

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями НДІ фізіології імені академіка Богача та ННЦ "Інститут біології та медицини" та інших наукових установ. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Подано експериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными НИИ физиологии имени академика Богача и УНЦ "Институт биологии и медицины" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and ESC "Institute of Biology and medicine". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and student.

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР
РЕДАКЦІЙНА
КОЛЕГІЯ**

Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр., адміністратор сайту); 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); 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); І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скларов, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Мака-рчук, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, 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. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусі

Адреса редколегії

ННЦ "Інститут біології та медицини";
просп. акад. Глушкова, 2а, Київ, Україна, 03127
☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com

Затверджено

Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"
13.11.17 (протокол № 4)

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, Київ,
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет".
Свідоцтво внесено до Державного реєстру
ДК № 1103 від 31.10.02

Адреса видавця

ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14, Київ,
Україна, 01601
☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

**Журнал входит
до наукометричних баз /
Abstracted and Indexed:**

Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), 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 (з 2014 р.).

ЗМІСТ

Скачкова О., Антонюк С., Орел В., Храновська Н., Іномістова М. Вплив наночастинок оксиду заліза на життєздатність генерованих дендритних клітин людини	5
Бондаренко М., Бондаренко О., Кравченко В., Макачук М. Формування довільної уваги у чоловіків та жінок при виконанні завдань із високим когнітивним навантаженням	9
Дмитрик В., Расцька Я. Біохімічні показники сироватки крові щурів при лужному опіку стравоходу II ступеня за умов введення водного розчину екстракту лущиння <i>P. vulgaris</i>	14
Калмикова О., Пустовалов А., Варенюк І., Держинський М. Ефект різних режимів уведення мелатоніну на розвиток ожиріння у щурів, індукованого висококалорійною дієтою	20
Гончаревський С., Макачук М., Мартинюк В. Температура репрезентативних зон грудного відділу вегетативної нервової системи, як показник функціонального стану організму людини	27
Засць В., Цуварєв О., Коломієць Л., Корнелюк О. Бактеріальна експресія рекомбінантного функціонально активного N-кінцевого модуля тирозин-тРНК синтетази <i>B. taurus</i>	33
Нікітіна Н., Береговий С., Степанова Л., Кабанов О. Визначення оптимальної схеми введення Кокарніту щурам із діабетичною полінейропатією за допомогою тензоалгометричного методу	37
Мусієнко М., Таран Н., Стороженко В., Бацманова Л., Грудіна Н., Світлова Н., Серга О. Фенотипування за біохімічними маркерами фізіологічної відповіді рослин для скринінгу сортів озимої пшениці	42
Федорук Р., Храбко М., Цап М., Денис Г., Тесарівська У. Регуляторний вплив наногерманію цитрату на вміст макро- і мікроелементів у тканинах вагітних самиць щурів F1	47
Халявка Т., Колосова О., Федорчук С. Ефективність психічної саморегуляції, емоційна стійкість і стрес-уразливість спортсменів-тенісистів за методикою вибору кольорів у зв'язку з функціональним станом нервово-м'язового апарату	51
Шелест Д., Павлюк О., Колотій О., Гарманчук Л. Вплив фоточутливого пептидоміметика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у культурі клітин L1210	55
Зай С., Мотузюк О. Білобров В., Вулицька Д., Ноздренко О. Вплив ВРС ₆₀ на швидко-силові параметри тетанічного скорочення <i>muscle soleus</i> алкоголізованих щурів за умови експериментально-індукованої ішемії різної тривалості	59
Балацький В., Мацевич Л., Півень О. Кардіоспецифічна делеція гена α -Е-катеніну призводить до порушення метаболізму ліпідів дорослого серця	65
Білюк А., Гарманчук Л., Скачкова О., Репіч Г., Орісик С. Протипухлинні, антиметастатичні та метаболічні ефекти новосинтезованих платинових комплексів	69

СОДЕРЖАНИЕ

Скачкова О., Антонюк С., Орел В., Храновская Н., Иномистова М. Влияние наночастиц оксида железа на жизнеспособность генерированных дендритных клеток человека	5
Бондаренко М., Бондаренко О., Кравченко В., Макачук М. Формирование произвольного внимания у мужчин и женщин при выполнении задач с высокой когнитивной нагрузкой	9
Дмитрик В., Раецкая Я. Биохимические показатели в сыворотке крови у крыс при щелочном ожоге пищевода II степени в условиях введения водного раствора сугото экстракта <i>P. vulgaris</i>	14
Калмыкова О., Пустовалов А., Варенюк И., Держинский Н. Эффект различных режимов введения мелатонина на развитие ожирения, индуцированного высококалорийной диетой	20
Гончаревский С., Макачук Н., Мартинюк В. Температура репрезентативных зон грудного отдела вегетативной нервной системы, как показатель функционального состояния организма человека	27
Заец В., Цуварев А., Коломиец Л., Корнелюк А. Бактериальная экспрессия рекомбинантного функционально активного N-концевого модуля тирозил-тРНК синтетазы <i>B. taurus</i>	33
Никитина Н., Береговой С., Степанова Л., Кабанов О. Определение оптимальной схемы введения Кокарнита крысам с диабетической полинейропатией с помощью тензоалгометрического метода	37
Мусиенко Н., Таран Н., Стороженко В., Бацманова Л., Грудина Н., Светлова Н., Серга Л. Фенотипирование по биохимическим маркерам физиологического ответа растений для скрининга сортов озимой пшеницы	42
Федорук Р., Храбко М., Цап М., Денис Г., Тесаривска У. Регуляторное влияние наногермания цитрата на содержание макро- и микроэлементов в тканях беременных самок крыс F1	47
Халявка Т., Колосова Е., Федорчук С. Эффективность психической саморегуляции, эмоциональная устойчивость и стресс-уязвимость спортсменов-теннисистов по методике выбора цветов в связи с функциональным состоянием нервно-мышечного аппарата	51
Шелест Д., Павлюк О., Колотий О., Гарманчук Л. Влияние фоточувствительного пептидомиметика на содержание продуктов перекисного окисления липидов в культуре клеток L1210	55
Зай С., Мотузюк О., Белобров В., Вулицька Д., Ноздренко О. Влияние ВРС ₆₀ на скоростно-силовые параметры тетанического сокращения <i>muscle soleus</i> алкоголизованных крыс при экспериментально-индуцированной ишемии различной продолжительности	59
Балацкий В., Мацевич Л., Пивень О. Кардиоспецифическая делеция гена α -Е-катенина вызывает нарушения метаболизма взрослого сердца	65
Билюк А., Гарманчук Л., Скачкова О., Репич Г., Орисик С. Противоопухолевые, антиметастатические и метаболические эффекты новосинтезированных платиновых комплексов	69

