМОГО ПРОЛИФЕРАТОРАМИ ПЕРОКСИСОМ, С ПОКАЗАТЕЛЯМИ АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ СПОРТСМЕНОВ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ.

Изучены особенности проявления адаптационных реакций кардиореспираторной системы спортсменов с различными генотипами на физические нагрузки. Исследовано влияние полиморфизмов генов ACE, eNOS, PPARG, HIF-1α, PPARGC1B на показатели газоанализа у спортсменов во время физических нагрузок. Установлено ассоциацию I/D полиморфизма гена ACE, T/C полиморфизма гена eNOS и G/C полиморфизма гена PPARG с показателями аэробной производительности квалифицированных спортсменов. Рассматривается возможность определения склонности к проявлению высоких аэробных способностей при помощи молекулярно-генетических маркеров.

Ключевые слова: полиморфизмы генов, реакции кардиореспираторной системы, спортивный отбор.

S. Drozdovska, PhD

National University of Physical Education and Sports of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ASSOCIATION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME, ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-γ GENE POLYMORPHISMS WITH INDICES OF CARDIORESPIRATORY SYSTEMS REACTIONS TO EXERCISE

The feature of cardiorespiratory system responses to physical load has been investigated in athletes with different genotypes. The influence of ACE, eNOS, PPARG, HIF-1α, PPARGC1B gene polymorphisms on gas analysis indices have been analyzed. The association of I/D ACE, T/C eNOS G/C PPARG gene polymorphisms with various characteristics of aerobic capacities of the qualified athletes has been established. The possibilities of determination of predisposition to high level aerobic ability due to assessment of the molecular-genetic markers are discussed in the paper.

Key words: genes polymorphisms, reactions of cardiovascular systems, sports selection.

УДК 582.28 : [665.52+661.163.2]

Т. Кондратюк, канд. біол. наук, А. Калініченко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ЕФІРНИХ ОЛІЙ ТА ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДІНУ НА ЧОРНІ ДРІЖДЖЕПОДІБНІ ГРИБИ *EXOPHIALA ALCALOPHILA*

Досліджено вплив ефірних олій *Rosmarinum officinalis* L., *Pinus sibirica* Du Tour, *Abies sibirica* Ledeb., *Juniperus communis* L., терпентинові олії (скипидару) та біоциди полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) на чорні дріжджеподібні гриби (ЧДГ) *Exophiala alcalophila* FCKU 304. В експериментах використовували диско-дифузійний метод. В результаті проведених робіт встановлено, що досліджені сполуки різнилися за рівнем антифунгального впливу на *E. alcalophila*. Найвищою фунгіцидною дією характеризувався ПГМГ у концентрації 5%. З'ясовано, що рівень антифунгальної активності ефірних олій *Rosmarinum officinalis*, *Pinus sibirica* та *Abies sibirica* подібний до дії ПГМГ у концентраціях 1,5–3 %. Встановлено, що ПГМГ та ефірна олія *Rosmarinum officinalis* призводять до змін морфометричних показників клітин, морфології колоній та інтенсивності брунькування *E. alcalophila*, що є проявом адаптаційних властивостей дослідженої культури ЧДГ. Під впливом ефірної олії *Rosmarinum officinalis* відбувався диморфний перехід *E. alcalophila* "дріжджі – міцелій".

Ключові слова: *Exophiala alcalophila*, ефірні олії, полігексаметиленгуанідин, антифунгальний вплив.

Вступ. Представники роду *Exophiala* належать до філогенетично гетерогенної групи чорних дріжджеподібних грибів J.W.Carmich (ЧДГ). Вони широко поширені у природі на деревині, у ґрунті, воді, трапляються в угру-

пованнях пошкоджувачів різноманітних будівельних матеріалів, мармуру, кам'янистих субстратів [2, 3, 6, 14], конструкцій та техніки орбітальної космічної станції "Мир" [1]. Види даного роду "заселяють" такі екологічні

© Кондратюк Т., Калініченко А., 2014

ніші антропогенного походження, як побутові прилади (пральні та посудомийні машини, кавоварки та ін.) [22, 25]. Чорні дріжджі роду *Exophiala* здатні переходити у поліекстремотолерантні форми, набуваючи здатності до виживання у широкому діапазоні рН та за температур, близьких до кипіння, що свідчить про високі адаптаційні властивості даних організмів [25]. Усі види роду *Exophiala* віднесені до IV групи патогенності [10, 15], деякі з них здатні викликати тяжкі захворювання навіть у здорових, імункомпетентних людей [14].

У медичній практиці, а також для створення фунгіцидних препаратів для промислового чи побутового застосування, переважно використовують синтетичні хімічні сполуки. Серед них широкого застосування набули, зокрема, полімерні похідні гуанідинів. Солі полігексаметиленгуанідинів (ПГМГ) мають високі спектри біоцидної активності: їм притаманна бактерицидна, спороцидна, фунгіцидна, альгіцидна дія. Полярна гуанідинова та іонізована гексаметиленова групи надають цим сполукам адгезивні та поверхнево-активні властивості. Фунгіциди, створені на основі ПГМГ, за комплексом токсикологічних, мікробіологічних та санітарно-технічних властивостей віднесені до малотоксичних речовин IV класу [4, 7, 13]. На особливу увагу дослідників заслуговують також природні сполуки, що володіють широким спектром бактерицидної та фунгіцидної дії, зокрема натуральні ефірні олії. Антифунгальний вплив ефірних олій здійснюється шляхом збільшення проникності плазматичної мембрани, що призводить до подальшого витоку цитоплазматичного вмісту, а надалі і до загибелі

грибів. Ефективність натуральних ефірних олій залежить від їх хімічного складу, який варіює навіть всередині виду рослини. Наприклад, терпенові складові ефірних олій (у більшій мірі, ніж феноли та альдегіди) реагують з мембранними ферментами та руйнують плазматичну мембрану дріжджових грибів [20, 21]. Важливо відмітити, що резистентність до впливу природних фунгіцидних речовин у мікроскопічних грибів виникає за значно довший період, ніж до впливу антибіотиків та хімічно синтезованих препаратів [21]. Дані щодо впливу ефірних олій та солей ПГМГ на гриби роду *Exophiala* в літературі відсутні. Враховуючи широку екологічну амплітуду ЧДГ роду *Exophiala* та здатність представників деяких видів викликати захворювання у тварин та людини, актуальною задачею сьогодні є пошук та дослідження сполук, яким була б притаманна антифунгальна дія щодо представників даного роду.

Метою роботи було з'ясувати характер впливу ряду ефірних олій, що вміщують терпенові вуглеводні (*Rosmarinum officinalis* L., *Pinus sibirica* Du Tour, *Abies sibirica* Ledeb., *Juniperus communis* L.), терпентинові олії (скипидару) та біоциду ПГМГ щодо чорних дріжджів *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень слугувала чиста культура чорних дріжджів *Exophiala alcalophila* FCKU 304 (рис. 1) з колекції мікроскопічних грибів-деструкторів Київського національного університету імені Тараса Шевченка (міжнародний акронім колекції – FCKU), ізольована з пошкодженого акрилового герметика у житловому приміщенні [8].

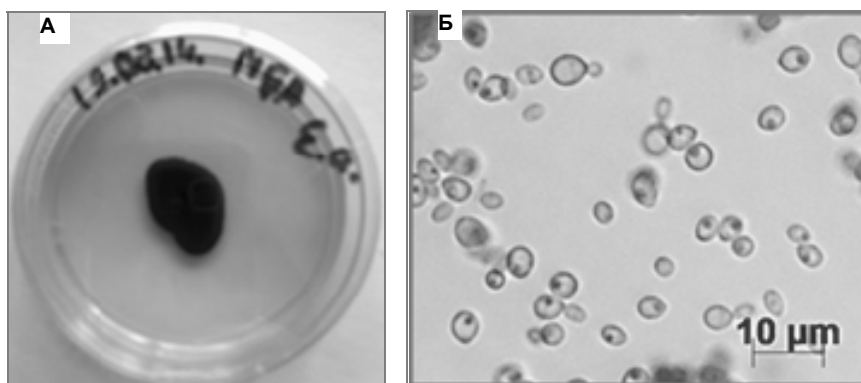


Рис. 1. Чиста культура *Exophiala alcalophila* FCKU 304 (А – колонія на середовищі МЕА, Б – клітини *E. alcalophila*, ×400)

Для дослідження було використано ефірні олії рослин, що належать до порядків *Pinales* та *Lamiales* (табл. 1) та терпентинову олію (медичний скипидар, джерело одержання сировини – живиця *Pinus sylvestris*), придба-

ні в аптечній мережі. Дані ефірні олії за даними літератури [17] мають високий вміст терпенових вуглеводнів, головним чином, альфа- та бета-пінен.

Таблиця 1. Ефірні олії рослин, використані у дослідженнях

Рослини, ефірні олії яких використовували		Хімічний склад ефірної олії*
Українська назва	Латинська назва	
Ялівець звичайний	<i>Juniperus communis</i> L., порядок <i>Pinales</i>	Альфа- і бета-пінен, альфа-туйен, камфен, сабінен, мірцен, феландрен, терпінен, цимен, лімонен, терпінолен та ін.
Ялиця сибірська	<i>Abies sibirica</i> Ledeb., порядок <i>Pinales</i>	Борнілацетат (28 – 40%), альфа-і бета-пінен, камфен, дельта-3-карен, феландрен, альфа- і гамма-терпінен, лімонен, камфора та ін.
Розмарин лікарський	<i>Rosmarinus officinalis</i> L., порядок <i>Lamiales</i>	Альфа- і бета-пінен, камфен, цимол, 1,8-цинеол, лімонен, камфора, борнеол, терпінеол, бета-каріофіллен тощо.
Сосна сибірська	<i>Pinus sibirica</i> Du Tour, порядок <i>Pinales</i>	Кадинен і борнілацетат (2-10%), пінен, терпинеол, феландрен, лімонен, мірцен, камфора, смоляні кислоти та ін.
Сосна звичайна	<i>Pinus sylvestris</i> L., порядок <i>Pinales</i>	Альфа-пінен (60-70%), бета-пінен (6-8%), 3-карен (10-18%), камфен (2-3%), мірцен (1-2%), дипентен та лімонен (4-6%), терпінолен (2-3%) та цимол (2-4%).

*Примітка: склад ефірних олій вказаний за даними виробника

Дію ефірних олій порівнювали із дією біоцидної речовини полігексаметиленгуанідин-фосфату (ПГМГ-Ф, ТМ

"Полідез") в концентраціях 1.5, 2, 3 та 5% [9]. Розведення біоциду здійснювали у стерильній водопровідній воді.

Для вивчення антифунгального впливу ефірних олій та ПГМГ-Ф на культуру дріжджів *E. alcalophila* використовували диско-дифузійний метод [11]. Готували суспензію клітин дріжджів (з використанням стерильного 9%-го розчину NaCl) густиною $1 \cdot 10^6$ КУО/мл (колонієутворюючих одиниць на мл), яку визначали за допомогою камери Горяєва. Перерахунок кількості КУО/мл здійснювали за формулою [18]:

$$N = n \cdot 2,5 \cdot 10^5,$$

де N – кількість КУО в 1 мл, n – кількість клітин у великому квадраті камери.

Отриману суспензію клітин *E. alcalophila* (0,3 мл) використовували для засіву газonom поверхні стандартного поживного середовища MEA (Malt-extract agar, MERCK, Німеччина) у чашках Петрі діаметром 60 мм. Стерильні диски з фільтрувального паперу (марка ФМ, 85 г/м², ГОСТ 12026–76, дисків – 5 мм) просочували нерозведеними ефірними оліями та терпентиновою олією, а також ПГМГ-Ф у досліджуваних концентраціях. Експеримент проводили у трьох повторностях. Термін культивування складав 30 діб за температури 28°C. Вплив ефірних олій та біоциду визначали за діаметром зон затримки росту *E. alcalophila*, що утворювалися навколо дисків. Контролем слугувала культура досліджуваних дріжджів без внесення олій та біоциду. Для оцінки антифунгального впливу досліджуваних сполук використовували такі значення діаметру зон затримки росту *E. alcalophila* [18]:

- відсутність зон затримки росту – антифунгальний вплив відсутній;

- діаметр зони <10 мм – слабкий антифунгальний вплив;
- діаметр зони >10 мм – помірний антифунгальний вплив;
- ріст на чашці Петрі відсутній – високий антифунгальний вплив.

При дослідженні антифунгального впливу ефірних олій та ПГМГ-Ф з метою визначення морфометричних показників клітин (довжина та ширина), а також інтенсивності брунькування, матеріал (клітини дріжджів) для мікроскопіювання та фотографування препаратів відбирали на 7-у та 10-у добу культивування на межі зони затримки росту. Вказані дослідження здійснювали за допомогою мікроскопу Primo Star компанії Carl Zeiss (Німеччина) при збільшенні $\times 400$. Довжину та ширину клітин вимірювали за допомогою морфометричної комп'ютерної програми AxioVision (Carl Zeiss). Для здійснення аналізу морфометричних показників, інтенсивності брунькування (у трьох полях зору), а також діаметру зон затримки росту, вираховували середнє арифметичне та стандартне відхилення за допомогою програми Statistica 12.

Результати та їх обговорення. За результатами проведених досліджень встановлено, що досліджені сполуки проявили фунгіцидний та фунгістатичний вплив на культуру *E. alcalophila*. Ефірна олія *Rosmarinum officinalis* здійснювала помірну антифунгальну дію на *E. alcalophila* (діаметр зон затримки росту наприкінці культивування становив $11,1 \pm 1,3$ мм), тоді як олії *Pinus sibirica*, *Abies sibirica* – слабку (діаметр зон затримки росту складав <10 мм) (рис. 2).

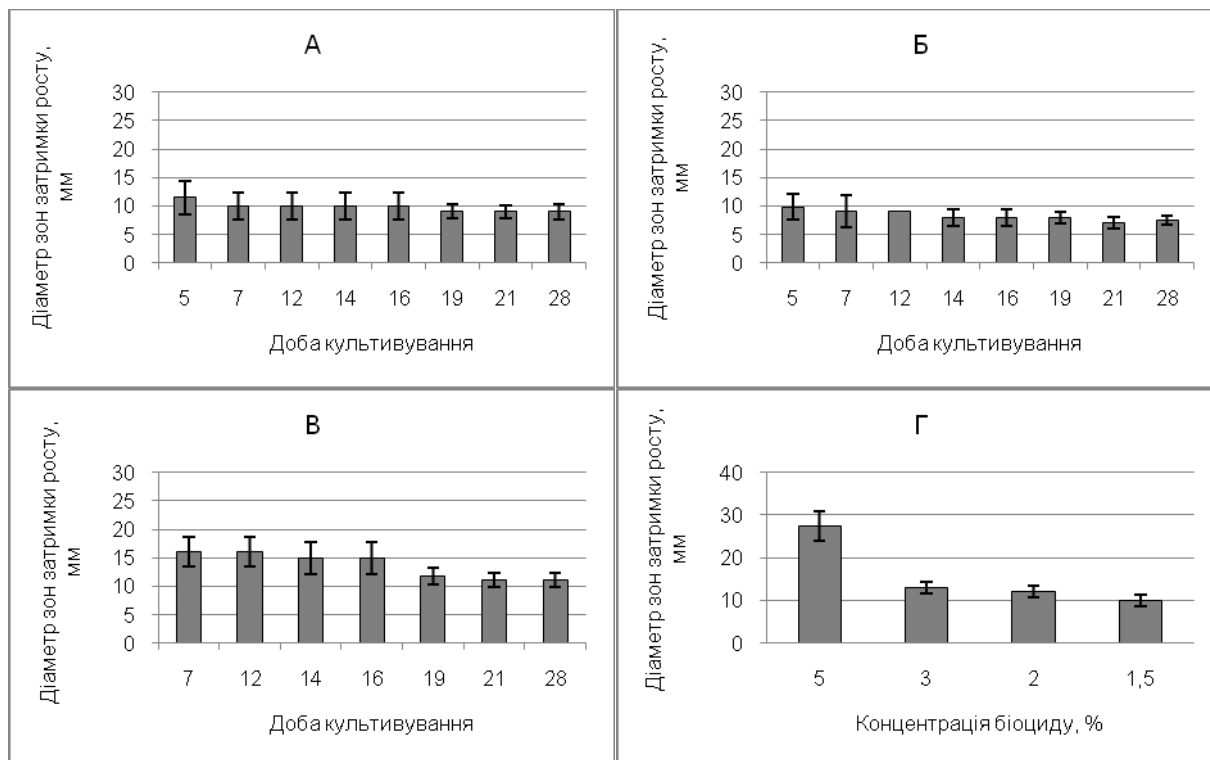


Рис. 2. Зміни діаметру зон затримки росту *Exophiala alcalophila* за умов впливу різних сполук: ефірних олій (А – *Abies sibirica*, Б – *Pinus sibirica*, В – *Rosmarinum officinalis*) та біоциду ПГМГ-Ф (14-а доба культивування)

Ефірна олія *Juniperus communis* проявила лише фунгістатичний вплив на *E. alcalophila*: спостерігали слабку антифунгальну дію лише до 7-ї доби культивування. У терпентиновій олії антифунгальної активності не виявлено. Нами було встановлено, що за умов впливу ефірних олій *Rosmarinum officinalis* та *Abies sibirica* синтез чорного пігменту, який обумовлює колір колоній

E. alcalophila, відбувався із значним запізненням: до 16-ої та до 13-ої доби культивування, відповідно, колонії *E. alcalophila* мали світло-коричневий колір, на відміну від яскраво-чорного у контролі.

За умов впливу біоциду ПГМГ-Ф у концентрації 5 % констатували утворення найбільших зон затримки росту, діаметр яких складав $27,5 \pm 3,5$ мм. При зменшенні

концентрації ПГМГ-Ф антифунгальний вплив даного препарату характеризували як помірний, оскільки спостерігали значне зменшення діаметру зон затримки росту (рис. 2, Г). При порівнянні дії ефірних олій та ПГМГ-Ф на культуру *E. alcalophila* можна стверджувати, що ті ефірні олії, які мали фунгіцидний та фунгістатичний вплив на досліджувану культуру ЧДГ, за ефективністю були наближені до ПГМГ-Ф у концентраціях 1,5-3%.

Аналіз літературних даних свідчить, що відомості про вплив ефірних олій на дріжджі сконцентровані, передусім, навколо грибів роду *Candida*, що є клінічно значущими. Для здійснення порівняння отриманих у нашій роботі результатів із літературними даними використовували джерела, в яких наведено результати досліджень впливу ефірних олій на дріжджеподібні гриби роду *Candida* та деякі інші мікроскопічні гриби [19, 15, 21, 23, 24]. Отримані результати щодо антифунгального впливу ефірних олій, використаних у роботі, на ЧДГ *E. alcalophila* в цілому підтверджують літературні дані. Так, наприклад, для ефірних олій рослин роду *Abies* встановлено наявність антифунгального ефекту щодо різних видів роду *Candida* [18], ефірні олії рос-

лин роду *Pinus* проявляли фунгіцидну дію щодо мікроміцетів роду *Fusarium* [23]. В роботі Giordani R., Kaloustian J. [21] наведено дані, за якими ефірна олія *Rosmarinus officinalis* проявляє достатньо слабкий антифунгальний ефект щодо *Candida albicans*, тоді як у нашій роботі встановлено помірну дію даної ефірної олії щодо *E. alcalophila*. Ряд відмінностей у ефектах (фунгіцидний, фунгістатичний), що спостерігали, може бути обумовлений як особливостями використаного у нашій роботі об'єкта дослідження (чорні дріжджі), так і хімічним складом ефірних олій, який може різнитися в залежності від ряду умов (країни походження рослини, технологій виробника тощо).

Дослідження морфометричних показників клітин *E. alcalophila* показали, що під впливом ефірної олії *Rosmarinus officinalis* і 5%-го ПГМГ-Ф збільшувалися середні показники довжини та ширини клітин, збільшувався відсоток клітин, що брунькуються (у порівнянні із контрольним варіантом) (табл. 2). За умов дії ПГМГ-Ф у концентрації 1,5 % середня довжина клітин зменшувалася, а ширина клітин та інтенсивність брунькування були більшими, ніж у контролі.

Таблиця 2. Зміни морфометричних показників клітин *E. alcalophila* та частки клітин (%), що брунькуються, під впливом ефірної олії *Rosmarinus officinalis* та біоциду ПГМГ-Ф

Сполуки	Довжина клітини, мкм	Ширина клітини, мкм	Кількість клітин, що брунькуються, %
Ефірна олія <i>Rosmarinus officinalis</i>	4,6±0,5	3,3±0,5	8,3±1,5
ПГМГ-Ф, 5%	4,5±0,6	3,8±0,6	12,6±0,6
ПГМГ-Ф, 1,5%	3,6±0,6	2,9±0,6	3,3±0,6
Контроль	4,2±0,5	2,8±0,4	1,3±0,6

Таким чином, вплив біоциду ПГМГ-Ф, а також ефірної олії *Rosmarinus officinalis* на *E. alcalophila* призводить до морфологічних змін клітин *E. alcalophila*. Отримані результати підтверджують дані літератури про вплив біоцидів на морфометричні показники мікроскопічних грибів та інтенсивність брунькування дріжджів [5].

На 20-у добу культивування під впливом ефірної олії *Rosmarinus officinalis* візуально констатували також

зміну морфології колоній *E. alcalophila*: колір колоній змінювався з чорного блискучого на матовий сірий, гладенька поверхня набувала оксамитового нальоту. Мікроскопіювання препаратів показало, що такі зміни пов'язані з утворенням *E. alcalophila* міцелію та псевдоміцелію (рис. 3), що свідчить про вплив ефірних олій на структурно-функціональну реорганізацію *E. alcalophila*: відбувається диморфний перехід "дріжджі – міцелій".

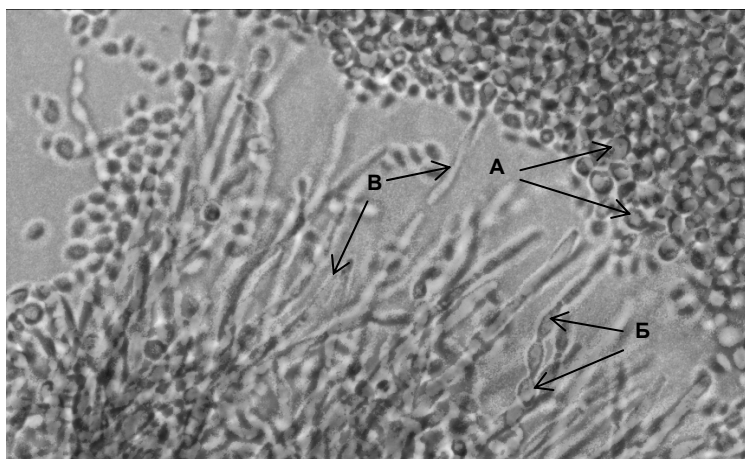


Рис. 3. Дріжджові клітини (А), псевдоміцелій (Б) та міцелій (В) *Exophiala alcalophila* після впливу ефірної олії *Rosmarinus officinalis*, ×400

Такі перетворення, за даними літератури, є одним із проявів адаптивних реакцій мікроскопічних грибів до стресових умов середовища [12]. У той же час в контролі візуально не спостерігали морфологічних змін колоній, при мікроскопіюванні препаратів було виявлено лише поодинокі міцеліальні структури.

Висновки. Вперше встановлено, що ефірні олії *Rosmarinus officinalis*, *Pinus sibirica*, *Abies sibirica*, *Juniperus communis* та біоцид ПГМГ-Ф чинять антифунгальний ефект різного рівня щодо ЧДГ *Exophiala*

alcalophila. Найвищим антифунгальним впливом на *E. alcalophila* характеризувався ПГМГ-Ф у концентрації 5%. Ефірні олії *Rosmarinus officinalis*, *Pinus sibirica*, *Abies sibirica* за рівнем антифунгальної активності були наближені до дії ПГМГ-Ф у концентраціях 1,5–3 %. В терпентиновій олії (скипидару) антифунгальний ефект щодо *E. alcalophila* не виявлено. Встановлено, що використані у роботі біоцид ПГМГ-Ф та ефірна олія *Rosmarinus officinalis* призводять до змін морфометричних показників клітин, морфології колоній та інтенсивності брунькування

E. alcalophila, що свідчить про прояв адаптаційних властивостей дослідженої культури ЧДГ. Вперше встановлено вплив ефірної олії *Rosmarinum officinalis* на структурно-функціональну реорганізацію *E. alcalophila*. Ефірні олії, які проявили антифунгальну активність (олії *Rosmarinum officinalis*, *Pinus sibirica*, *Abies sibirica*) та інші є перспективними для подальших досліджень.

Список використаних джерел

1. Микроскопические грибы на российском сегменте международной космической станции / Т. А. Алехова, А. В. Александрова, Н. А. Загустина и др. // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43, вып. 5. – С. 377–387.
2. Власов Д. Ю. Микромицеты в литобитных сообществах: разнообразие, экология, эволюция, значение : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.24 / Д. Ю. Власов. – М., 2008.
3. Власов Д. Ю. Микобиота каменного субстрата в городской среде / Д. Ю. Власов, М. С. Зеленская, Е. В. Сафронова // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38, вып. 4. – С. 13–22.
4. Воинцева И. И. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционных материалах / И. И. Воинцева, П. А. Гембицкий. – М., 2009.
5. Проблемы использования биоцидов для защиты книг от плесневых грибов / И. А. Гончарова, А. А. Балюта, Н. В. Иконникова, А. Г. Мицкевич // Книга ў фарміраванні духоўнай культуры і дзяржаўнасці Беларускага народа : матэрыялы XVIII Міжнароднага міжнароднага кангрэсу, прысвечанага Дням славянскага пісьменства і культуры. – Мінск, 2012. – Т. 2.
6. Дашко Р. Э. Исследование инженерно-геологических и микробиологических факторов для оценки динамики разрушения тоннеля на участке автодороги Санкт-Петербург – Киев / Р. Э. Дашко, К. В. Панкратова, А. А. Коробко // Зап. Горн. ин-та. – 2012. – Т. 195. – С. 24–27.
7. Ефимов К. М. Полигуанидины класс малотоксичных дезинфицирующих средств пролонгированного действия / К. М. Ефимов, П. А. Гембицкий, А. Г. Снежко // Дезинфекционное дело. – 2000. – № 4. – С. 3–12.
8. Кондратюк Т. Чорні дріжджоподібні гриби *Exophiala alcalophila* Goto et Sugly із пошкодженого герметика в умовах високої вологості приміщень / Т. Кондратюк // Modern Phytomorphology – 2013. – Т. 3. – С. 225–229.
9. Методичні вказівки щодо застосування засобу Полідез з метою дезінфекції / упоряд. А. М. Зарицький, О. В. Гудзь, І. Л. Михно. – К., 2002.
10. Озерская С. М. Патогенные грибы: категоризация биологического риска и разнообразие / С. М. Озерская, Н. Е. Иванушкина, Г. А. Кочина // Успехи медицинской микологии. – М., 2007. – Т. 1.

Т. Кондратюк, канд. биол. наук, А. Калиниченко, студ.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА НА ЧЕРНЫЕ ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ *EXOPHIALA ALCALOPHILA*

Исследовано влияние эфирных масел *Rosmarinum officinalis* L., *Pinus sibirica* Du Tour, *Abies sibirica* Ledeb., *Juniperus communis* L., терпентинового масла (скипидара) и биоцида полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) на черные дрожжеподобные грибы *Exophiala alcalophila* FCKU 304. В экспериментах использовали диско-диффузионный метод. В результате проведенных работ установлено, что исследованные соединения отличались по уровню антифунгального влияния на *E. alcalophila*. Самым высоким фунгицидным действием характеризовался ПГМГ в концентрации 5%. Нами констатировано, что уровень антифунгальной активности эфирных масел *Rosmarinum officinalis*, *Pinus sibirica* и *Abies sibirica* подобный действию ПГМГ в концентрациях 1,5–3 %. Установлено, что ПГМГ и эфирное масло *Rosmarinum officinalis* приводят к изменениям морфометрических показателей клеток, морфологии колоний и интенсивности почкования *E. alcalophila*, что является проявлением адаптационных свойств исследованной культуры ЧДГ. Под влиянием эфирного масла *Rosmarinum officinalis* происходит диморфный переход *E. alcalophila* "дрожжи – мицелий".

Ключевые слова: *Exophiala alcalophila*, эфирные масла, полигексаметиленгуанидин, антифунгальное влияние.

T. Kondratyuk, PhD, A. Kalinichenko, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF ESSENTIAL OILS AND POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE ON BLACK YEAST-LIKE FUNGI *EXOPHIALA ALCALOPHILA*

Influence of essential oils of the following plants *Rosmarinum officinalis* L., *Pinus sibirica* Du Tour, *Abies sibirica* Ledeb., *Juniperus communis* L., turpentine oil, and polyhexamethyleneguanidine (PHMG) on black yeast-like fungi *Exophiala alcalophila* FCKU 304 was investigated. Disc-diffusion method was used. Level of the antifungal influence on *E. alcalophila* found to be different for each chemical. 5% PHMG is characterized by the highest fungicide activity. Level of the antifungal activity of essential oils of plants *Rosmarinum officinalis*, *Pinus sibirica* and *Abies sibirica* is similar to 1.5–3 % PHMG activity. The PHMG and essential oil of *Rosmarinum officinalis* found to cause exchanges of morphometric indices of cells, colony morphology and intensity of budding *E. alcalophila* what is considered as adaptations of investigated culture of black yeast-like fungus. Furthermore dimorphic transition 'yeasts – mycelium' of *E. alcalophila* was observed under influence of essential oil of *Rosmarinum officinalis*.

Key words: *Exophiala alcalophila*, essential oils, polyhexamethyleneguanidine, antifungal influence.

11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : метод. указания. – М., 2004.
12. Панина Л. К. Структурно-функциональная реорганизация микромитозов в процессах формообразования и роста на труднодоступных субстратах: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Л. К. Панина. – СПб., 2000.
13. Поликарпов Н. А. Действия полигуанидинов на макро- и микроорганизмы / Н. А. Поликарпов // Фармакология и токсикология. – 2008. – № 7. – С. 14–15.
14. Саттон Д. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди ; пер с англ. К. Л. Тарасова, Ю. Н. Ковалева ; под ред. И. Р. Дорожковой. – М., 2001.
15. Скоробогатова Р. А. Растения как антимикотики и фунгициды / Р. А. Скоробогатова, И. С. Жебрак, О. В. Сайко // Актуальные проблемы экологии : материалы VI междунар. науч.-практ. конф. – Гродно : ГрГУ, 2010.
16. СП 1.3.2322–08 "Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций". – М. : Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потреб. и благопол. чел., 2008.
17. Фитонциды в медицине. / Н. М. Макаручук, Я. С. Лещинская, Ю. А. Акимов и др. – К., 1990.
18. Черкес Ф. К. Микробиология / Ф. К. Черкес, Л. Б. Богоявленская, Н. А. Бельская. – М., 1987.
19. Шакалите Ю. Действие натуральных фунгицидных средств на рост видов дрожжеподобных грибов *Candida* / Ю. Шакалите, А. Пашкявичюс, К. Ложене // Современная микология в России. – М., 2008. – Т. 2.
20. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) // S. D. Cox, C. M. Mann, J. L. Markham? et al. // J. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 88. – P. 170–175.
21. Giordani R. Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques / R. Giordani, J. Kaloustian // Phytothérapie. – 2006. – Vol. 4. – P. 121–124.
22. Hamada N. Black yeasts in washing machines and dishwashers. Fifth meeting of the ISHAM working groups on Black Yeasts and Chromoblastomycosis. Electronic Abstracts. Guangzhou, China, 29 November – 1 December, 2013.
23. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus* / M. Krauze-Baranowska et al. // Z. Naturforsch. C. – 2002. – May-Jun., 57 (5–6). – P. 478–482.
24. Lee J. H. Comparative analysis of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana* activities / J. H. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 19 (4). – P. 372–377.
25. Dishwashers – a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens / P. Zalar, M. Novak, G. S. Hoog de, N. Gunde-Cimerman // Fungal Biol. – 2011. – Oct., 115 (10). – P. 997–1007.

Надійшла до редколегії 19.11.14

УДК: 57.017.642:636.52/.58:546.26

В. Лавриненко, старш. лаб., Ю. Чайковський, д-р мед. наук
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Киев

ВПЛИВ ВУГЛЕЦЕВИХ МАТЕРІАЛІВ РІЗНОЇ ДИСПЕРСНОСТІ НА МАКРОСКОПІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЕМБРІОГЕНЕЗУ КУРКИ

Досліджено вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на курячі зародки, одержані при інкубуванні яєць лінії Хай-Лайн білий. Розчин активованого вугілля, алмазних наночастинок, технічного вугілля та терморозширеного графіту на біосумісному декстрані вводили у жовтковий мішок зародків на 3 добу інкубації і проводили оцінку розмірів ембріонів та стану судин стінки їх жовткового мішка на 6, 14 і 20 добу інкубації. За однакових умов з експериментальними групами інкубували яйця з інтактною групою, які не зазнавали жодних сторонніх впливів. Було показано негативний вплив технічного вугілля на стан судин стінки жовткового мішка зародків, алмазних наночастинок та технічного вугілля на обидва макроскопічні показники ембріогенезу курки.

Ключові слова: ембріогенез курки, активоване вугілля, сажа, алмазні наночастинок, терморозширений графіт, судини стінки жовткового мішка.

Вступ. У зв'язку зі зростаючим у всьому світі інтересом до застосування нанорозмірних вуглецевих матеріалів у різних галузях людської діяльності, і в медицині зокрема, актуальними є дослідження їх впливу на живі організми на прикладі такого чутливого зразка, як курячий ембріон. На жаль, незважаючи на значну кількість дослідження токсичності наноматеріалів не стандартизовані, через що важко встановлювати зв'язок між отриманими результатами та будовою, розмірністю різних матеріалів, їхніми біологічними ефектами [1 – 5]. Загалом вважається, що активоване вугілля (АВ) не здатне проникати крізь тканини організму і абсолютно інтактне, тому з давніх часів використовується в медицині. Проте технологія приготування АВ, котра передбачає вплив високих температур, може супроводжуватись утворенням дрібних часточок з великою проникною здатністю, зокрема – нанорозмірних. Аналогічно є ситуація з терморозширеним графітом, що переважно використовується у промисловості і лише опосередковано – в медицині, (матриця для синтезу нанотрубок), адже для розширення просторів у кристалічній решітці природно-кристалічного графіту використовують хімічні сполуки і високу температуру.

Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та фабричних емісій, де міститься велика кількість інших речовин. До того ж, практично невисвітленим на сьогоднішній день лишилось питання впливу сажі на різні системи організму, бо основну увагу дослідники зосереджують на легенях та шкірі. Значна частина авторів, що заперечують канцерогенну чи будь-яку іншу патогенну дію сажі на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей [6]: оскільки сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з організму за допомогою мукоцільярного транспорту. Все більшу увагу промисловості, пов'язаної з наноматеріалами, привертають розробки алмазних наночастинок. Вони наділені унікальними характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною прозорістю, надзвичайною міцністю тощо [7]. Сучасні публікації все частіше описують різноманітні дивовижні властивості і шляхи їх застосування: в якості біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи іммобілізації білків [8 – 10]. Розуміння базових принципів і особливостей впливу цих структур на живі організми, оцінка можливих ризиків їх використання, є абсолютно необхідними для їх подальшого медичного і біологічного застосування. Тим не менш, наукових досліджень на цю тему в рази менше ніж тих, що описують все нові і нові потенційні сфери застосування алмазних наночастинок.

Отже, застосування вуглецевих наноматеріалів у медицині на сьогоднішній день залежить від співвідношення переваг, пов'язаних з їх залученням до процесу лікування та ризиків, спряжених з їх використанням.

Матеріали і методи. Для дослідження дії вуглецевих матеріалів різної дисперсності на живий організм в якості об'єктів впливу використовувались ембріони курей породи Хайлайн білий (бройлери) (В.П. Терещенко, патент України №49464). В експерименті було задіяно 154 яйця розділені на 5 груп: одну інтактну (53 яйця) та чотири експериментальні. Зародкам з експериментальних груп вводили активоване вугілля (20 яєць), алмазні наночастинок (34 яйця), технічне вугілля (27 яєць) та терморозширений графіт (20 яєць). Нерівномірний розподіл яєць між експериментальними групами обумовлений різною кількістю незапліднених яєць в кожній з них.

Досліджувані матеріали вводили в жовтковий мішок ембріона, оскільки саме з нього організм отримує всі поживні речовини. Таким чином введений матеріал може потрапляти до організму зародка напряму за рахунок проникнення через оболонки чи після проковтування жовтка через шлунково-кишковий тракт. Для забезпечення потрапляння матеріалу саме в жовтковий мішок і запобігання пошкодження як самого зародка, так і його провізорних органів, яйця на певний час розміщували горизонтально, щоб зародковий диск розмістився на поверхні жовтка, і під фіксованим кутом вводили голку на визначену довжину. Для підтримання замкнутості внутрішнього середовища яйця отвір від введення матеріалу запліплювали воском. Доза досліджуваних матеріалів складала 0,31 мг на одне яйце.

Розрахунок дозування було здійснено на основі разової підтримуючої дози активованого вугілля 1,0 г при вазі людини 70 кг у перерахунок на вагу жовтка яйця (22 г):

$$22 \times 1:70 \text{ 000} = 0,31 \text{ мг}$$

Оскільки вводити дані матеріали в організм в сухому вигляді неможливо, необхідно було підібрати розчинник. Зазвичай з данною метою використовують біосумісні рідини, тобто ті, що за своїми властивостями і хімічним складом наближені до рідин, котрі містяться в живих організмах. Ми зупинили свій вибір на Реополіглюкіні-Новофарм (Декстрані 40). Досліджувані матеріали було введено в об'ємі 0,2 мл декстрану на один жовток. Кількість рідини, що вводилася є допустимою для введення у експериментах з курячими зародками. Стерилізація матеріалу здійснювалась за t° 120 $^{\circ}$ C впродовж 60 хвилин. Всі групи яєць інкубувались в абсолютно однакових умовах – в одному побутовому інкубаторі моделі Термія-60 за однакових вологості і температури (37,5 – 38,5 $^{\circ}$ C). Введення матеріалу проводилось на 3 добу інкубації, що обумовлено строками розвитку кровоносної системи зародків. Забій проводили на 6, 14 і 20 добу інкубації. Дані щодо розмірів зародків з експе-

риментальних груп порівнювались із аналогічними показниками (із врахуванням строку інкубації) інтактної групи. Таким чином визначалась відповідність отриманих макропараметрів курячих ембріонів експериментальних груп стандартним показникам. При заборі оцінювався також стан судинної сітки оболонки жовткового мішка ембріонів, відмічались її розвиток, гіперемія чи запустіння судин. При порівнянні показників ембріогенезу зародків з інтактної та експериментальних груп для оцінки вірогідності відмінностей між групами використовували критерій Стюдента при $p \leq 0,05$. Проводилось порівняння розмірів зародків та стану судин їх жовткового мішка за сумою даних з трьох строків інкубації (шоста, чотирнадцята та двадцята доба).

Результати та їх обговорення. При огляді зародків з групи із введеним активованим вугіллям на ранніх стадіях розвитку (шоста доба інкубації) макроскопічно ніяких патологічних процесів чи змін у самих зародках чи їх оболонках не спостерігалось. Зародки за стадією розвитку відповідали стандартам своєї доби інкубації або трохи випереджали її. У ембріонів спостерігались такі характерні ознаки відповідного строку інкубації як переважання розмірів середнього мозкового пухиря, що

піднімався над поверхнею голови та поява зачатку дзьоба. Розвиток провізорних органів також відповідав нормі – у зародків уже був сформований амніон, була розвинена кровоносна мережа жовткового мішка, що проглядалась до найменших судин і не містила крововиливів. Середовище в амніотичній порожнині не мало помутніти чи інших патологічних ознак. Пізніше, на середніх строках інкубації, можна було спостерігати подальші прояви розвитку ембріонів, такі як поява малюнку на шкірі і кігтів. Більшість ембріонів, що досягли 20 доби інкубації, мали крупні розміри і не мали проявів патологій.

При статистичному дослідженні макроскопічних показників розвитку ембріонів з групи із введеним активованим вугіллям, жоден з них достовірно не відрізнявся від показників інтактної групи. У інтактній групі кількість нормальних за розмірами зародків переважала всі інші варіанти, що цілком логічно, оскільки ні стимулюючого, ні сповільнюючого ріст впливів на неї не здійснювалось. Для групи з активованим вугіллям кількість крупних та стандартних для своєї доби інкубації зародків була однаковою (35%), а маленьких ембріонів було значно менше, що свідчить на користь позитивного впливу активованого вугілля на перебіг процесів ембріогенезу (рис. 1).

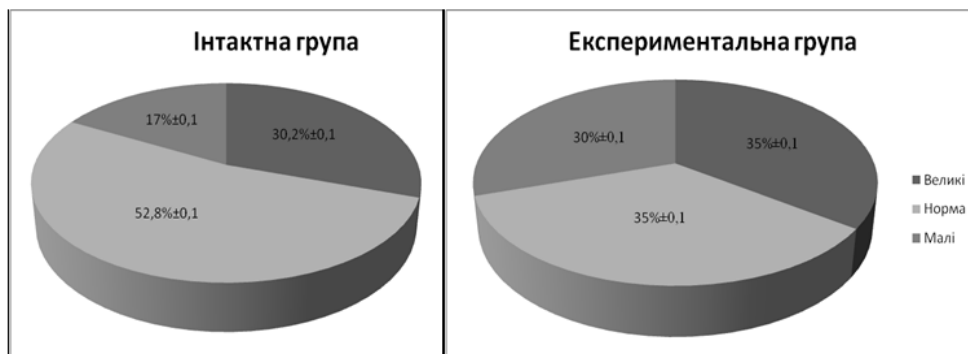


Рис. 1. Порівняльна характеристика стану зародків інтактної групи та експериментальної з введеним активованим вугіллям

Імовірно, вугілля, що тривалий час перебувало у замкнутий системі зародка в яйці, сорбувало на себе продукти обміну, утворення яких супроводжує процес ембріогенезу. Це сприяло активнішому перебігу обмінних і ростових процесів ембріона.

Лише незначна частка зародків з інтактної групи мала патологію кровоносних судин у оболонці (17% зародків з патологічно зміненими судинами). Відсоток патології при введенні активованого вугілля був дещо вищим (40%), проте достовірно не відрізнявся від інтактної групи. Дану тенденцію можна скоріше зв'язати з зовнішнім втручанням, ніж із безпосередньою руйнуючою дією активованого вугілля на судини.

При огляді зародків з групи із введеним технічним вугіллям затримок у розвитку виявлено не було. За розмірами та макроскопічними ознаками ембріони відповідали своїй стадії розвитку. Проте з ранніх стадій у даній групі спостерігались порушення стану судин оболонки ЖМ: запустіння та гіперемія. Це свідчить на користь негативного впливу технічного вугілля на судинну систему, адже саме судини стінки жовткового мішка першими стикаються із сажою, введеною в ньо-

го. Про відхилення у розвитку судин, спричинені введенням сажі, свідчать також дані щодо пізніших стадій інкубації. На 14 добу в судинах зародків спостерігалась гіперемія. Самим зародкам була притаманна затримка у розвитку: вони були меншими за норму. На пізніх стадіях інкубації частина зародків відставала у розвитку – спостерігалось не втягнення жовткового мішка у черевну порожнину, менші від норми розміри ембріонів. Дані статистичної обробки макроскопічних показників групи, якій вводили сажу, показали, що крупних розмірів досягли лише 11,1% зародків – достовірно менше, ніж у групі контролю (30,2%). Кількість ембріонів стандартних розмірів співрозмірна з інтактною групою (55,6% та 52,8% відповідно), маленьких дещо більше, ніж серед контролю (33,3% та 17% відповідно). Дані показники вказують на те, що сажу суттєво не впливає на темпи розвитку зародків.

Достовірна різниця між кількістю зародків із порушеною судинною оболонкою у групі із сажою та інтактній групі вказує на негативний вплив сажі на судини в цілому (рис. 2).

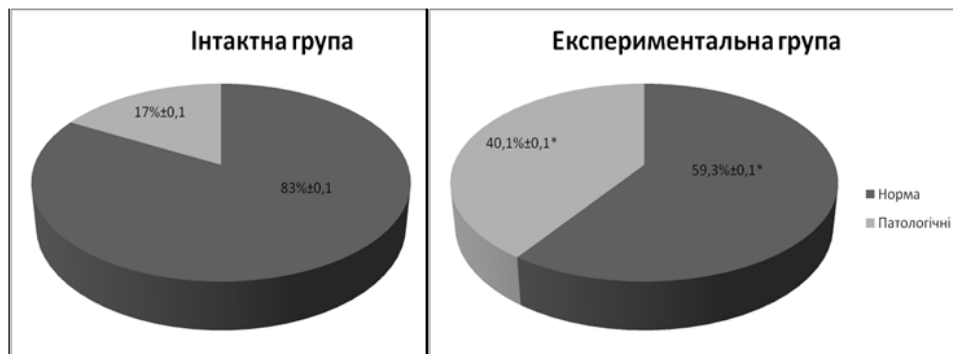


Рис. 2. Порівняльна характеристика стану судин оболонки зародків інтактної групи та експериментальної з введенням технічним вугіллям (* $p \leq 0,05$)

При огляді зародків з експериментальної групи із введеними алмазними наночасточками на ранніх стадіях ембріогенезу відсутнього впливу алмазних наночасточок на його перебіг не спостерігалось. Зародки мали ознаки і розміри, притаманні відповідним стадіям інкубації при нормальному ембріогенезі, судинна сітка жовткового мішка та провізорні органи загалом були не порушеними. На 14 добу у зародків спостерігались порушення в провізорних органах – амніон значно перевищував за розміром норму, в амніотичній порожнині накопичилось багато рідини. У судинах стінки жовткового мішка спостерігалось запустіння, що свідчить про порушення всмоктування і постачання поживних речовин жовтка до зародка. На користь цього свідчить і те, що дана група достовірно

відрізняється від інтактної за кількістю маленьких зародків. На 20 добу інкубації зміни у провізорних органах стали ще більш вираженими. Спостерігалась потовщення амніотичної оболонки, у судинах стінки жовткового мішка спостерігались запустіння і згортання крові. За даними статистичної обробки макроскопічних показників у групі із введеними алмазними наночасточками значно зросла частка дрібних зародків, що свідчить на користь негативного ефекту наноалмазів на темпи росту і розвитку курячого зародка (рис.3). На те саме вказує і наявність достовірної різниці показників ушкодження судин між контролем та експериментальною групою (17% проти 38,2% зародків зі зміненими судинами відповідно).

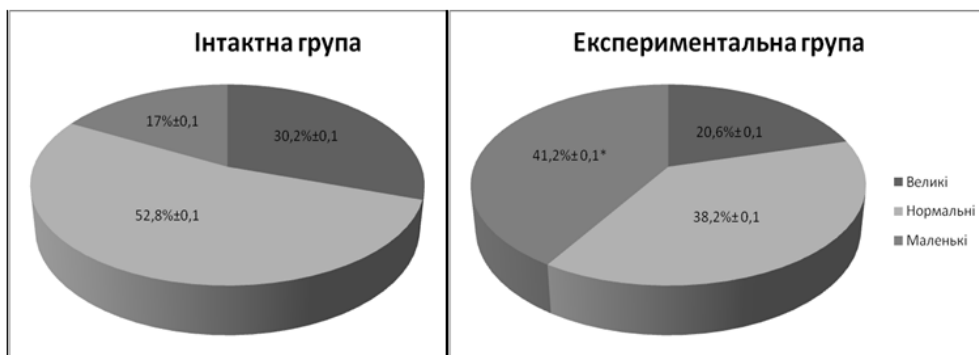


Рис. 3. Порівняльна характеристика стану зародків інтактної групи та експериментальної з введеними алмазними наночасточками (* $p \leq 0,05$)

Загалом для даної експериментальної групи характерне поступове погіршення стану зародків із проявами патології в провізорних органах та самому організмі ембріонів. Можна говорити про поступовий вплив алмазних наночасточок на розвиток зародків, що проявився у зменшенні їх розмірів та порушеннях роботи органів. Найяскравіше було виражено зміни у експериментальній групі із введеним терморозширеним графітом. Загалом цей матеріал мав різко негативний вплив на розміри зародків, а також стимулював ушкодження судин стінки жовткового мішка. Більшість зародків були дрібними, судини жовткового мішка у них мали ознаки патології. Очевидно, що негативний вплив терморозши-

реного графіту почав проявлятися ще з моменту введення, адже при заборі матеріалу на 6 добу, через три доби після введення, було виявлено мертві і вже частково лізовані зародки, запустілу судинну оболонку жовткового мішка. Наявність достовірної різниці як щодо розмірів зародків (крупних зародків не було взагалі, частка середніх склала 10%, а маленьких 90%), так і щодо стану судин стінки жовткового мішка є підтвердженням значного негативного впливу терморозширеного графіту на ембріогенез. Даний вплив почав проявлятися ще з моменту введення даного досліджуваного матеріалу (рис. 4).

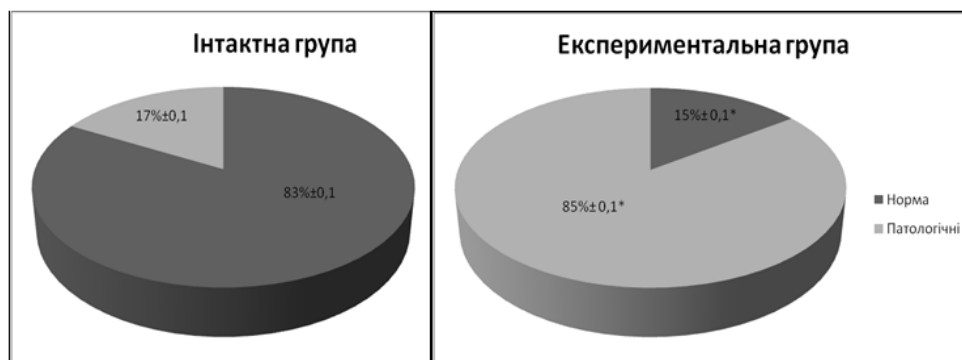


Рис. 4. Порівняльна характеристика стану судин оболонки зародків інтактної групи та експериментальної з введенням терморозширеним графітом (* $p \leq 0,05$)

Не зважаючи на погіршення стану зародків експериментальних груп у зв'язку із порушенням цілісності яйця при введенні матеріалів, за сумою усіх показників очевидно є негативна роль технічного вугілля та алмазних наночастинок, що уповільнювали ембріогенез, спричинювали порушення в судинах жовткового мішка та органах зародків. Найбільш шкідливим фактором для ембріогенезу виявився терморозширений графіт.

Висновки. За даними макроскопічної оцінки стану курячих ембріонів з інтактної та експериментальних груп було показано достовірні відмінності показників ембріогенезу у зародків, що зазнали впливу технічного вугілля, алмазних наночастинок та терморозширеного графіту. Для групи з активованим вугіллям кількість маленьких ембріонів була значно меншою, ніж у інтактній групі, що свідчить на користь тенденції до позитивного впливу активованого вугілля на перебіг процесів ембріогенезу. Достовірна різниця між кількістю зародків із порушеною судинною оболонкою у групі із сажою та інтактній групі вказує на негативний вплив сажі на судини. Вплив алмазних наночастинок на ембріогенез характеризується достовірним зменшенням розмірів зародків та погіршенням стану їх судин. Найтяжчими були наслідки введення ембріонам терморозширеного графіту – спостерігалась гостра і швидка реакція як щодо стану зародків, так і щодо стану їх судин.

Список використаних джерел

1. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region / K. Donaldson, P. J. Borm, G. Oberdorster, K. E. Pinkerton, V. Stone, C. L. Tran // *Inhal Toxicol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 53–62.
2. Schrand A. M. Are diamond nanoparticles cytotoxic? / A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111, N.1. – P. 2–7.
3. Bakowicz-Mitura K. Influence of diamond powder particles on human gene expression / K. Bakowicz-Mitura, G. Bartosz, S. Mitura // *Surf. Coat. Technol.* – 2007. – Vol. 201. – P. 6131–6135.
4. Detection of Single Photoluminescent Diamond Nanoparticles in Cells and Study of the Internalization Pathway // Orestis Faklaris, Damien Garrot, Vandana Joshi et al. // *Small.* – 2008. – Vol. 4, N.12. – P. 2236–2239.
5. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation / X. Zhang, J. Yin, C. Kang et al. // *Toxicol. Lett.* – 2010. – Vol. 198, N. 2. – P. 237–243.
6. Robertson J. A Case-control Study of Circulatory, Malignant and Respiratory Morbidity in Carbon Black Workers in the USA / J. Robertson, T. Ingalls // *American Industrial Hygiene Association Journal.* – 1989. – Vol. 50, N. 10. – P. 510–515.
7. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Yuan Yuan, Xiang Wang, Guang Jia et al. // *Diamond and Related Materials.* – 2010. – Vol. 19, N.4. – P. 291–299.
8. Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling / J. I. Chao, E. Perevedentseva, P. H. Chung et al. // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 93. – P. 2199.
9. Comparison of photoluminescence properties of semiconductor quantum dots and non-blinking diamond nanoparticles and observation of the diffusion of diamond nanoparticles in cells / O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi et al. // *Journal of the European Optical Society.* – 2009. – Vol. 4. – P. 2236.
10. In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans* / Nitin Mohan, Chao-Sheng Chen, Hsiao-Han Hsieh et al. // *Nano Lett.* – 2010. – Vol. 10, N. 9. – P. 3692–3699.

Надійшла до редколегії 24.11.14

В. Лавриненко, старш. лаб., Ю. Чайковський, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ РАЗНОЙ ДИСПЕРСНОСТИ НА МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭМБРИОГЕНЕЗА КУРИЦЫ

Исследовали влияние углеродных материалов разной дисперсности на куриные зародыши, полученные при инкубировании яиц линии Хай-Лайн белый. Раствор активированного угля, алмазных наночастинок, технического угля и терморасширенного графита на биосовместимом декстрате вводили в желточный мешок зародышей на 3 сутки инкубации и проводили оценку размеров эмбрионов и состояния стенок их желточного мешка на 6, 14 и 20 сутки инкубации. При тех же условиях с экспериментальными группами инкубировали яйца из интактной группы, которые не подвергались никаким посторонним влияниям. Было показано негативное влияние технического угля на состояние стенок желточного мешка зародышей, алмазных наночастинок и технического угля на оба макроскопических показателя эмбриогенеза курицы.

Ключевые слова: эмбриогенез курицы, активированный уголь, сажа, алмазные наночастицы, терморасширенный графит, сосуды стенок желточного мешка.

V. Lavrinenko, lab., Yu. Chaykovskiy, DSc
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine

EFFECTS OF CARBONIC MATERIALS OF VARIOUS SIZES ON MACROSCOPIC INDICES OF CHICKEN EMBRYOGENESIS

The influence of carbon materials of various sizes on chicken embryos, obtained from the incubation of eggs from the breed High line white was researched. Solution of activated charcoal, nanodiamonds, soot and thermo-activated graphite on biocompatible dextran was injected into the embryos' yolk sack on the third day of incubation and evaluation of their size and condition of the yolk sack wall vessels was held on the sixth, fourteenth and twentieth days of incubation. The eggs from the intact group were incubated within the same conditions but weren't influenced by any external factors. The negative effect of the soot on condition of the yolk sack wall vessels and of the nanodiamonds and thermo-activated graphite on the both indexes of chicken embryogenesis were shown.

Key words: chicken embryogenesis, activated charcoal, soot, nanodiamonds, thermo-activated graphite, yolk sack wall vessels.

УДК 587.871.1:8.04.615.28

Л. Степура, канд. техн. наук, О. Радченко, канд. біол. наук, П. Зелена, зав. учеб. лаб.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ТА ЦИТО-МОРФОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДРІЖДЖІВ РОДІВ *CANDIDA* І *SACCHAROMYCES*

Порівняно фізіолого-біохімічні та цито-морфологічні властивості вихідних штамів *Candida albicans* ATCC 10331, *Saccharomyces* sp. КНУ 1 та їх варіантів, які культивували на середовищі Сабуро з аніонною поверхнево-активною речовиною (ПАР) додецилсульфатом натрію (ДСН). Показано, що контакт з ДСН супроводжувався зникненням у дріжджів здатності до асиміляції ряду субстратів але не впливає на чутливість до антибіотиків. Після першого пасажу змінювалась морфологія клітин, зменшувалась кількість волютину, з'являлись жирові включення. Після четвертого пасажу цито-морфологічні особливості клітин частково відновлювались.

Ключові слова: додецилсульфат натрію, біологічні властивості, дріжджі.

Вступ. Індустріальна революція призвела до забруднення біосфери широким спектром ксенобіотиків. Контакт живих організмів з цими речовинами може супроводжуватися зміною їх біологічних властивостей, формуванням резистентності, а часом і появою здатності використовувати ксенобіотики як джерела харчування [3,12]. Дріжджі є зручною моделлю для дослідження антропогенного впливу на еукаріотичні організми. Для них характерна мінливість та широкі адаптаційні властивості, які забезпечуються багатьма генетичними і регуляторними механізмами [6]. Показано, що за впливу бензо- α -пірену і 7,12-диметилбензо- α -антрацену змінювалась швидкість поглинання *Saccharomyces cerevisiae* низки амінокислот [11]. Під дією *L*-нафтилацетату спостерігали збільшення активності естерази у *Symbiotaphrina kochii* [13]. Вплив тритону X-100 призводив до суттєвого підвищення утворення цитринової кислоти культурою *Yarrowia lipolytica* і до змін морфології клітин [10]. В присутності дибутілфтолату спостерігали зміни швидкості росту дріжджів родів *Candida* і *Saccharomyces*, а товщини клітинної стінки [7]. Зафіксовано появу нового зовнішнього полісахаридного шару навколо клітин *Candida utilis* та *Saccharomyces cerevisiae* після опромінення радіочастотним електромагнітним випроміненням, який забезпечував стійкість дріжджів до дії рН, температури, антибіотиків [1].

Додецилсульфат натрію – аніонна поверхнево-активна речовина (ПАР), яка широко розповсюджена в товарах побутової хімії (зубних пастах, шампунях, гелях для душів, піні для ванн) і, в силу свого призначення, практично у повному обсязі надходить у довілля [9]. Раніше нами було показано, що короткотривале культивування деяких бактерій на середовищі з ДСН в концентрації, що наближається до мінімальної інгібувальної, супроводжується зміною їх морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей. Так бактерії роду *Corynebacterium*, які культивувались впродовж 10 пасажів на середовищі, яке містило ДСН в концентрації 50 мг/л, змінювали морфологію клітин, забарвлення за Грамом, чутливість до антибіотиків, інтенсивність секреції лізину, антигенні властивості та склад поверхневих білків [3]. Культивування впродовж 4 пасажів бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 на середовищі з 50 мг/л ДСН призводило до зміни здатності бактерій позитивно забарвлюватися за Грамом, появою уреазі, зникненням бета-галактозидази, вдвічі зменшенням чутливості до антибіотиків левофлоксацину і лінезоліду [5]. Оскільки дріжджі є представниками мікробіоти людини, а також активно використо-

вуються в промисловості, актуальним залишається вивчення впливу ДСН на еукаріотичні клітини у концентрації, що зумовлює зміни у прокаріотичних клітин. Зміни біологічних властивостей мікроорганізмів можуть створювати проблеми для їх ідентифікації.

Метою даної роботи було порівняти фізіолого-біохімічні та цито-морфологічні властивості штамів *Candida albicans* ATCC10331 і *Saccharomyces* sp. КНУ 1 до та після нетривалого контакту з додецилсульфатом натрію.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктами дослідження були штами *Candida albicans* ATCC 10331, *Saccharomyces* sp.КНУ1 з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології та загальної імунології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Їх культивували за температури 28°C, впродовж 1, 2 та 4 пасажів на щільному середовищі Сабуро (рН 5,6) з додецилсульфатом натрію (ДСН) в концентрації 50 мг/л. Час культивування кожного пасажу становив 48 годин. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів і їх варіантів визначали за допомогою мікробіологічного аналізатора Vitek 2 Compact (Biomerieux, Франція) [8]. Суспензії 48-годинних культур у 3 мл фізіологічного розчину готували в умовах ламінарного боксу за 5-10 хв. до початку аналізу. Щільність суспензій за стандартом Мак Фарланда доводили до 2 McF (2×10^7 КУО/мл) за допомогою денситометра Densi-La-Meter (Erba-Lachema). У роботі використовували YST-картки. Для антибіотикограми готували іншу суспензію: 280 мкл першої суспензії вносили у 3 мл фізіологічного розчину. Для визначення чутливості до антибіотиків (флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину-В) використовували AST-картки. Морфологію клітин та гранули волютину визначали на фіксованих препаратах, пофарбованих метиленовим синім, жирові включення – суданом червоним [2] в десяти полях зору. Розміри клітин визначали за допомогою окуляр та об'єкт мікрометра. Препарати мікроскопіювали на мікроскопі Zeiss Primo Star. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Ст'юдента на рівні значимості не менше 95%. Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "Statistica 12".

Результати та їх обговорення. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів та їх варіантів що культивувалися на середовищі з ДСН, наведено у табл.1.

Таблиця 1. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів *Candida albicans* ATCC 10331 і *Saccharomyces sp.* КНУ 1 та їх варіантів, отриманих після чотирьох пересівів на середовищі Сабуро з додецилсульфатом натрію в концентрації 50 мг/л

№ за/п	Властивості	<i>Candida albicans</i> ATCC 10331		<i>Saccharomyces sp.</i> КНУ 1	
		Вихідний штам	Після культивування на середовищі Сабуро з ДСН	Вихідний штам	Після культивування на середовищі Сабуро з ДСН
	Асиміляція				
1	L-малату	-	-	+	+
2	Еритритолу	-	-	-	-
3	Гліцерину	-	-	+	-
4	Арбутину	-	-	+	+
5	Амігдаліну	-	-	+	-
6	D-галактози	+	+	+	-
7	Гентібіози	-	-	+	-
8	D-глюкози	+	+	+	+
9	Лактози	-	-	+	-
10	Метил- α -D-глюкопіранозиду	+	+	+	+
11	D-целобіози	-	-	+	-
12	D-мальтози	+	+	+	+
13	D-рафінози	-	-	+	+
14	D-манози	+	+	+	+
15	D- мелібіози	-	-	+	-
16	D- мелезітози	+	+	-	+
17	L-сорбози	+	-	+	-
18	L-рамнози	-	-	+	-
19	Ксиліту	+	+	+	+
20	D-сорбіту	+	+	+	-
21	Сахарози	+	+	+	+
22	D-туранози	+	+	+	+
23	D-трегалози	+	+	+	+
24	L-арабінози	-	-	+	-
25	D-галактуронату	+	+	-	-
26	L-глютамату	+	+	+	-
27	D- ксилози	+	+	+	-
28	DL-лактату	-	-	-	-
29	Ацетату	+	+	+	+
30	Цитрату	+	+	+	-
31	Глюкуронату	+	(-)	+	+
32	L- проліну	+	+	-	-
33	2-кет-D-глюконату	+	+	-	-
34	N-ацетилглюкозаміну	+	(-)	-	-
35	D-глюконату	+	+	-	-
	Синтез ферментів				
36	Гамма-глютаміл- трансферази	-	-	+	-
37	Тирозин-аріламідази	-	-	-	-
38	Лейцин- аріламідази	+	+	+	+
39	Бета-N-ацетил-глюкозамідази	-	-	-	-
40	PNP-N-ацетил-BD-галактозамідази 1	-	-	-	-
41	L-лізин-аріламідази	-	-	-	-
42	Уреази	-	-	-	-
43	Альфа-глюкозидази	+	+	-	-
44	Гідроліз ескуліну	-	-	+	-
45	Розщеплення аргініну	+	+	+	-
46	Редукція нітрату	-	-	-	-

Позначення: "+" – реакція позитивна; "-" – реакція негативна; "(-)" – реакція слабо негативна

Як видно з таблиці, вихідний штам *Candida albicans* ATCC 10331 під впливом ДСН зазнавав змін за трьома параметрами: втрачав здатність асимілювати L-сорбозу і знижував здатність асимілювати глюкуронат і N-ацетилглюкозамін. Впродовж чотирьох пасажів на середовище з ксенобіотиком ми спостерігали цитоморфологічні зміни дріжджів. Клітини вихідного штаму *Candida albicans* ATCC 10331 після культивування на Сабуро добре зафарбовувались метиленовим синім, були овальними, іноді утворювали псевдоміцелії. Во-

лютинові гранули спостерігали у 40% клітин. (рис 1, А). Після першого пасажу на Сабуро з ДСН виявлено зменшення довжини клітин з 8-10 мкм до 4-7 мкм. Вони погано профарбовувались барвником, кількість клітин з волютиновими гранулами зменшувалась вдвічі, натомість майже в кожній клітині з'являлись включення жиру (рис 1, Б). Однак, після чотирьох пересівів на середовище з ДСН *Candida albicans* ATCC 10331 майже повністю відновлював свої цито-морфологічні властивості і практично не відрізнявся від вихідного штаму (рис 1, В).

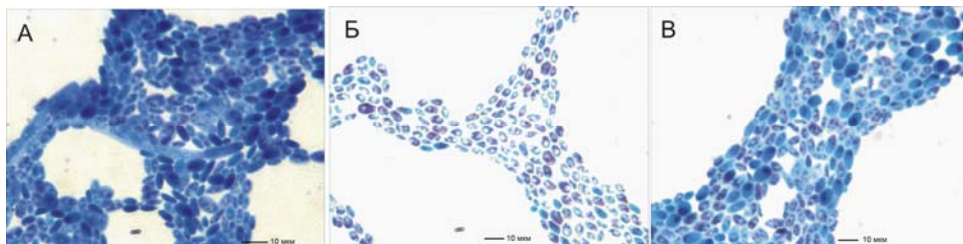


Рис.1. Морфологія клітин *Candida albicans* ATCC 10331 у препараті, забарвленому метиленовим синім:

А – вихідний штам; Б – варіант, що культивувався 1 пасаж на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л);

В – варіант, що культивувався 4 пасажі на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л).

На рисунку гранули волютину виглядають темними зонами в клітині, жирові включення – світлими

Saccharomyces sp. КНУ 1 після культивування на середовищі Сабуро з ДСН зазнав зміни 18 параметрів, при цьому 17 властивостей було втрачено і одна – набута. Ці дріжджі втратили здатність асимілювати гліцерин, амігдалін, *D*-галактозу, гентібіозу, лактозу, *D*-целобіозу, *D*-мелібіозу, *L*-сорбозу, *L*-рамнозу, *D*-сорбіт, *L*-арабінозу, *L*-глутамат, *D*-ксилозу, цитрат, позбулися ферменту гамма-глутаміл-трансферази, перестали розщеплювати аргінін і гідролізувати ескулін, проте почали асимілювати *D*-мелезітозу (табл.1).

Saccharomyces sp. КНУ 1 під впливом ДСН зазнавав і цито-морфологічних змін. Клітини вихідного штаму

після культивування на середовищі Сабуро були овальної форми, розмірами 4-5х8-10 мкм (рис.2, А). Включення волютину фіксували у 30% клітин. Після першого пасажу на середовищі з ДСН дріжджі ставали округлими, діаметром $5 \pm 0,2$ мкм, втрачали гранули волютину (рис.2,Б), дрібнозернисті жирові включення з'являлися практично в кожній клітині. Морфологія клітин *Saccharomyces* sp. КНУ 1 за чотири пасажі на середовищі з додаванням додецилсульфату натрію повністю не відновлювалась. Клітини мали розміри 4-5х 6-8 мкм і не містили включень жиру та волютину (рис.2, В).

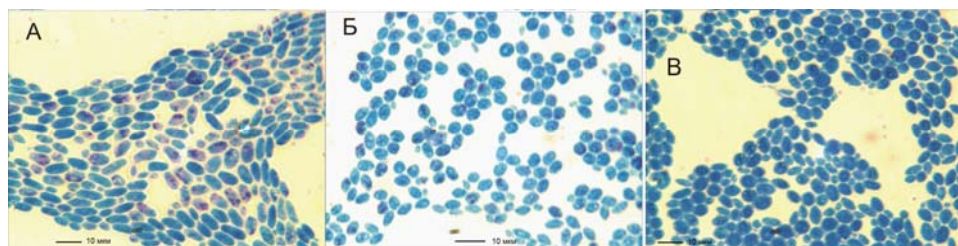


Рис.2. Морфологія клітин *Saccharomyces* sp. КНУ 1 у препараті, забарвленому метиленовим синім:

А – вихідний штам; Б – варіант, що культивувався 1 пасаж на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л);

В – варіант, що культивувався 4 пасажі на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л).

На рисунку гранули волютину виглядають темними зонами в клітині, жирові включення – світлими

Подібна тенденція до вкорочення довжини клітини при збереженні їх ширини спостерігалась нами раніше за впливу аналогічної концентрації ДСН на прокаріотичні клітини – бактерії *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 [4]. На знімках, отриманих за допомогою електронного мікроскопа фіксували в клітинах появу темних і прозорих включень після контакту з ДСН.

Зміна деяких біохімічних властивостей мікроорганізмів може супроводжуватись зміною чутливості до низки антибіотиків та формування резистентності до них [4]. Чутливість до антибіотиків штаму *Candida albicans* ATCC 10331 після нетривалого контакту клітин з 50 мг/л ДСН залишилась без змін. Як вихідний штам, так і його варіант були чутливими до флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину. Мінімальні інгібуючі концентрації флуцитозину і флюконазолу становили – 1, вориконазолу – 0,12, амфотерицину -0,5 мг/л.

Висновки. Таким чином, було показано, що короткотривале (впродовж 4 пасажів) культивування дріжджів *Candida albicans* ATCC 10331 і *Saccharomyces* sp. КНУ 1 на середовищі Сабуро з незначним вмістом (50 мг/л) аніонної поверхнево-активної речовини додецилсульфату натрію призводить до зміни деяких фізіолого-біохімічних властивостей. *Candida albicans* ATCC 10331 втрачав здатність асимілювати *L*-сорбозу, і знижував здатність асимілювати глюкуронат і *N*-ацетилглюкозамін. *Saccharomyces* sp. КНУ 1 зазнав зміни 18 параметрів: 17 з них пов'язані з втратою здатності

асимілювати 14 субстратів, синтезувати гамма-глутаміл-трансферазу, розщеплювати аргінін, гідролізувати ескулін; 1 – з набуттям властивості асимілювати *D*-мелезітозу. Такі суттєві зміни фізіолого-біохімічних властивостей свідчать про негативний вплив ДСН на дріжджові клітини і можуть створювати проблеми при ідентифікації як клінічно важливих так і промислових штамів дріжджів. На середовищі з ДСН, вже після першого пасажу, клітини *Candida albicans* ATCC 10331 та *Saccharomyces* sp. КНУ 1 накопичували жирові гранули, волютин був практично відсутнім. Дріжджі різко змінювали цито-морфологічні властивості на перших двох пасажах і відновлювали їх повністю (*Candida albicans* ATCC 10331) або частково після четвертого пасажу (*Saccharomyces* sp. КНУ 1), що може свідчити про поступову адаптацію культур до аніонної ПАР. Під впливом ДСН чутливість *Candida albicans* ATCC 10331 до антибіотиків (флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину) не змінилася.

Список використаних джерел

1. Войчук С. И. Влияние радиочастотного электромагнитного излучения на физиологические особенности *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 / С. И. Войчук, В. С. Подгорский, Е. Н. Громозова // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 51–57.
2. Особенности строения волютиновых гранул в клетках низших полифосфатаккумулирующих эукариот / Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, Т. Л. Качур В. Ф. Горчев, С. А. Карахим // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 55–61.

3. Вплив синтетичних поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості непатогенних видів роду *Corynebacterium* / Л. О. Михальський, І. М. Фуртат, О. С. Радченко, Л. Г. Степура // Мікробіол. журн. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 52–61.

4. Зміна деяких біологічних властивостей *Stenotrophomonas maltophilia* під впливом додецилсульфату натрію / О. Радченко, Л. Степура, Ю. Юміна, М. Борецька, П. Зелена // Мікробіологія і біотехнологія = Microbiology & Biotechnology. – 2014. – N 1. – С. 53–62.

5. Вплив поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості *Corynebacterium glutamicum* / І. М. Фуртат, Т. М. Ногіна, Л. О. Михальський та ін. // Національний університет "Києво-Могилянська Академія". Наукові записки. – 2002. – 20 (2). – С. 435–438.

6. G. D. Brown, M. G. Netea et al. Immunology and Fungal Infections – Springer. – 2007. Chapter 16. – P. 361–382.

7. Dibutylphthalate and Tween 80 alter ultrastructure in *Candida albicans*: implications for peroxisome proliferation / J. Blaize, W. J. L'Amoreaux, M. Downey et al. // Can. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 55, N 4. – P. 437–449.

8. David H., Pincus D.H. Microbial Identification Using the bioMérieux VITEK® 2 System in M.J. Miller Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, 2006. – Vol. 2.

9. Hrenovic J. Toxicity of anionic and cationic surfactants to *Acinetobacter junii* in pure culture / J. Hrenovic, T. Ivankovic // Central European Journal of Biology. – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 405–414.

10. Enhanced Production of Citric Acid in *Yarrowia lipolytica* by Triton X-100 / M. Mirbagheri, I. Nahvi, G. Emtiazi et al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – Jul. 20.

11. Tanudjojo Nurhajati. Uptake rate measurement of some amino acids on normal and treated yeast cells to xenobiotics using ¹⁴C labelled amino acid / Nurhajati Tanudjojo, Pringgo Soedigdo, Soekeni Soedigdo // Food and nutrition bulletin. – 2002. – Vol. 23, N 3. – P. 61–65.

12. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects / R. J. Russell, C. Scott, C. J. Jackson et al. // Evolutionary Applications. – 2011. – Vol. 4, N 2. – P. 225–248.

13. Shen S. K. Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast-like symbiont from the cigarette beetle / S. K. Shen, P. F. Dowd // Entomol. exp. appl. – 1989. – Vol. 52. – P. 179–184.

Надійшла до редколегії 24.11.14

Л. Степура, канд. техн. наук, О. Радченко, канд. биол. наук, П. Зелена, зав. учеб. лаб.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЦИТО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ РОДА *CANDIDA* И *SACCHAROMYCES*

Сравнены физиолого-биохимические и цито-морфологические свойства исходных штаммов *Candida albicans* ATCC 10331, *Saccharomyces* sp. KHY 1 и их вариантов, которые культивировали на среде Сабуро с анионным поверхностно-активным веществом (ПАВ) додецилсульфатом натрия (ДСН). Показано, что контакт с ДСН сопровождался исчезновением у дрожжей способности к ассимиляции ряда субстратов, но не влиял на чувствительность к антибиотикам. После первого пассажа изменялась морфология клеток, уменьшалось количество волютина, появлялись жировые включения. После четвертого пассажа цито-морфологические особенности клеток частично восстанавливались.

Ключевые слова: додецилсульфат натрия, биологические свойства, дрожжи.

L. Stepura, PhD., O. Radchenko, PhD., P. Zelena, chief of science lab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECTS OF SODIUM DODECYLSULFATE ON PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND CYTOMORPHOLOGICAL PROPERTIES OF *CANDIDA* AND *SACCHAROMYCES* GENERA

Physiological, biochemical, cyto-morphological properties of initial strain *Candida albicans* ATCC 10331, *Saccharomyces* sp. KHY 1 and their variants, which were cultivated in medium Saburo with anionic surfactant (SAS) sodium dodecyl sulfate (SDS) have been compared. It was shown that the effect of SDS was accompanied by disappearance of possibility to assimilate a number of substrates, but did not affect antibiotics sensitivity. They changed its morphology after 1 passage, diminution quantity of volutin, appearance of fat inclusion. Morphology of cells partially restored after 4-th passage.

Key words: sodium dodecyl sulfate, biological properties, yeasts.

UDK 577.121.9

A. Yurchenko, student, V. Konopelniuk, PhD., E. Torgalo, PhD., O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF DIFFERENT ORAL DOSES OF GLUCOSE ON THE BLOOD SERUM CONTENT OF SEROTONIN IN RATS

The analysis of the effect of different doses of oral glucose content of serotonin in blood serum of rats. The increasing content of serotonin in blood serum of rats with diabetes and with the administration of glucose. The increase in the studied parameters in the serum of the control group of animals under conditions of a glucose. It is concluded that glucose has a direct positive effect on the endogenous flow of serotonin into the bloodstream.

Key words: glucose, serotonin, rat.

Introduction. Ukraine has a population of about 45.7 million and the official data state that the prevalence of diabetes in Ukraine is 2.5% (1,133,922 people are registered with diagnosed diabetes). The Diabetes Atlas indicates for Ukraine an estimated prevalence of 9.6% [for the population between 20 to 79 years old] which is in great discrepancy with the figures registered by the health system (2.5%) but is closer to the results of local studies (8.7%).

Diabetes begins with a loss of insulin sensitivity in white adipose tissue and skeletal muscle. Initially, the body compensates for the decrease in insulin-mediated signaling by enlarging the beta cells (found in the Islets of Langerhans in the pancreas), resulting in increased insulin release to maintain euglycemia (2). Eventually, however, the beta cells begin to fail, leading to a loss of insulin production. The lack of insulin results in elevated plasma glucose concentrations, which if sustained, leads to

damage of the microvasculature of various internal organs (e.g., kidneys and eyes) and the peripheral aspects of the limbs, including the feet.

Current therapies for diabetes include agents that enhance insulin sensitivity, elevators of insulin release and inhibitors of carbohydrate absorption (3). More recently characterized agents mimic the role (and enhance the activity) of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Box 1). Such mimetics include the dipeptidylpeptidase inhibitor sitagliptin, which prolongs the half-life of endogenous GLP-1, and the non-hydrolyzable GLP-1 analog exendin-4. GLP-1 is released in a glucose-dependent manner from the L cells of the gut, enters the circulation, evokes GLP-1 receptor-mediated release of insulin from beta cells, inhibits glucagon release, and reduces gastric motility (4).

A tryptophan derivative, neurotransmitter and tissue hormone serotonin is a biologically active substance, characterized by a wide range of effects on the body [1-3]. Central nervous system saves about 2% of the body's serotonin. Serotonin affects food intake, sleep, anxiety, sexual behavior, mood, involved in the formation of pain and also plays an important role in the regulation of emotional behavior [4-9]. On the other side, in the peripheral system where about 98% of the body's serotonin is synthesized and stored, serotonin acts as a peripheral hormone affecting vasoconstriction, intestinal motility, primary hemostasis and is involved in the regulation of vasoconstriction [10-15].

Serotonin (5-HT)-mediated neural networks—and the 5-HT_{2C} receptor (5-HT_{2CR}) in particular—have long been implicated in the control of food intake and energy homeostasis. Evidence for this comes from both pharmacological and genetic experiments. Fenfluramine, a stimulator of serotonin release and an inhibitor of serotonin reuptake, was marketed as a weight loss agent from 1973 until 1997 (5), when it and its more potent enantiomer dexfenfluramine were removed from the market because of their cardiac side effects, which were likely due to activity at the 5-HT_{2BR} (6). These weight loss effects are 5-HT_{2CR}-mediated, as is demonstrated by the reduction in efficacy of m-chlorophenylpiperazine (mCPP) and fenfluramine when administered to 5-HT_{2C} knockout (KO) mice (7, 8). Thus, highly selective 5-HT_{2C} receptor agonists have been extensively studied over the last decade as a drug development target for obesity and more recently as a possible treatment for schizophrenia. Two compounds, lorcaserin and vabicaserin, developed for the treatment of obesity and schizophrenia, respectively, have entered late-stage trials and might reach the marketplace in the next two to five years. New research by Zhou et al. implies that these and other 5-HT_{2CR} agonists may have utility in the treatment of type II diabetes (9). If true, these findings would indicate that a distinctly neuronal mechanism may be an effective treatment option for regulating plasma glucose concentrations.

The first step in the synthesis of serotonin from tryptophan is an enzyme tryptophan hydroxylase (TRH), which is also an enzyme that limits the rate of biosynthesis. TRH is known to have two isoforms that are identical by about 70%. They are called TrH1 and TrH2 [16]. TrH1 mainly present in the pineal gland, thymus, spleen and enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract. TrH2 is only in nerve cells, such as brain stem nuclei seam. Mice lacking TrH1 practically did not contain serotonin in the blood and gastrointestinal tract while maintaining normal levels in the brain. Peripheral serotonin in mice deprived TrH1 cannot be substituted for the central nervous system serotonin synthesized TrH2 [17]. Moreover, as known from the literature, serotonin does not cross the blood-brain barrier. Serotonin wasn't found in the brains of animals treated with serotonin (50 mg/kg, intraperitoneally) [18, 19]. Thus, there are two serotonin systems: one in the central nervous system and one on the periphery, with independent functions and biosynthesis pathways.

Current published data show that the increase of the concentration of circulating serotonin lowers blood glucose levels by inducing insulin secretion in mice [20, 21]. In contrast, serotonin causes hyperglycemia by adrenaline

release from the adrenal glands of rats, which operates indirectly through 5HT_{1A}, 5HT_{2A} or 5HT₇ receptors [22-24]. In addition, serotonin enhances the absorption of glucose by the liver under conditions of hyperglycemia and hyperinsulinemia [25] and stimulates the synthesis of glycogen in nanomolar concentrations, but inhibits it at micromolar concentrations via serotonergic mechanisms in hepatocytes [26]. These results suggest that peripheral serotonin plays an important role in the metabolism of glucose. Thus, the aim of our work was to study the effect of different doses of oral glucose on the content of serotonin in serum of control rats.

Materials and methods. Experiments were carried out on the white nonlinear rats of both sexes in compliance with the standards of the Convention of Bioethics of the Council of Europe in 1997, European Convention for the protection of vertebrate animals that used for experimental and other scientific purposes, the general ethical principles of animal experiments approved by first National Congress of Bioethics of Ukraine (September 2001) and other international agreements and national legislation in this field.

Male Wistar rats aged 180 days and weighing 240–290 g were used (n = 90). They were maintained under controlled temperature conditions (22–24°C) and lighting (lights on from 05.00 to 19.00 h). All tests were conducted under the light cycle. Standard rat chow and water were freely available. The experimental diabetes mellitus type 2 is caused by disposable intraperitoneal introduction of streptozotocin solution to 1-2 diurnal neonatal rats at the rate of 80 mg per 1 kg of body weight (Hemmings, 2000). The control group included rats, which were injected intraperitoneally with 10 mM citrate buffer (pH 4.5) at the same age, which was used for breeding streptozotocin. To confirm the development of insulin resistance in experimental animals the sensitivity of peripheral tissues to insulin was determined through insulin-glucose test (Zhang, 2003) conducted with our own modifications. 180 days after the STZ injection, blood glucose level was measured by using a portable glucometer (Gluco-Plus Inc., Kiev, Ukraine) in the blood collected from tail vein. Animals with non-fasting blood glucose (NFBG) level >7 mmol/l were considered as diabetic.

Glucose in a dose of 2, 4 and 6 g/kg of body weight was administered per os. Control group of rats received an equal amount of 0.9% NaCl, which was used as a vehicle. 1 hour after the procedure serotonin was extracted from serum using ion-exchange chromatography and was determined by spectrophotometrical methods.

Statistical analysis was performed using statistical analysis applications of Microsoft® Excel. To assess inter-group differences the parametric Student test was used. The difference between the parameters was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion.

Whereas peripheral serotonergic system is involved mainly in the regulation cardiovascular and digestive systems, serotonin serves as a tissue hormone on the outskirts and involved in the regulation of blood glucose so it was advisable to establish the content of serotonin in blood serum of rats under conditions of experimental type 2 diabetes. The results show the increase of serotonin content in blood serum of diabetic animals in 3.2 times compared of the control group (Fig.1).

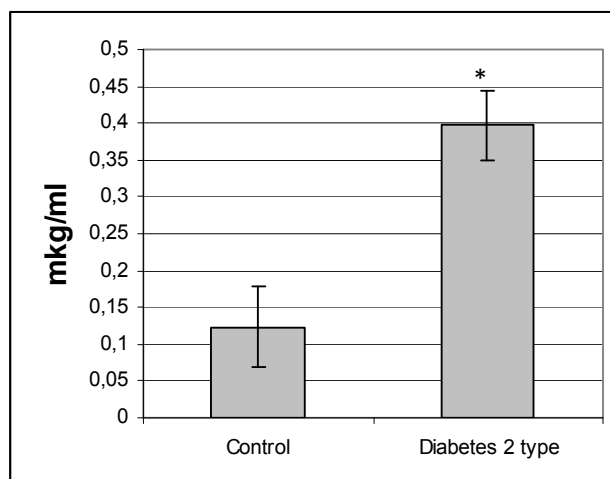


Fig. 1. Serotonin level in the blood of rats of the control and experimental group

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

It was shown morphological changes enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract in diabetic rats, particularly the occurrence of large serotonin-positive cells in areas of the mucosa, which was absent in animals of the control group. Also known that diabetic animals have an increase content of serotonin in the gastrointestinal tract. Shown to increase serotonin content in enterochromaffin cells duodenum in rats with diabetes caused by streptozotocin administration, improve the content shown, also shown abuse activity of type 3 serotonin receptor. So, the increase in content of peripheral serotonin may be due to hyperfunction of enterochromaffin cells in diabetic animals and/or malfunction of vascular-platelet hemostasis system level. The imbalance in the hemostatic system associated with platelet hyperfunction, determined by pathogenetic peculiarities of type 2 diabetes. Given that platelets are a place of storage and transportation of peripheral serotonin it may be the cause of its increase in serum.

These data correlate with the results which obtained in the study of the blood of patients with diabetes. Was found increased of serotonin content in blood plasma these patients, and this increase is associated with platelet hyperfunction. Serum serotonin content also increased in patients with diabetes. Also in patients with type 2 diabetes with high content in plasma 5-hydroxyindoleacetic acid concentration of this metabolite positively correlated with the release of albumin in the urine, so, it may indicate increased susceptibility to the development of diabetic neuropathy.

As can be seen from Table 1, observed an increase of serotonin content in blood serum of rats under conditions of glucose to control group and in group of animals with type 2 diabetes. Serotonin content increased in 2 times in control animals and in 1.2 times in animals with type 2 diabetes have been injected glucose (Tab.1).

Table 1. Serotonin content in control group and in group of animals with type 2 diabetes have been injected glucose

	Control	Control GI	DM 2	DM 2 GI
Serotonin	0,123±0,0554	0,249±0,0522*	0,397±0,0467*	0,461±0,0634*

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

Not only hyperinsulinemia is caused by serotonin, but hyperglycemia either, without any changes in the concentration of glycogen in the liver and skeletal muscle. It is believed that the reason for this is inhibition of tissues glucose capture from the blood. Researches of Hajduch E. et al. (1999) and Moor M. et al. (2004, 2005) were show that serotonin directly inhibits peripheral tissues glucose capture, including hepatocytes and skeletal muscle cells. However, in experiments Watanabe et al. (2011) showed that serotonin has no effect on glucose uptake neither in the liver nor in the skeletal muscles, while plasma insulin concentrations is increased after administration of serotonin. This indicates that hyperinsulinemia and hyperglycemia caused by serotonin have different independent mechanisms. These hypotheses are confirmed in experiments using antagonists to serotonin receptors: ketanserin (antagonist of 5-NT2A receptor), SB-269970 (antagonist of 5-NT7 receptor) and metyserhid (5-NT1 antagonist, 5-HT 2, 5-receptor NT7) – in all cases there was an increase of glucose in the blood plasma. This increase in insulin levels was observed only when metyserhid was

administered. Thus, it was shown that there are two different mechanisms of action of serotonin on glucose metabolism: one that directly affects the secretion of insulin by beta cells of the pancreas, and another that inhibits glucose uptake by cells of the liver and skeletal muscle.

Serotonin in plasma may be free or bound to the 14-3-3 protein. In addition, the capture of serotonin from plasma to platelets occurs quickly, by the mechanism of saturation that makes platelets a fundamental regulator of serotonin concentration in plasma. The capture of serotonin from plasma by platelets is dependent on the serotonin transporter (SERT) mechanism, the operation of which is usually regarded as a transporter reuptake of neurotransmitters in the central nervous system, but it is also present in the plasma membrane of platelets. It was shown that administration of serotonin affects SERT plasma membrane density. Recently, the analysis of the effect of extracellular serotonin at different concentrations (0-2.5nM) on SERT expression on the platelets cell surface was found that this phenomenon is biphasic. Specifically, the level of platelet membrane SERT and serotonin capture

in the initial stage increases in response to the increase of serotonin levels, but the initial response is accompanied by a second phase – a reduction in the SERT levels to the initial values because the concentration of serotonin continues to grow. SERT gene polymorphism is associated with depression and other mood disorders, autism, and anxiety which often occurs in patients with diabetes. Usually the intensity of serotonin by platelets is proportional to the number of transporters in the plasma membrane. However, it was found that the number of SERT in the plasma membrane is regulated by extracellular concentration of serotonin. Platelets of rats which were knockout by SERT gene contain virtually no serotonin. Homberg J. et al. (2009) observed in animals,

which were knockout by SERT gene (Sert – / -) an increase in plasma glucose and an increase in visceral fat in females. It is shown that the bond of SERT with vimentin, a cytoskeletal protein, increases in serotonin concentrations higher than physiological.

Data on how a glucose effect on serotonin content in blood serum of rats are scarce. Therefore, on the first phase of the experiment rats were injected with glucose per os at a doses of 2, 4 and 6 g/kg of body weight. The control group received the same volume of fluid (0,9% NaCl) which was used to dissolve the glucose. The introduction of glucose at a dose of 2 g/kg showed an increase in this indicator in 1.6 times, the introduction at a doses of 4 and 6 g / kg – 4.2 and 4.8 times, respectively (Fig. 2).

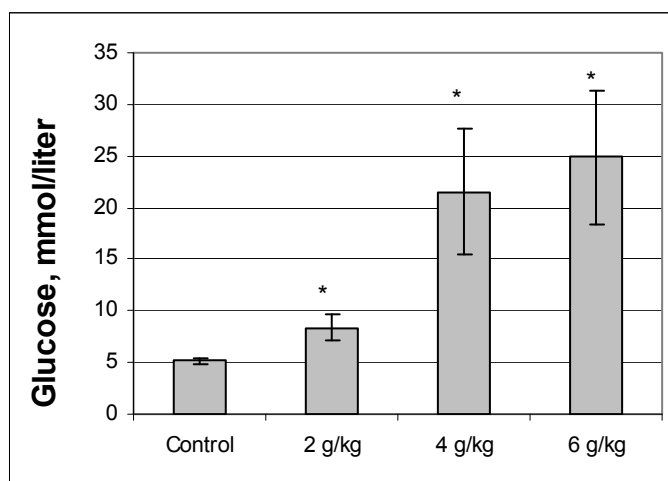


Fig. 2. Glucose level in the blood of rats of the control group after the oral administration of glucose at a dose of 2, 4 and 6 g/kg

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

Serotonin levels in the rat serum were determined in 1 hour after glucose administration at a dose of 2, 4 and 6 g/kg by body weight. During the research it was found that

after oral administration of glucose, the content of serotonin in the blood of experimental animals increased by 11.8, 0.5 and almost 4 times according to the dose (Fig. 3).

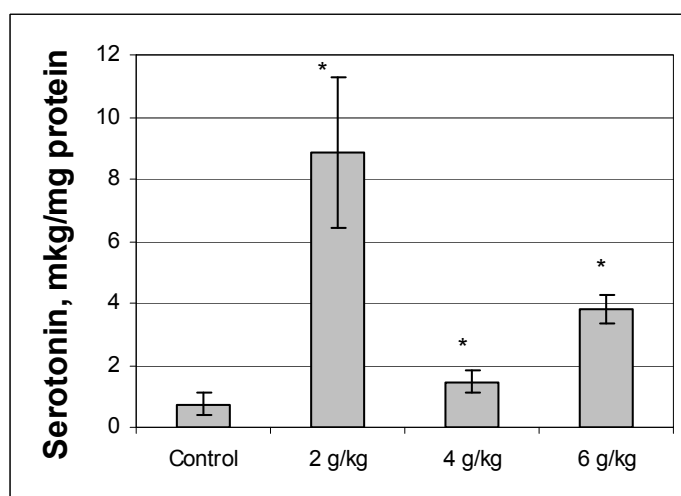


Fig. 3. Serotonin level in the blood of rats of the control group after the oral administration of glucose at a dose of 2, 4 and 6 g/kg

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

It has been reported that increasing circulating concentrations of 5-HT induces hyperglycemia through the release of adrenaline from the adrenal gland in rats via

action through the 5HTR1A, 2A or 7 [11]–[13]. Additionally, 5-HT stimulates glycogen synthesis at nanomolar concentrations but inhibits it at micromolar concentrations in

hepatocytes by serotonergic mechanisms [14], and 5-HT enhances net hepatic glucose uptake under hyperglycemic and hyperinsulinemic conditions [15]. On the other hand, we have previously reported that peripheral 5-HT decreases plasma lipid levels via action through several 5HTRs in mice [16]. These results suggest that peripheral serotonin plays an important role in glucose and lipid metabolism.

Thus, the highest content of serotonin was observed at the lowest concentration of administered glucose. The next

stage of our work was to study the glucose and serotonin levels 5 hours after oral administration of glucose at a dose of 2 g/kg. During the study it was found a gradual decrease in blood glucose levels in rats. The decrease in blood glucose at 3 hours was in 1.4 times and in 2 times at 5 hours after administration compared to the first hour. Thus at 5 hours after administration of glucose at a dose of 2 g/kg content of the studied parameters fell below the control value (Fig. 4).

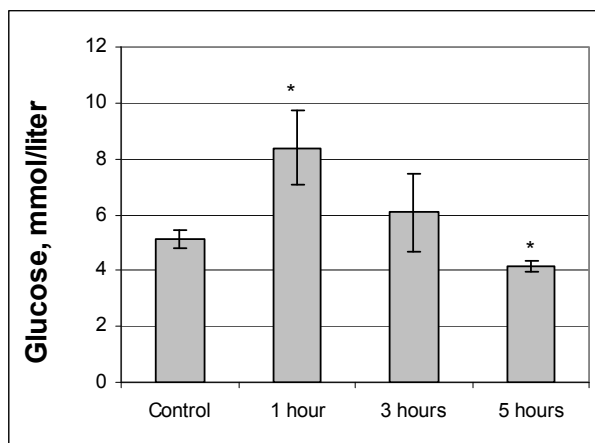


Fig. 4. Glucose level in the blood of rats of the control group in 1, 3 and 5 hours after oral glucose administration at a dose of 2 g/kg

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

For the next 5 hours after administration of glucose at a dose of 2 g/kg by body weight content of serotonin in the blood of rats remained similarly high (Fig. 5). During the study

it was found that after 3 hours after the glucose administration the content of serotonin was in 9.2 times higher than the control values, and after 5 hours – in 6.9 times.

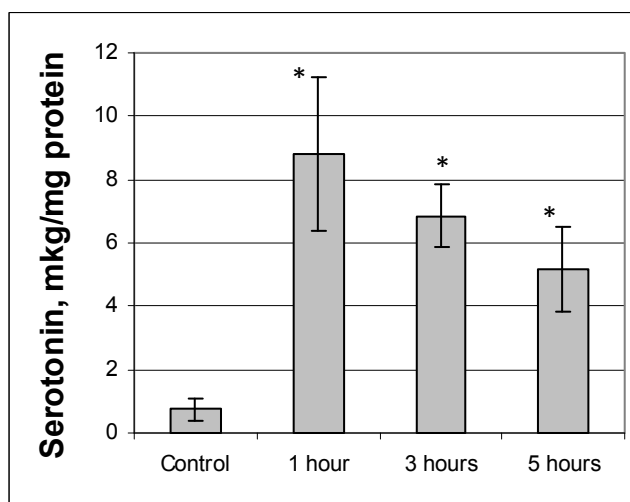


Fig. 5. Serotonin level in the blood of rats of the control group in 1, 3 and 5 hours after oral glucose administration at a dose of 2 g/kg

Note. * – $P \leq 0,05$ compared to the control group

Thus, there are two systems of serotonin, one in the brain, the other on the periphery. They are self-regulated and have different functions. According to the literature, the intraperitoneal administration of serotonin affects the concentration of metabolites associated with glucose metabolism in peripheral blood and liver. Disorders of glucose metabolism in case of diabetes are accompanied by multiple pathological changes in the structural organization and functional activity of cells and leads to

dysregulation of processes that provide homeostasis in the body. Therefore it was interesting to us to investigate the effect of glucose on the content of serotonin. Our results indicate a correlation between the concentration of glucose and serotonin content.

Conclusion. There are two independent 5-HT systems, one in the brain and the other in the periphery. In humans and rodents, 5-HT regulates glucose and lipid metabolism through several 5HTRs and the 5-HT transporter (SERT).

5-HT is known to be associated with glucose metabolism, mainly because of its regulation of the secretion of insulin in pancreatic β cells. The insulin secretion induced by glucose is inhibited by 5-HT in rat islet of Langerhans incubations in vitro. Another report demonstrates that 5-HT regulates insulin secretion by serotonylation of GTPase within the pancreatic β -cells. Additionally, 5-HT directly controls the uptake of glucose into the peripheral tissues, including the liver and skeletal muscles. 5-HT enhances net hepatic glucose uptake under hyperglycemic and hyperinsulinemic conditions [15], and stimulates glycogen synthesis at nanomolar concentrations, but inhibits it at micromolar concentrations by serotonergic mechanisms in hepatocytes [14]. Moreover, we previously reported that 5-HT induced the elevation of plasma glucose and insulin concentrations through different 5HTRs in mice, and that hyperglycemia after the injection of 5-HT was induced by repressing glucose uptake into the tissues [16].

The study shows that glucose has a direct positive effect on endogenous serotonin outflow into the bloodstream. Our previous experiments showed that the content of serotonin is increased in the serum of rats with type 2 diabetes. Thus, a diet with extremely high glucose content can lead to increase of serotonin levels in serum and complications of type 2 diabetes. Furthermore, serotonin action may well offer new drug strategies for developing therapeutic drugs for the treatment of metabolic diseases such as hyperlipidemia, hypercholesterolemia, diabetes and obesity.

References

1. Rapport M. M. Crystalline Serotonin / M. M. Rapport, A. A. Green, J. H. Page // J. Biol. Chem. – 1948. – P. 174.
2. Espamer V. Maunyn Schmiedebergs / V. Espamer // Arch. Pharm. Exp. Path. – 1940. – P. 196.
3. Hamlin E. The Synthesis of 5-HAT / E. Hamlin, E. Fischer // J. Am. Chem. Soc. – 1951. – Vol. 10 – P. 10.
4. Antidepressant and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization / S. Ramamoorthy, A. L. Bauman, K. R. Moore et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – P. 2542–2546.
5. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA / O. Cases, I. Seif, J. Grimsby et al. // Science. – 1995. – Vol. 268 – P. 1763–1766.
6. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors / L. H. Tecott, L. M. Sun, S. F. Akana et al. // Nature. – 1995. – Vol. 374 – P. 542–546.
7. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor / B. A. Rocha, K. Searce-Levie, J. J. Lucas et al. // Nature. – 1998. – Vol. 393 – P. 175–178.

8. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor / C. L. Parks, P. S. Robinson, E. Sibille et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – Vol. 95 – P. 10734–10739.
9. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity / R. R. Gainetdinov, W. C. Wetsel, S. R. Jones et al. // Science. – 1999. – Vol. 283 – P. 397–401.
10. Rapport M. M. Crystalline serotonin / M. M. Rapport, A. A. Green, I. H. Page // Science. – 1948. – Vol. 108 – P. 329–330.
11. 5-Hydroxytryptamine receptor profile in healthy and diseased human epicardial coronary arteries / A. H. Chester, G. R. Martin, M. Bodelsson et al. // Cardiovasc Res. – 1990. – Vol. 24 – P. 932–937.
12. Hixson E. J. Contractile responses to tryptamine analogues in isolated smooth muscle / E. J. Hixson, G. V. Lehmann, R. P. Maickel // Arch Int Pharmacodyn Ther. – 1977. – Vol. 229 – P. 4–14.
13. Holland J. M. Serotonin deficiency and prolonged bleeding in beige mice / J. M. Holland // Proc Soc Exp Biol Med. – 1976. – Vol. 151 – P. 32–39.
14. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration / M. Lesurtel, R. Graf, B. Aleil et al. // Science. – 2006. – Vol. 312 – P. 104–107.
15. Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity / G. P. Geba, W. Ptak, G. M. Anderson et al. // J. Immunol. – 1996. – Vol. 157 – P. 557–565.
16. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform / D. J. Walther, J. U. Peter, S. Bashammakh et al. // Science. – 2003. – Vol. 299 – P. 76.
17. Walther D. J. A unique central tryptophan hydroxylase isoform / D. J. Walther, M. Bader // Biochem Pharmacol. – 2003. – Vol. 66 – P. 1673–1680.
18. Woolley D. W. A biological and pharmacological suggestion about certain mental disorders / D. W. Woolley, E. Shaw // Proc Natl Acad Sci USA. – 1954. – Vol. 40 – P. 228–231.
19. Studies on blood-brain barrier permeability after microwave-radiation / J. H. Merritt, A. F. Chamness, S. J. Allen // Radiat Environ Biophys. – 1978. – Vol. 15 – P. 367–377.
20. Serotonin-induced hypoglycemia and increased serum insulin levels in mice / J. Yamada, Y. Sugimoto, I. Kimura et al. // Life Sci. – 1989. – Vol. 45 – P. 1931–1936.
21. Effects of serotonin on blood glucose and insulin levels of glucose- and streptozotocin-treated mice / Y. Sugimoto, I. Kimura, J. Yamada et al. // Jpn. J. Pharmacol. – 1990. – Vol. 54. – P. 93–96.
22. Chaouloff F. Ganglionic transmission is a prerequisite for the adrenaline-releasing and hyperglycemic effects of 8-OH-DPAT / F. Chaouloff, D. Laude, V. Baudrie // Eur. J. Pharmacol. – 1990. – Vol. 185. – P. 11–18.
23. The effects of the serotonin_{1A} receptor agonist buspirone on the blood glucose and pancreatic hormones in rats / Y. Sugimoto, J. Yamada, I. Kimura et al. // Jpn. J. Pharmacol. – 1992. – Vol. 60. – P. 145–148.
24. The involvement of the peripheral 5-HT_{2A} receptor in peripherally administered serotonin-induced hyperglycemia in rats / J. Yamada, Y. Sugimoto, T. Yoshikawa et al. // Life Sci. – 1995. – Vol. 57 – P. 819–825.
25. Portal infusion and glucose disposal in conscious dogs / M. C. Moore, W. B. Geho, M. Lautz et al. // Diabetes. – 2004. – Vol. 53. – P. 14–20.
26. Hampson L. J. Stimulation of glycogen synthesis and inactivation of phosphorylase in hepatocytes by serotonergic mechanisms, and counter-regulation by atypical antipsychotic drugs / L. J. Hampson, P. Mackin, L. Agius // Diabetologia. – 2007. – Vol. 50. – P. 1743–1751.

Надійшла до редколегії 08.10.14

А. Юрченко, студ., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, Є. Торгалю, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ РІЗНИХ ПЕРОРАЛЬНИХ ДОЗ ГЛЮКОЗИ НА ВМІСТ СЕРОТОНІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

Проведено аналіз впливу різних пероральних доз глюкози на вміст серотоніну в сироватці крові щурів. Встановлено підвищення вмісту серотоніну в сироватці крові щурів з цукровим діабетом та за умов введення глюкози. Встановлено зростання досліджуваного показника в сироватці крові контрольної групи тварин за умов введення глюкози. Зроблено висновок, що глюкоза має прямий позитивний вплив на ендогенний відтік серотоніну в кровотік.

Ключові слова: глюкоза, серотонін, щури, цукровий діабет 2 типу.

А. Юрченко, студ., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, Е. Торгалю, канд. біол. наук, А. Савчук, д-р біол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПЕРОРАЛЬНЫХ ДОЗ ГЛЮКОЗЫ НА СОДЕРЖАНИЕ СЕРОТОНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Проведен анализ влияния различных пероральных доз глюкозы на содержание серотонина в сыворотке крови крыс. Установлено повышение содержания серотонина в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом и при условии введения глюкозы. Установлен рост исследуемого показателя в сыворотке крови контрольной группы животных в условиях введения глюкозы. Сделан вывод, что глюкоза имеет прямое положительное влияние на эндогенный отток серотонина в кровоток.

Ключевые слова: глюкоза, серотонин, крысы, сахарный диабет 2 типа.

УДК 612,35

С. Атамнах, асп., В. Барановський, провід. інженер, Є. Решетнік, наук. співроб.,
С. Весельський, д-р біол. наук, П. Янчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ГІСТАМІНУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД ЖОВЧІ ЩУРІВ

Досліджено вплив гістаміну (8 мкг/кг, внутрішньопортально) на концентрацію ліпідів у жовчі щурів. У жовчі, отриманій у гострих дослідів на щурах самцях (наркотизація тіопенталом натрію, 50 мг/кг), методом тонкошарової хроматографії визначено концентрацію фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів, вільних жирних кислот, тригліцеридів. Результати статистично опрацьовано з використанням пакету Statistica 7.0; $p < 0,05$. Результати. Гістамін збільшував концентрації фосфоліпідів, холестеролу, його ефірів і зменшував вміст вільних жирних кислот і тригліцеридів у жовчі. Ймовірно, гістамін, діючи на транспорт у жовч ліпідних компонентів, впливає на її фізико-хімічні властивості та утримання холестеролу в змішаних жовчних міцелах. Висновок. Гістамін впливає на метаболічні перетворення і транспорт ліпідів у клітинах печінки, викликаючи зростання концентрації фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів у жовчі та зменшення в ній вмісту вільних жирних кислот і тригліцеридів.

Ключові слова: печінка, гістамін, ліпіди, жовч.

Вступ. Гістамін належить до важливих ендogenous регуляторів ліпідного обміну [1, 2, 3]. Зокрема, H1R and H2R гістамінові рецептори опосередковують вплив аутокоїду на перебіг ліпідного обміну при розвитку викликаного ліпополісахаридом ураження печінки [4] та при індукованому гіперліпідемією експериментальному неалкогольному стеатогепатиті [2, 4, 5]. Враховуючи, що у печінці активність L-гістидиндекарбоксилази (ключового ферменту синтезу гістаміну із L-гістидину) значно вища ніж у клітинах тіла шлунку та в панкреатичній тканині, а також оскільки вміст цього аутокоїду у тканині печінки є досить високим [6], слід вважати, що гістамін є вагомим регулятором функціонування печінки та обміну речовин у ній.

Одним із аспектів ліпідного обміну в організмі людини і тварин є їх метаболічні перетворення у гепатоцитах із наступним переміщенням до первинних жовчних каналікул в якості ліпідних компонентів жовчі. Завдяки цьому жовч є біологічною рідиною, яка дуже багата на ліпіди [7]. На сьогодні виявлено, що антигістамінові препарати значно змінюють транспепатоцелюлярний транспорт, впливаючи на експресію білків транспортерів плазматичних мембран клітин паренхіми печінки [8]. Враховуючи значну активність гістаміну як регулятора метаболічних і транспортних процесів у тканині печінки метою роботи було дослідження його впливу на концентрацію окремих ліпідів у жовчі. У наших експериментах гістамін використано у дозі, яка була ефективною щодо тканинного дихання у печінці та регуляції печінкового кровообігу (8 мкг/кг маси тіла тварини). Оскільки жовчотворення у клітинах печінки є комплексом численних метаболічних реакцій, значна кількість яких є кисень залежними, доцільно було дослідити наскільки гістамін у такій дозі впливатиме на обмін і транспорт ліпідів жовчі. Важливість дослідження дії регуляторного фактора на надходження і вміст ліпідів у жовчі обумовлена роллю цих сполук у виникненні та перебігу захворювань гепато-біліарної системи.

Матеріали і методи. Досліди проведені на білих щурах (самцях) масою 180-230 г. Під час гострого дослідів тварини знаходились під тіопенталовим наркозом (50 мг / кг маси тіла тварини, внутрішньочеревно). Після лапаротомії у відпрепаровану жовчну протоку через надріз вводили пластикову канюлю, котра з'єднувалась із мікропіпеткою. Жовч збирали впродовж трьох годин експерименту у шість півгодинних проб. Впродовж 30 хвилин після канюлювання жовчної протоки визначали вихідний рівень жовчовиділення шляхом збору трьох 10-хвилинних порцій жовчі. В отриманій жовчі щурів методом тонкошарової хроматографії, удосконаленим у нашій лабораторії [9] виділяли наступні фракції: фосфоліпідів, холестеролу, вільних жирних кислот, тригліцеридів та ефірів холестеролу. Показники отримані при біохімічному аналізі першої півгодинної проби жовчі характеризували

вали вихідний (контрольний) рівень досліджуваних ліпідів жовчі у кожній експериментальній групі. Саме із цими показниками вихідного рівня порівнювали надалі значення концентрації ліпідів у жовчі наступних півгодинних проб, отриманих вже після внутрішньопортального введення гістаміну (8 мкг на кг маси тіла тварини, розчинений у 200 мкл фізіологічного розчину). Тварини контрольної групи отримували внутрішньопортально фізіологічний розчин (200 мкл на 100 г маси тіла).

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету Statistica 7.0 (Stat Soft, США). Кожну групу перевіряли на нормальність за критерієм Шапіро-Вілко. Розподіл цифрових даних був відмінний від нормального. Відмінності між дослідною і контрольною групами шукали за критерієм Мана-Уїтні ($p \leq 0,05$), а відмінності у дослідній групі між вихідним рівнем секреції та рівнем секреції після введення серотоніну – за критерієм Вілкоксона ($p \leq 0,05$). Результати подані у вигляді медіани та верхнього і нижнього квартилів (Me [Q25; Q75]).

Результати та їх обговорення. Виявлено, що у жовчі зібраній впродовж півгодинного проміжку дослідів одразу після внутрішньопортального болюсного введення гістаміну (8 мкг/кг маси тіла) концентрація фосфоліпідів зростає на 5,7% ($p < 0,05$) порівняно із вихідним рівнем (концентрація фосфоліпідів у першій півгодинній пробі жовчі, зібраній до введення аутокоїду) (Таблиця 1). У жовчі зібраній за третій півгодинний проміжок гострого дослідів концентрація фосфоліпідів виявлялася більшою на 16,8% ($p < 0,05$) порівняно із вихідним рівнем та на 10,5% ($p < 0,05$) порівняно із показником отриманим для жовчі тварин контрольної групи (Таблиця 1). У четвертій пробі жовчі вміст фосфоліпідів усе ще лишався на 5,1% ($p < 0,05$) вищим ніж у контролі та на 11,1% ($p < 0,05$) більшим від вихідного рівня (Таблиця 1). Надалі у п'ятій пробі жовчі щурів дослідної групи концентрація фосфоліпідів статистично значимо не відрізняється від вихідного рівня та контролю (Таблиця 1). Хоча у жовчі зібраній впродовж останнього шостого півгодинного проміжку дослідів концентрація фосфоліпідів виявляється на 8,3% ($p < 0,05$) вищою від вихідного рівня (Таблиця 1).

Таким чином, гістамін у застосованій дозі при одноразовому внутрішньопортальному введенні викликає швидке збільшення концентрації фосфоліпідів у жовчі самців щурів. Важлива фізіологічна роль фосфоліпідів жовчі полягає у тому, що вони стабілізують колоїдну систему печінкового секрету, сприяючи утриманню холестеролу в складі змішаних жовчних міцел [10, 11, 12]. Формування таких змішаних міцел у жовчі також значно зменшує токсичні детергентні ефекти жовчних кислот щодо клітин печінки [11]. Отже, гістамін, викликаючи помірне збільшення концентрації фосфоліпідів у жовчі щурів виявляє стабілізуючий вплив як на саму жовч, так і на стан тканини печінки.

Ще одним обов'язковим проміжним продуктом обміну ліпідів, в метаболізмі і транспорті яких ключову роль відіграє печінка, є вільні (неетерифіковані) жирні кислоти, а збільшення їх вмісту в організмі асоційоване із ожирінням, діабетом 2-го типу та метаболічним синдромом [13, 14]. При визначенні вмісту вільних жирних кислот у жовчі щурів, отриманій після внутрішньопортального введення гістаміну, виявлено зменшення концентрації вільних жирних кислот, як порівняно із вихідним рівнем їх концентрації, так і щодо показників жовчі кон-

трольної групи тварин (Таблиця 1). У той же час у жовчі щурів, які отримали гістамін не виявлено тривалих змін концентрації тригліцеридів порівняно із контрольними показниками, але відзначається зменшення їх вмісту порівняно із вихідним рівнем (Таблиця 1). Зауважимо, що у жовчі щурів контрольної групи концентрація тригліцеридів хоча і має тенденцію до зниження впродовж експерименту, але статистично значимих відмінностей між вихідним рівнем і показниками проб зібраних після введення фізіологічного розчину не виявлено (Таблиця 1).

Таблиця 1. Концентрація ліпідів у пробах жовчі щурів під впливом гістаміну (8 мкг/кг маси тіла тварини) та у контролі (2 мл фізіологічного розчину/кг маси тіла тварини), Me,[25;75], n=12

№ проби жовчі	Серія дослідів	Фосфоліпіди	Вільні жирні кислоти	Тригліцериди
№ 1	Контроль	68,7 [64,1; 75,9]	11,9 [10,2; 12,8]	2,1 [1,7; 2,8]
	Дослід	65,0 [59,7; 71,3]	15,5 [13,7; 17,3]*	2,7 [2,4; 3,1]
№ 2	Контроль	67,8 [64,872,2;]	12,8 [10,8; 13,3]	2,2 [1,8; 2,6]
	Дослід	68,7 [64,1; 74,0]*	13,7 [11,9; 15,5]	2,4 [2,1; 2,7]*
№ 3	Контроль	65,0 [63,2; 70,3]	11,9 [11,3; 14,1]	2,0 [1,9; 2,3]
	Дослід	75,9 [69,6; 78,6]*	12,4 [11,5; 14,2]	2,8 [2,5; 3,2]
№ 4	Контроль	66,7 [64,1; 69,6]	12,8 [11,9; 13,3]	2,1 [1,8; 2,2]
	Дослід	72,2 [69,2; 74,0]*	11,9 [10,6; 12,8]*	2,5 [2,3; 2,8]
№ 5	Контроль	63,2 [63,2; 68,5]	12,8 [11,3; 14,2]	1,9 [1,5; 2,0]
	Дослід	64,1 [63,2; 66,9]	8,9 [7,2; 10,2]*	2,2 [1,8; 2,4]*
№ 6	Контроль	61,4 [60,5; 65,0]	13,4 [12,4; 14,2]	1,8 [1,6; 2,0]
	Дослід	70,4 [68,7; 72,2]*	11,9 [9,8; 12,8]	2,3 [2,2; 2,4]*

Примітка: * – $p < 0,05$ щодо контролю; # – $p < 0,05$ відносно вихідного рівня (перший (№1 у таблиці) 30-хв проміжок часу)

Оскільки порушення тригліцеридного гомеостазу в гепатоцитах є ознакою розвитку патологічних змін, які зрештою ведуть до тяжких уражень печінки [15, 16] то, виявлені нами ефекти гістаміну на концентрацію у жовчі вільних жирних кислот і тригліцеридів вказують на його важливий регуляторний вплив і можливу роль у розвитку як жирового переродження печінки, так і холерезу та потребують подальшого детального вивчення.

Холестерол та його ефіри є обов'язковими компонентами жовчі, коливання вмісту яких обумовлюють зміни властивостей жовчі та стають однією з причин розвитку холелітіазу [7]. В науковій літературі нажалу зустрічається мало інформації про експериментальні дослідження впливу гістаміну на виділення холестеролу із жовчю [17], хоча відзначається дія як самого аутокоїду, так і антигістамінових препаратів на його вміст у плазмі

крові [8]. Виявилось, що після внутрішньопортального введення гістаміну концентрація холестеролу збільшується на 4 – 12% ($p < 0,05$) (Таблиця 2). Слід відзначити відмінності у динаміці змін концентрації холестеролу в жовчі отриманій у контрольних дослідках та від тварин, яким внутрішньопортально ввели гістамін (Таблиця 2). А саме, у контролі спостерігається поступове зменшення концентрації вільного холестеролу в жовчі від (30,2 [27,2; 31,1]) мг% у першій півгодинній пробі жовчі (вихідний рівень) до (24,5 [20,7; 26,3]) мг% у останній шостій пробі жовчі, тобто на 18,9% (Таблиця 2). Тоді як у жовчі тварин дослідної групи концентрація вільного холестеролу в першій півгодинній пробі (вихідний рівень) складала (22,5 [20,9; 24,5]) мг%, а у останній шостій пробі – (24,5 [22,5; 24,7]) мг%, тобто статистично значимо не відрізнялася (Таблиця 2).

Таблиця 2. Концентрація холестеролу та його ефірів у пробах жовчі щурів під впливом гістаміну (8 мкг/кг маси тіла тварини) та у контролі (2 мл фізіологічного розчину/кг маси тіла тварини), Me,[25;75], n=12

30-хв проміжки часу	Серія дослідів	Вільний холестерин	Етерифікований холестерин
№ 1	Контроль	30,2 [27,2; 31,1]	2,9 [2,3; 3,1]
	Дослід	22,5 [20,9; 24,5]*	2,8 [2,5; 3,0]
№ 2	Контроль	29,0 [28,1; 31,3]	2,7 [2,0; 2,9]
	Дослід	23,4 [21,8; 25,2]*	3,2 [2,9; 3,4]*
№ 3	Контроль	28,1 [24,5; 29,0]	2,5 [2,1; 2,9]
	Дослід	25,2 [23,6; 28,1]*	2,9 [2,7; 3,3]
№ 4	Контроль	27,0 [23,2; 30,6]	2,6 [1,9; 2,8]
	Дослід	24,5 [23,4; 26,1]*	2,4 [2,2; 2,7]
№ 5	Контроль	25,4 [21,4; 28,1]*	2,3 [2,0; 2,8]
	Дослід	22,7 [20,9; 23,2]	2,2 [2,1; 2,4]
№ 6	Контроль	24,5 [20,7; 26,3]*	2,5 [2,1; 3,0]
	Дослід	24,5 [22,5; 24,7]	2,3 [2,1; 2,4]

Примітка: * – $p \leq 0,05$ щодо контролю; # – $p \leq 0,05$ відносно вихідного рівня (перший (№1 у таблиці) 30-хв проміжок часу)

Під впливом гістаміну концентрація ефірів холестеролу також зростає, але лише у жовчі зібраній впродовж півгодини одразу після внутрішньопортального введення аутокоїду (Таблиця 2). Надалі динаміка змін концентрації ефірів холестеролу стає подібною до такої у контролі.

Таким чином, у результаті проведених нами досліджень виявлено, що гістамін при одноразовому внутрі-

шньопортальному введенні викликає збільшення концентрації холестеролу та його ефірів у жовчі щурів. У той же час за даними літератури [8], антигістамінові препарати, ймовірно, збільшують ризик розвитку атеросклерозу. Отже, антигістамінові препарати, унеможливаючи впродовж певного часу вплив гістаміну на ліпідний гомеостаз, провокують перенасичення крові холестеролом. Гістамін же, як бачимо з наших результатів,

сприяє виведенню холестеролу та його ефірів із жовчу, тобто стимулює його вилучення із кровоносного русла. Слід відзначити, що одночасно із відзначеним впливом на вміст у жовчі холестеролу, гістамін викликає збільшення концентрації фосфоліпідів у печінковому секреті. Це особливо важливо, якщо взяти до уваги, що жовч є біологічною рідиною, яка, по перше, має дуже багатий ліпідний склад [7], по друге, містить багато холестеролу, який, у свою чергу, може створювати осад і конкременти (спричиняє літогенез).

Отже, під впливом гістаміну спостерігається швидке зростання вмісту як вільного, так і етерифікованого холестеролу в жовчі щурів. Також жовч щурів, які отримали гістамін збагачується фосфоліпідами. Але під впливом гістаміну, ймовірно, відбувається затримка вільних жирних кислот і тригліцеридів у клітинах печінки, в результаті чого концентрація цих ліпідних компонентів зменшується у жовчі щурів. Оскільки секреція ліпідів із печінковою жовчю є інтегральним показником, що певною мірою відображає хід метаболічних перетворень ліпідів у цьому органі та організмі в цілому, на основі аналізу отриманих результатів можемо підсумувати, що гістамін є регуляторним фактором який діє на процеси, що забезпечують надходження фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів, вільних жирних кислот і тригліцеридів у жовч. Таким чином, гістамін впливає на фізико-хімічні властивості жовчі, що забезпечують утримання холестеролу в складі змішаних жовчних міцел. Також можливо, що гістамін у застосованій нами дозі впливає на транспорт ліпідних компонентів до жовчі. Для з'ясування механізмів реалізації ефектів гістаміну на ліпідний склад жовчі та її властивості необхідним є проведення подальших досліджень із визначенням впливу аутокоїду на секрецію жовчних кислот (як провідних факторів холерезу) та на співвідношення окремих органічних компонентів у жовчі.

Висновок. Гістамін, введений внутрішньопортально щурам у гострому досліді, впливає на метаболічні перетворення і транспорт ліпідів у клітинах печінки, викликаючи зростання концентрації у жовчі фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів та зменшення вмісту вільних жирних кислот і тригліцеридів у печінковому секреті.

Список використаних джерел

1. Effect of histamine H1-receptor antagonist on the regulation of carbohydrate and lipid metabolism in rat liver / Y. Koyama, M. Imoto, M. Tanaka et al. // *Biochem Int.* – 1989. – № 18 (2). – P. 399–403.
2. Histamine Regulation in Glucose and Lipid Metabolism via Histamine Receptors. Model for Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice / K.-Y. Wang, A. Tanimoto, S. Yamada et al. // *Am. J. Pathol.* – 2010. – № 177 (2). – P. 713–723.
3. Grund V. R. Histamine-induced lipid mobilization in humans and dogs / V. R. Grund, E. W. Pollack, D. B. Hunninghake // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1976. – № 97 (3). – P. 662–668.
4. The role of histamine H1 receptor and H2 receptor in LPS-induced liver injury / T. I. Masaki, S. Chiba, H. Tatsukawa et al. // *FASEB J.* – 2005. – № 19 (10). – P. 1245–1252.
5. H1-antihistamines exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis in wild-type but not in apolipoprotein E knockout mice / V. V. Raveendran, K. M. Kassel, D. D. Smith et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2014. – № 307 (2). – P. 219–228.
6. Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57BL/6 and Balb/c. / A. S. I. Zimmermann, H. Burhenne, V. Kaever, R. Seifert, D. Neumann // *Inflamm. Res.* – 2011. – № 60 (12). – P. 1153–1159.
7. Esteller A. Physiology of bile secretion / A. Esteller // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – № 14 (37). – P. 5641–5649.
8. Chronic ingestion of H1-antihistamines increase progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice / V. V. Raveendran, D. D. Smith, X. Tan et al. // *PLoS One.* – 2014. – Jul. 14. – 9 (7). e102165. doi: 10.1371/journal.pone.0102165. eCollection 2014.
9. Пат. 99031324 Україна, МБН А61B5/14. Спосіб підготовки проб біоридин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельський С. П., Лященко П. С., Костенко С. І., Горенко З. А., Куровська Л. Ф.; заявник і патентовласник КНУ імені Тараса Шевченка. – № 33564 А; заявл. 05.10.1999; опубл. 15.02.01; Бюл. № 1.
10. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2-/- mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis / F. Lammert, D. Q. Wang, S. Hillebrand et al. // *Hepatology.* – 2004. – № 39 (1). – P. 117–128.
11. Shin-ya Morita. Molecular Mechanisms for Biliary Phospholipid and Drug Efflux Mediated by ABCB4 and Bile Salts / Shin-ya Morita, Tomohiro Terada // *Biomed. Res. Int.* – 2014; 2014: 954781.
12. Carey M. C. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man / M. C. Carey, D. M. Small // *Journal of Clinical Investigation.* – 1978. – № 61(4). – P. 998–1026.
13. Liver fatty acid-binding protein and obesity // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* – 2010. – Nov., № 21 (11). – P. 1015–1032.
14. Specific bile acids inhibit hepatic fatty acid uptake in mice / B. Nie, H. M. Park, M. Kazantzis et al. // *Hepatology.* – 2012. – Oct., № 56 (4). – P. 1300–1310.
15. Kawano Y. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease / Y. Kawano, D. E. Cohen // *Journal Gastroenterology* – 2013. – Apr., № 48 (4). – P. 434–441.
16. Koo S. H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis / S. H. Koo // *Clin Mol Hepatol.* – 2013. – Sep., № 19 (3). – P. 210–215.
17. Lee S. P. Effects of histamine and histamine antagonists on hepatic bile flow in the conscious sheep / S. P. Lee // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1984. – Jan.-Feb., 11 (1). – P. 61–69.

Надійшла до редколегії 24.11.14

С. Атамнах, асп., В. Барановський, вед. инж., Е. Решетник, науч. сотр., С. Весельский, д-р биол. наук, П. Янчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ГИСТАМИНА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЖЕЛЧИ КРЫС

Исследовать влияние гистамина (8 мкг / кг, внутрипортально) на концентрацию липидов в желчи крыс. В желчи, полученной в острых опытах на крысах самцах (наркозизация тиопенталом натрия, 50 мг/кг), методом тонкослойной хроматографии определено концентрацию фосфолипидов, холестерина и его эфиров, свободных жирных кислот, триглицеридов. Результаты статистически обработаны с использованием пакета Statistica 7.0; $p < 0,05$. Гистамин увеличивал концентрации фосфолипидов, холестерина, его эфиров и уменьшал содержание свободных жирных кислот и триглицеридов в желчи. Вероятно, гистамин, действуя на транспорт в желчь липидных компонентов, влияет на ее физико-химические свойства и содержание холестерина в смешанных желчных мицеллах. Гистамин влияет на метаболитические преобразования и транспорт липидов в клетках печени, вызывая повышение концентрации фосфолипидов, холестерина и его эфиров в желчи и снижение в ней содержания свободных жирных кислот и триглицеридов.

Ключевые слова: печень, гистамин, липиды, желчь.

S. Athamnah, PhD stud., V. Baranovsky, chief ing., E. Reshetnik, scientific researcher., S. Veselsky, DSc., P. Yanchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine

EFFECT OF HISTAMINE ON LIPID COMPOSITION OF RAT BILE

To investigate the effect of histamine (8 mkg/kg, i/v) on the concentration of lipids in the rats bile. Using the method of thin layer chromatography concentrations of phospholipids, cholesterol and its esters, free fatty acids, triglycerides were determined in the rats bile collected in acute experiments (anesthesia, sodium thiopental, 50 mg/kg). The results were calculated using Statistica 7.0; $p < 0,05$. Histamine increased concentration of phospholipids, cholesterol, its esters and reduced content of free fatty acids and triglycerides in the rats bile. Probably, histamine, acting on transport lipid components in bile effect on its physical and chemical properties and the maintenance of cholesterol in mixed bile micelles. Histamine affects the metabolic conversion and transport of lipids in the liver cells, causing the increase in the concentration of phospholipids, cholesterol and its esters in bile and decrease it in the content of free fatty acids and triglycerides.

Key words: Liver, histamine, lipids, bile.

UDC 578.85/86

Al Dalain Emad, PhD student, A. Bysov, PhD, O. Shevchenko, PhD,
T. Shevchenko, PhD, V. Polischuk, Dr.Sci., Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

SEVERAL VIRAL DISEASES OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM* CIRCULATING IN UKRAINE

*This paper describes detection of some typical plant viruses infecting *Lycopersicon esculentum* Mill. plants in Ukraine. Diagnostics using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) confirmed presence of antigens of viruses belonging to Tobamovirus (PMMoV, ToMV), Cucumovirus (CMV) and Tobravirus (TRV) genera in sap of tomato plants. When studying viral diseases of tomatoes, monoinfection was shown to be prevalent. Tomato mosaic virus (ToMV) was most common.*

Keywords: viral diseases, Tobamovirus, Cucumovirus, Tobravirus, tomato.

Introduction. Plant diseases are one of the factors suppressing the efficiency of agriculture. In this context, viruses infecting vegetable cultures are considered as pathogens having most prominent influence. Viral diseases can barely be controlled, lead to decreased yield and serious commercial losses in agriculture [1]. *L. esculentum* plants may be infected by a wide range of viruses from different families including *Bromoviridae* (*Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato aspermy virus* (TAV)), *Virgaviridae* (*Tomato mosaic virus* (ToMV), *Potyvirus* (*Potato virus Y* (PVY)), *Secoviridae* (*Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV)), *Bunyaviridae* (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)), *Alphaflexiviridae* (*Potato virus X* (PVX), *Pepino mosaic virus* (PepMV)) and *Geminiviridae* (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)) [2, 3].

Today, novel viruses appear and spread rapidly on tomato culture. These include *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato Torrado virus* (ToTV) and *Pepino mosaic virus* (PepMV) [4].

Earlier, CMV, ToMV, Tobacco mosaic virus (TMV), TSWV [5], PVM and PVY have been detected on tomato plants in Ukraine [6].

This paper aims at studying diversity of viruses circulating in Ukraine and infecting *L. esculentum* plants.

Materials and methods. *L. esculentum* plants collected from different regions of Ukraine with virus-like symptoms were the objects of this study. Plant sample collection basing on the visual symptoms is considered to be the simplest and most common method. It is based on the ability of many viruses of inducing characteristic symptoms of infection developing in the form of bands/streaks of leaf blades, their deformations, shortening of stems and shoots (rosette-like appearance), leaf discoloration, formation of necrotic spots on leaves, etc. For this study, we collected samples of tomato with typical viral symptoms under open ground conditions in Kyiv, Poltava, Zhytomyr, Vinnytsya regions of Ukraine and in AR Crimea during 2012-2013 years.

For detection of virus antigens, we conducted DAS-ELISA with commercial test systems of Loewe (Germany) according to the manufacturer's recommendations in 96-well polystyrene plates (LabSystem, Finland). For ELISA, plant samples (vegetative organs and fruits) were homogenized in 0,1 M PBS + 0,001 M EDTA (1:2, v/v) with following sedimentation at 4000 rpm for 20 min at 4°C using PC-6 centrifuge [7]. Such homogenate was used for ELISA. Collected samples were analyzed for presence of following viruses: *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Tobacco rattle virus*, *Tomato ringspot virus*, *Pepper mild mottle virus* and *Tomato yellow leaf curl virus*. Optical density values were registered using ELISA reader Termo LabSystems Opsis MR (USA) with Dynex Revelation Quicklink software at the wavelength of 405/630 nm [7]. The percentage of infected plants was determined following generally accepted method of calculation described in [8]. Morphology of virions was analyzed using transmission electron microscope Jeol (JEM 1400) after staining with 2% uranyl acetate [9].

Results and discussion. The disease symptoms were observed on *Solanaceae* plants (tomatoes, peppers and eggplants) in 1-1,5 month after sawing, during budding. First signs of infection were prominent on young leaves in the form of yellow spots and tissue clearing along the major veins. Further, diseased plants developed yellow or green mosaics, chloroses and necrotic spotting. Tomatoes were collected in Kyiv, Poltava, Zhytomyr, Vinnytsya regions of Ukraine and in AR Crimea. During the sampling, different symptoms were noted both on leaves and fruits.

On the leaf blades, varying sorts of mosaic symptoms were observed including bright green and yellow green mosaics, both interveinal and developed along the veins. Also, chlorosis and deformations were evident. Bronze coloring of leaves (typical for TSWV) has not been observed. Some fruits showed yellowish irregularly shaped spots or ring spots (Fig.1).



Figure 1. Yellow spotting on tomato fruit

Observed symptoms were similar to those known to be induced by vegetable viruses, including *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco rattle virus*, *Tomato mosaic virus*, *Tobacco*

mosaic virus, *Tobacco ringspot virus*, *Tomato ringspot virus* and many others. However, the similarity (convergence) of symptoms induced by different viruses on the same plants

cannot allow determining virus species. Thus, our further efforts were directed on establishing taxonomic positions of these viruses using additional methods. For identification of antigens of seven viruses in collected *L. Esculentum* samples, we have used double-antibody sandwich (DAS) ELISA with commercial test systems of Loewe (Germany).

As such, we have confirmed the occurrence of four viruses: *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Tobacco rattle virus* and *Pepper mild mottle virus*.

This allowed evaluating the percentage of virus-infected samples of *L. esculentum* in the general number of samples used (Fig.2).

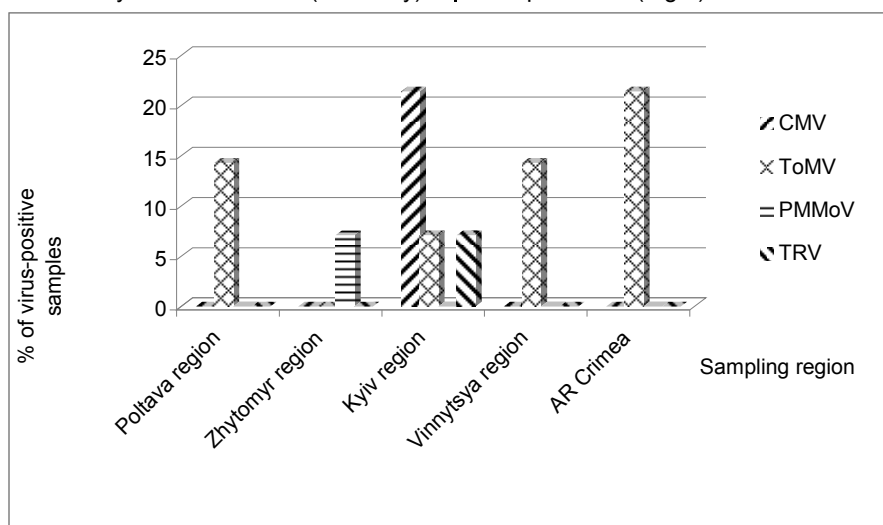


Figure 2. Percentage of samples of *L. esculentum* infected by *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, and *Tobravirus* species in different regions of Ukraine

Therefore, 14,3% of tomato plants sampled in Poltava region contained ToMV antigens. 7,1% of tomato plants sampled in Zhytomyr region contained PMMoV antigens. In Kyiv region, 7,1% of tomato plants contained ToMV antigens, 7,1% – TRV antigens, and 21,4% – CMV antigens. In Vinnytsya region, 14,3% of tomato plants contained ToMV antigens, whereas in AR Crimea this pathogen has been found in 21,4% of samples.

Transmission electron microscopy (TEM) was used for direct indication of viruses in *Lycopersicum esculentum* plants, and to study virus morphology, particle dimensions, and to confirm ELISA results as well.

TEM results indicated the presence of rod-shaped virions of $300 \pm 3 \times 19 \pm 3$ nm typical for PMMoV (Fig.3).

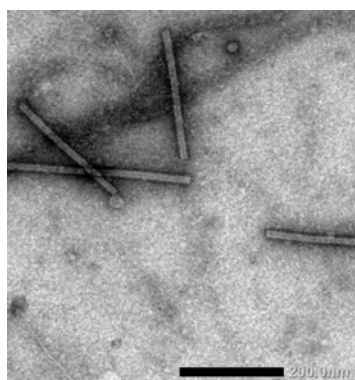


Figure 3. Electron micrograph of rod-shaped PMMoV virus particles

In addition, spherical virions have been found of 30 nm typical for CMV (Fig.4).

Therefore, screening of commercial tomato plantings using different approaches (ELISA and TEM) confirmed their infection induced by ToMV, PMMoV, CMV and TRV.

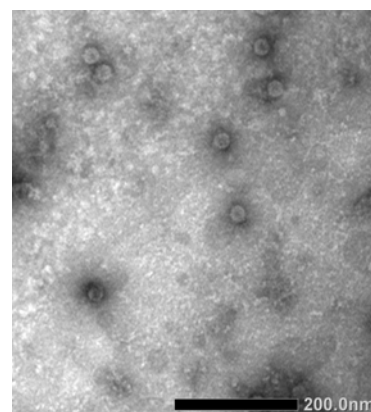


Figure 4. Electron micrograph of spherical CMV particles

Conclusions. Most typically tomato plants are affected by tomato mosaic disease induced by ToMV. Quite often plants are simultaneously infected by the complex of viruses which may include *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Aspermy tomato virus* (AsTomV), etc. In such cases the disease typically progresses more severely leading to higher yield losses making further plant cultivation unreasonable from the commercial point of view. Even genetic-based tomato resistance to certain viruses can be of no use as the resistance barrier becomes 'ruined' under the stress exerted by various pathogens at the same time [3]. The occurrence of antigens of viruses belonging to *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cucumovirus* (CMV) and *Tobravirus* (TRV) genera has been confirmed by ELISA and, in part, by TEM. For sampled *L. esculentum* plants, viral monoinfection was predominant. *Tomato mosaic virus* has been most widespread in this study.

References

1. Loebenstein G. Gad Loebenstein. Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries / G. Loebenstein,

G. Thottappilly. — G. : Springer Science+Business Media Dordrecht, 2003. — 800 p.

2. Identification of nepoviruses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Donatas Šneideris, Irena Zitikaite, Marija Žizyte et al. // *Žemdirbystė=Agriculture*. — 2012. — Vol. 99, No. 2. — P. 173–178.

3. Болезни и вредители овощных культур и картофеля / А. Ахатов, Ф. Ганибал, Ю. Мешков и др. — М. : Товарищество научных изданий КМК, 2013. — 463 с.

4. King Andrew M. Q. Virus taxonomy / Andrew M. Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens. // Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. — 2012. — 1139 p.

5. Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби : метод. реком. / Т. О. Руднева, Т. П. Шевченко, В. П. Поліщук, А. Л. Бойко. — К. : ЦОП "Глобус". — 2012. — 23 с.

6. Властивості томатних ізолятів М- та Y-вірусів картоплі / Л. Т. Міщенко, А. А. Дуніч, О. І. Данілова, В. П. Поліщук // *Мікробіол. журн.* — 2013. — Т. 75, № 2. — С. 89–97.

7. Crowther J. R. ELISA. Theory and practice / J. R. Crowther, — N.Y. : Humana Press, — 1995. — 223 p.

8. Омелюта В. П. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур / В. П. Омелюта, І. В. Григорович, В. С. Чабан, В. Н. Підолішко, Ф. С. Каленич - К. : Урожай, 1986. — 296 с.

9. Dijkstra J. Practical Plant Virology: Protocols And Exercises / J. Dijkstra, P. de Jager Cees. — Berlin : Springer-Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. — 459 p.

Надійшла до редколегії 26.11.14

Аль Далаін Емад, асп., А. Бисов, канд. біол. наук, О. Шевченко, канд. біол. наук, Т. Шевченко, канд. біол. наук, В. Поліщук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДЕЯКІ ВІРУСНІ ХВОРОБИ *LYCOPERSICON ESCULENTUM*, ЩО ЦИРКУЛЮЮТЬ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Робота присвячена детекції вірусів рослин, що інфікують *L. esculentum* на території України. За результатами ІФА визначено наявність антигенів вірусів родів *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cuscutovirus* (CMV) та *Tobravirus* (TRV). При дослідженні вірусних хвороб *L. esculentum* здебільшого зустрічалась моноінфекція. Найбільш розповсюдженою згідно наших досліджень виявився вірус мозаїки томату.

Ключові слова: вірусні захворювання, *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cuscutovirus* (CMV) та *Tobravirus* (TRV), помідори.

Аль Далаін Емад, асп., А. Бисов, канд. біол. наук, О. Шевченко, канд. біол. наук, Т. Шевченко, канд. біол. наук, В. Поліщук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

НЕКОТОРЫЕ ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ *LYCOPERSICON ESCULENTUM*, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

Работа посвящена детекции вирусов растений, которые инфицируют *L. esculentum* на территории Украины. По результатам ИФА определено наличие антигенов вирусов родов *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cuscutovirus* (CMV) та *Tobravirus* (TRV). При исследовании вирусных болезней *L. esculentum* в основном преобладала моноинфекция. Согласно нашим исследованиям более распространенным оказался вирус мозаики томата.

Ключевые слова: вирусные заболевания, *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cuscutovirus* (CMV) та *Tobravirus* (TRV), томаты.

УДК 616-006.04:577.122.612.014

O. Gerashchenko, PhD stud., V. Kovalchuk, II Year Magister,
O. Boidunik, I Year Magister, M. Soldatkina, PhD., P. Pogrebnoy, DSc.
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

FUSION EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN BETA-DEFENSIN-3 AND ANALYSIS OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

Human beta-defensins (hBDs) are small cationic antimicrobial peptides with multiple biologic activities. The aim of the study was cloning, expression in *E.coli*, purification and in vitro analysis of biological activity of recombinant human beta-defensin-3 (rec-hBD-3). hBD-3 cDNA was cloned into pGEX-2T vector, and recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21(DE3) cells. Rec-hBD-3 was expressed in bacterial cells as GST-hBD-3 fusion protein, and purified by 3-step procedure via affine chromatography on glutathione-agarose, cleavage of fusion protein by thrombin, and reverse phase chromatography on Sep-Pack C18. Analysis of biological activity of rec-hBD-3 has shown that the peptide is active against *Pseudomonas aeruginosa* in micromolar concentrations in radial diffusion test. Rec-hBD-3 did not affect proliferation and viability of cultured human cancer cells of A431, A549, and TPC-1 lines, but was capable to potentiate cytotoxic effects of rec-hBD-2 and docetaxel in vitro.

Key Words: human beta-defensin-3, cancer cell, proliferation, viability, antimicrobial activity.

Intriduction. Human beta-defensins (hBDs) are small cationic antimicrobial peptides produced by different cell types. Human beta-defensins have been primarily recognized to possess a broad spectrum of antimicrobial activities, but as it has been shown later exhibit multiple biologic effects toward eukaryotic cells [1, 2]. In a number of studies there have been shown effects of hBDs on many important cell processes – cell proliferation, viability, differentiation, and apoptosis, and it has been shown that such effects of hBDs are concentration-dependent and could be exerted against many cell types [3-6]. Human β -defensin-3 (hBD-3; *DEFB103*) was firstly isolated in 2001 from human psoriatic lesions and cloned from keratinocytes and tracheal epithelial cells [7]. Mature hBD-3 molecule is composed from 45 aminoacid residues (molecular weight is 5.15 kDa) and possesses high cationic charge (+11). This defensin possesses potent broad

spectrum activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria but, unlike other studied members of beta-defensin family, antimicrobial activity of hBD-3 is found to be salt-insensitive. hBD-3 is an antimicrobial with an inducible expression which could be up-regulated upon stimulation with interferon- γ via STAT binding site in promoter region of *DEFB103* gene [8]. Expression of hBD-3 has been registered in many tumor types but its functional role remains unclear: hBD-3 is thought to play a role of pro-oncogenic molecule in some tumors (head and neck cancer, oral carcinoma [9, 10]) or tumor suppressor in salivary gland tumors [11]. Up to date, the role of hBD-3 in tumor cell biology is insufficiently investigated.

The present study was aimed on prokaryotic expression of hBD-3 (rec-hBD-3) and analysis of its biological activity in vitro.

Materials and methods. Human epidermoid carcinoma A431 cells and human lung adenocarcinoma A549 cells were obtained from the Bank of Cell Lines from Human and Animal Tissues, R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine). Human papillary thyroid carcinoma cell line TPC-1 was kindly provided by Dr. V.M. Pushkarev (V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine). The cells were cultured *in vitro* in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin G sodium, 100 µg/mL streptomycin sulfate in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. To clone the gene coding mature hBD-3 sequence, total RNA was isolated from human lung adenocarcinoma sample, and hBD-3 cDNA was obtained by reverse transcription using a pair of specific primers: hBD-3-F: GCG CGG ATC CGG AAT CAT AAA CAC ATT ACA GAA; hBD-3-R: CAC GAA TTC TCA TTT CTT TCT TCG GCA GCA TTT TCG GC. Primer design was based on analysis of NM_001081551.3 sequence from GenBank database. hBD-3 cDNA was cloned into pGEX-2T vector (GE Healthcare, Sweden). Restriction of plasmids, ligation of fragments, bacterial cell transformation were performed by standard protocols. Rec-hBD-3 was purified by three-step procedure successfully used earlier for purification of rec-hB-2 and rec-hBD-4 [12, 13]. In brief, *E. coli* BL21(DE3) bacteria transformed with GST-hBD3-recombinant plasmid were induced with 1 mM IPTG for 6 h and precipitated by centrifugation. The bacterial cell lysate was applied to affine chromatography on glutathione agarose column (GE Healthcare, Sweden) with following cleavage of the defensin from fusion protein by thrombin digestion. hBD-3 peptide was further purified by reverse phase chromatography on Sep-Pack C18 cartridge (Waters, USA). Protein purity of the peptide preparation was analyzed by 7–22% gradient SDS PAGE. Antimicrobial activity of rec-hBD-3 was analyzed against *Pseudomonas aeruginosa* by bacterial growth suppression

in radial diffusion assay [14]. *P. aeruginosa* ATCC 9027 strain was obtained from Ukrainian Collection of Microorganisms (D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine).

To study the effect of rec-hBD-3 on cell proliferation A431, A549, and TPC-1 cells were cultured in 24-well plates (5x10⁴ cells per well) to nearly 50% confluence and then treated by addition of rec-hBD-3 at various concentrations (from 1 nM to 5 µM) for 48 h in FBS free medium. After the treatment, cells were triply washed with PBS, detached with trypsin, and counted in hemocytometer. The percentage of dead cells was analyzed using trypan blue staining.

To evaluate the effect of rec-hBD-3 on cell viability, MTT-test has been applied [15]. A549, A431, and TPC-1 cells were seeded into 96-well plates (7x10³ cells per well) and incubated with rec-hBD-3 for 48 h in FBS free medium. Then the cells were treated with (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) by standard protocol, and colorimetric reaction was evaluated with the use of ELISA reader (Awareness Technology Inc, USA) at λ = 545.

The data are reported as the mean ± SD. The statistical significance of differences between mean values was assessed by the Student's *t*-test. Values *p* < 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion. For expression of rec-hBD-3 we have used GST-system for production of recombinant proteins allowing protein expression in *E. coli* strains in a form of chimeric proteins fused to GST tag. Both PCR product and pGEX-2T vector were purified, digested by BamHI and EcoRI restriction endonucleases, ligated and the hybrid plasmid was used for subsequent transformation of *E. coli* BL21(DE3) cells. After selection of colonies (Fig. 1), recombinant vectors were analyzed by digestion with BamHI and EcoRI endonucleases; the result evidenced on correct 135 bp insertion the sequence of which was shown to correspond to nucleotide sequence of hBD-3 gene by direct DNA sequencing analysis.

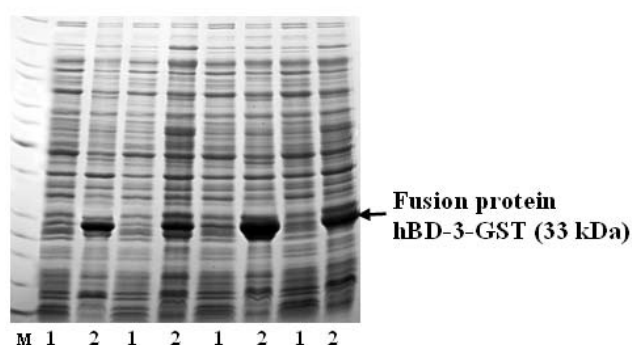


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of lysates of bacterial colonies before (lines 1) and after (line 2) induction of bacteria with 1 mM IPTG for 6 h.; M – protein marker (SM0661, Fermentas)

Purification of rec-hBD-3 has been performed by routine three-step procedure including affine chromatography, proteolysis of fusion protein with thrombin and reverse phase chromatography. Purity of hBD-3 fraction was analyzed by gradient 7–22% SDS-PAGE

(Fig. 2,a) and antimicrobial activity of the defensin was determined by inhibitory zone test. Rec-hBD-3 was active against *P. aeruginosa* at micromolar concentrations (Fig. 2, b). So, we have expressed in prokaryotic system and purified recombinant hBD-3 with antimicrobial activity.

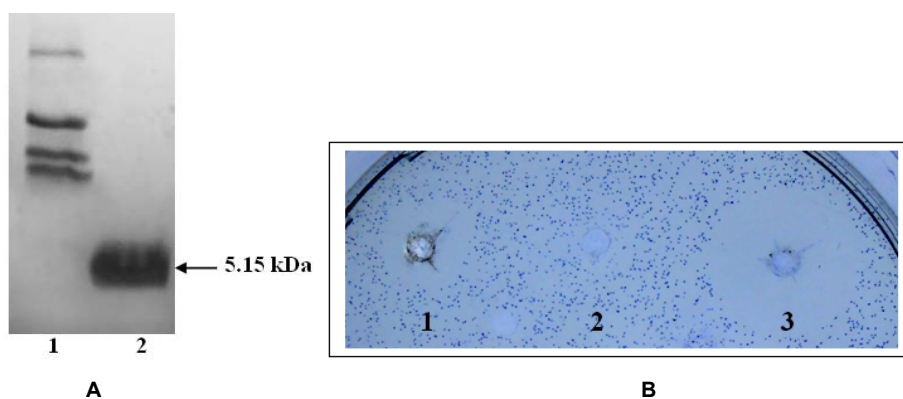


Fig. 2. A. SDS-PAGE analysis of rec-hBD-3 purified by reverse phase chromatography on Sep-Pak C18 (Water, USA).

1 – Protein Marker 6.5 – 200 kDa (SERVA Electrophoresis, Germany);
2 – fraction of rec-hBD-3 eluted with 50% CH₃CN. B. Antimicrobial activity of rec-hBD-3 against *P.aeruginosa* in radial diffusion assay:
1 – 2 µg rec-hBD-3; 2 – 3 µL H₂O (control); 3 – 7 µg rec-hBD-3

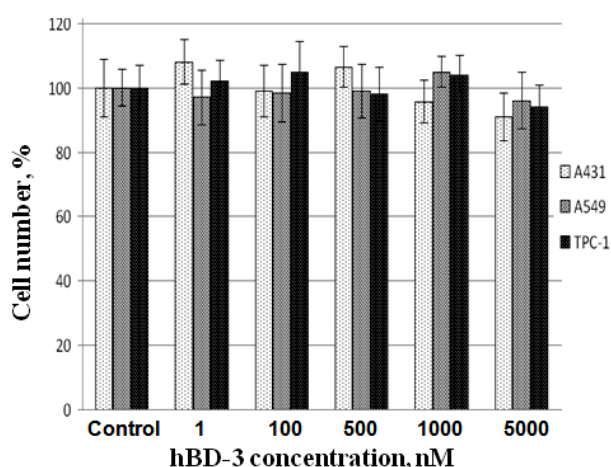


Fig. 3. Effect of rec-hBD-4 on proliferation of cultured cells of A431, A549, and TPC-1 lines.

The number of attached cells was evaluated by direct cell counting.

The data of three independent experiments are presented as the mean $\pm$ SD

Next, we have analyzed whether hBD-3 could affect cancer cell proliferation and viability in nanomolar concentrations. A concentration-dependent effects toward cancer cell growth were reported earlier for some beta-defensins, in particular hBD-2 and hBD-4 [5, 13]. The influence of rec-hBD-3 on proliferation and viability of three cultured human cancer cell lines – A431 (epidermoid carcinoma cells), A549 (lung adenocarcinoma cells), and TPC-1 (papillary thyroid cancer cells) was evaluated by direct cell counting technique and MTT assay respectively.

As it has been shown, rec-hBD-3 did not exert significant effects on proliferation and viability of cultured cancer cell lines at the range of concentrations from 1 nM to 5 µM (Fig. 3, 4). These data are in accordance with the data reported earlier on the absence of cytotoxic activity of this defensin at low micromolar concentrations [7]. Interestingly, when we have studied combined effect of rec-hBD-3 and rec-hBD-2 on viability of A431 cells (Fig. 5), we have registered significant increase of cytotoxicity of such combination compared to that of rec-hBD-2 only.

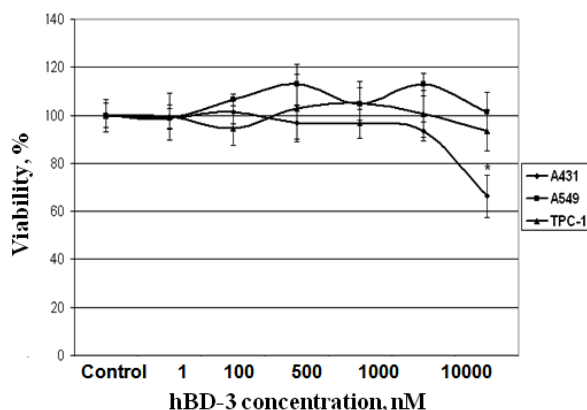


Fig. 4. Effect of rec-hBD-3 on viability of A431, A549, and TPC-1 cells.

The number of viable cells was evaluated by MTT analysis.

The data of three independent experiments are presented as the mean $\pm$ SD

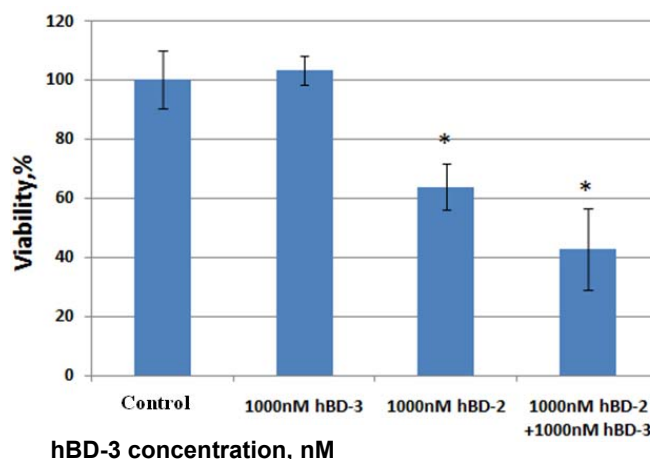


Fig. 5. Effect of rec-hBD-2 alone or in combination with rec-hBD-3 on viability of A431 cells.

The number of viable cells was evaluated by MTT analysis.

The data of three independent experiments are presented as the mean $\pm$ SD.

*The difference is significant compared to appropriate control value ($p < 0.05$)

Moreover, while being noncytotoxic, rec-hBD-3 has been found to potentiate antiproliferative effects of clinically well-established anti-mitotic chemotherapy medication – docetaxel. As it has been demonstrated in MTT assay (Fig. 6), docetaxel at the doses of 0.1 and 1 μ M significantly suppressed viability of A431 cells in a concentration

dependent manner. The cytotoxic effect of 0.1 and 1 μ M docetaxel in combination with 500 nM, 1 μ M or 2 μ M rec-hBD-3 was significantly higher than that of docetaxel only (Fig. 6). This finding could be of potential clinical importance, and the mechanisms of hBD-3-dependent attenuation of cytotoxic effects of docetaxel require further examination.

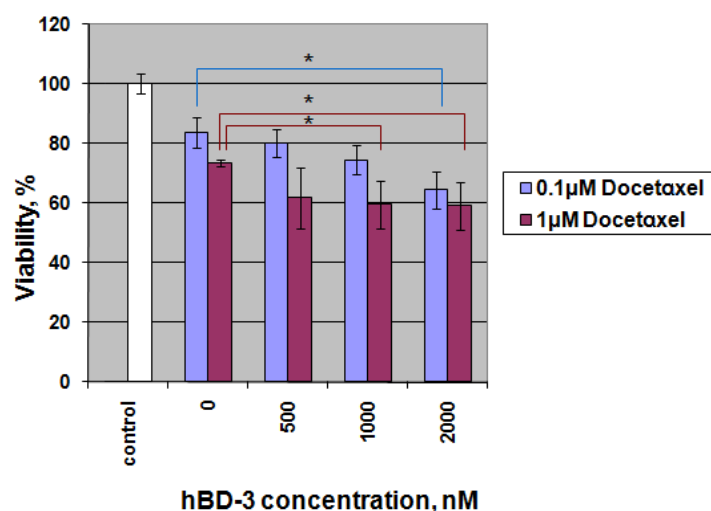


Fig. 6. Effect of docetaxel in combination with rec-hBD-3 on viability of A431 cells.

The number of viable cells was evaluated by MTT analysis. The data of three independent experiments are presented as the mean $\pm$ SD.

*The difference is significant compared to appropriate control value ($p < 0.05$)

Conclusion. In this work we report on procaryotic expression of bioactive rec-hBD-3. Analysis of biological activity of this defensin has shown that hBD-3 has no effect on proliferation and viability of cultured human cancer cells but it is capable to potentiate cytotoxic effects of hBD-2 and docetaxel *in vitro*.

Acknowledgement. This work was in part supported with NASU grant 0110U005758 "Fundamental basis of molecular and cellular biotechnologies".

References

- Human defensins and LL-37 in mucosal immunity / M. Doss, M. R. White, T. Tecle, K. L. Hartshorn // J. Leukocyte Biol. – 2010. – Vol. 87, № 1. – P. 144–149.
- Auvynet C. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity / C. Auvynet, Y. Rosenstein // FEBS J. – 2009. – № 276. – P. 6497–6508.

- Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines / F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Nakano et al. // Invest Dermatol. – 2007. – № 127. – P. 594–604.

- Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells / A. Baroni, G. Donnarumma, I. Paoletti et al. // Peptides. – 2009. – № 30. – P. 267–272.

- Human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells: *in vitro* study / E. Zhuravel, T. Shestakova, O. Efanova et al. // Exp. Oncol. – 2011. – 33. – P. 114–1120.

- Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation / J. Winter, A. Pantelis, R. Reich et al. // Cancer Invest. – 2011. – № 29. – P. 196–201.

- Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic / J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J. M. Schroder // J. Biol. Chem. – 2001. – № 276. – P. 5707–5713.

- Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage

chemoattraction / J. R. Garcia, F. Jaumann, S. Schulz et al. // Cell Tissue Res. – 2001. – № 306. – P. 257–264.

9. Human β -defensin 3 promotes NF- κ B-mediated CCR7 expression and anti-apoptotic signals in squamous cell carcinoma of the head and neck / Y. K. Mburu, K. Abe, L. K. Ferris et al. // Carcinogenesis. – 2011. – № 32. – P. 168–174.

10. An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis / G. Jin, H. I. Kawsar, S. A. Hirsch et al. // PLoS One. – 2010. – № 5. – P. 10993.

11. Human β -defensins and psoriasin/S100A7 expression in salivary glands: anti-oncogenic molecules for potential therapeutic approaches / M. R. Kesting, M. Stoeckelhuber, A. Kuppek et al. // BioDrugs. – 2012. – № 26. – P. 33–42.

12. Production of recombinant of hBD-2 – human antimicrobial peptide expressed in cervical and vulval cancer / I. L. Lisovskiy, N. V. Markeeva, V. M. Shnitsar et al. // Exp Oncol. – 2003. – № 25. – P. 36–39.

13. Biologic activities of recombinant human-beta-defensin-4 toward cultured human cancer cells / O. L. Gerashchenko, E. V. Zhuravel, O. V. Skachkova // Exp. Oncol. – 2013. – № 35 (2). – P. 84–91.

14. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / R. I. Lehrer, M. Rosenman, S. Harwig et al. // J. Immunol Methods. – 1991. – № 137. – P. 167–173.

15. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosman // Immunol Methods. – 1983. – № 65. – P. 55–63.

Abbreviations used: GST – glutathione-S-transferase; hBDs – human beta-defensins; hBD-3 – human beta-defensin-3; rec-hBD-3 – recombinant hBD-3.

Надійшла до редколегії 01.12.14

О. Геращенко, асп., В. Ковальчук, магістр 2 року навчання, О. Бойдуник, магістр 1 року навчання,
М. Солдаткіна, канд. біол. наук, П. Погрібний, д-р біол. наук
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ

ЭКСПРЕСИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕТА-ДЕФЕНСИНУ-3 ЛЮДИНЫ ТА АНАЛІЗ ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Бета-дефенсини людини (human beta-defensins, hBDs) – це невеликі за розміром катіонні антимікробні пептиди з широким спектром біологічної активності. Метою дослідження було клонувати та експресувати в *E.coli* рекомбінантний бета-дефенсин-3 людини (rec-hBD-3), провести його очистку та проаналізувати *in vitro* біологічну активність цього пептиду. кДНК hBD-3 було клоновано у вектор pGEX-2T, надалі рекомбінантною плазмидою було трансформовано клітини *E.coli* BL21(DE3). Rec-hBD-3 було експресовано в бактеріальних клітинах у вигляді злитого білка GST-hBD-3 та очищено шляхом афінної хроматографії на глутатіон-агарозі, розщеплення злитого білка тромбіном та розділення продуктів протеолізу зворотньофазовою хроматографією на носії Sep-Pack C18. Аналіз біологічної активності rec-hBD-3 показав, що рекомбінантний пептид є активним проти *Pseudomonas aeruginosa* в мікромолярних концентраціях в тесті радіальної дифузії, не впливає на проліферацію та життєздатність культивованих пухлинних клітин людини ліній A431, A549 та TPC-1, але є здатним підсилювати цитотоксичні ефекти rec-hBD-2 та доцетакселу *in vitro*.

Ключові слова: бета-дефенсин-3 людини, пухлинна клітина, проліферація, життєздатність, антимікробна активність.

О. Геращенко, асп., В. Ковальчук, магистр 2 года обучения, О. Бойдуник, магистр 1 года обучения,
М. Солдаткина, канд. биол. наук, П. Погребной, д-р биол. наук
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕТА-ДЕФЕНСИНА-3 ЧЕЛОВЕКА И АНАЛИЗ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Бета-дефенсини человека (human beta-defensins, hBDs) – это катионные антимикробные пептиды с широким спектром биологической активности. Целью исследования было клонировать и экспрессировать в *E.coli* рекомбінантний бета-дефенсин-3 человека (rec-hBD-3), провести его очистку и проанализировать *in vitro* биологическую активность этого пептида. кДНК hBD-3 клонировали в вектор pGEX-2T, рекомбінантною плазмидою трансформировали клетки *E.coli* BL21(DE3). Rec-hBD-3 экспрессировали в бактеріальних клітинах в виде слитого белка GST-hBD-3 и очищали путем аффинной хроматографии на глутатион-агарозе, расщепления слитого белка тромбином и разделения продуктов протеолиза обратнoфазовой хроматографией на Sep-Pack C18. Анализ биологической активности rec-hBD-3 показал, что рекомбінантний пептид активен против *Pseudomonas aeruginosa* в микромолярных концентрациях в тесте радиальной диффузии, не влияет на пролиферацию и жизнеспособность культивированных опухолевых клеток линий A431, A549 и TPC-1, однако способен усиливать цитотоксические эффекты rec-hBD-2 и доцетаксела *in vitro*.

Ключевые слова: бета-дефенсин-3 человека, опухолевая клетка, пролиферация, жизнеспособность, антимикробная активность.

Наукове видання



ВІСНИК КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 3(68)

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та матеріали на електронних носіях не повертаються.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 12,0. Наклад 300. Зам. № 214-7060.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 4.
Підписано до друку 06.06.14

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02