CONTENTS

Skachkova O., Antonuk S., Orel V., Khranovska N., Inomistova M. The influence of iron oxide nanoparticles on the viability of the generated human dendritic cells	5
Bondarenko M., Bondarenko O., Kravchenko V., Makarchuk M. Formation of attention in men and women during tasks performing with high cognitive load	9
Dmytryk V., Raetska Ya. Biochemical changes in blood serum of rats with experimental burn esophagus II degree under treatment with aqueous extract of pods <i>P. vulgaris</i>	14
Kalmukova O., Pustovalov A., Varenjuk I., Dzerzhynsky M. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats	20
Goncharevskyi S., Makarchyk M., Martynyuk V. Temperature of representative areas of the breast department of the vegetative nervous system, as the index of the functional state of the human birth organism	27
Zayets V., Tsuvariev O., Kolomiyets L., Kornelyuk A. Bacterial expression of the recombinant functionally active N-terminal module of the tyrosyl-tRNA synthetase <i>B. taurus</i>	33
Nikitina N., Beregovyi S., Stepanova L., Kabanov O. Definition of optimum scheme of Cocarnit injection for rats with polyneuropathy induced by diabetic by tenzoalogometric method	37
Musienko M., Taran N., Storozhenko V., Batsmanova L., Grudina N., Svetlova N., Serga O. Phenotyping with biochemical markers of physiological response of plants to screening of winter wheat varieties	42
Fedoruk R., Khrabko M., Tsap M., Denys H., Tesarivska U. Regulatory impact nanogermanium citrate content of macro and microelements in the tissues of pregnant female rats F1	47
Khalyavka T., Kolosova E., Fedorchuk S. Efficiency of psychic self-regulation, emotional stability and stress-vulnerability of athletes-tennis players by the method of choosing colors in connection with the functional state of the neuromuscular apparatus	51
Shelest D., Pavliuk O., Kolotiy O., Garmanchuk L. The effect photosensitive peptidomimetics on the content of products of lipid perception oxidation in cell culture	55
Zay S., Motuzyuk O., Belobrov V., Vulitska D., Nozdrenko O. Influence of C ₆₀ FAS the speed-power parameters of the tetanic contraction of <i>muscle soleus</i> alcoholised rats on the conditions of experimentally-induced ischemia at different durations	59
Balatsky V., Macewicz L., Piven O. Embryonic cardiospecific knockout of α - <i>E-catenin</i> gene leads to alteration of energy metabolism in adult heart	65
Biluk A., Garmanchuk L., Scachkova O., Repich H., Orysyk S. Antineoplastic, anti-metastatic and metabolic effects of newly intensitated platinum complex	69

УДК616-006.48-039.36-037-053.2:575.24

О. Скачкова, канд. біол. наук, С. Антонюк, наук. співроб., В. Орел, д-р біол. наук, проф.,
Н. Храновська, канд. біол. наук, старш. наук. співроб.
Національний інститут раку, Київ, Україна,
М. Іномістова, канд. біол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЗАЛІЗА НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ГЕНЕРОВАНИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

Метою роботи було дослідити властивості генерованих дендритних клітин (ДК) із моноцитів периферичної крові, навантажених наночастинками (НЧ) оксиду заліза. Результати цитологічних досліджень показали, що у генерованих ДК практично здорових людей та онкологічних хворих здатність поглинати НЧ заліза Fe_3O_4 не відрізняється. Установлено найоптимальнішу концентрацію НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 для навантаження ДК – 8×10^{-12} мг/мл. Показано, що НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 практично не впливають на життєздатність, рівень апоптозу та розподіл генерованих ДК по фазах клітинного циклу на 8-му добу культивування (час експозиції з НЧ – 24 години); збільшення терміну культивування ДК із НЧ до 9–10 діб (час експозиції з НЧ складає 48–72 години) призводить до збільшення кількості клітин у G₂/М-фазі клітинного циклу.

Ключові слова: імунотерапія, наночастинки оксиду заліза, поглинальна активність та життєздатність дендритних клітин

Вступ. Останнім часом велика увага приділяється медичним технологіям, які використовують матеріали з лінійними розмірами в декілька десятків нанометрів. На стику фундаментальних наук – фізики, хімії, біології, а також, онкології і нанотехнології – сформувався новий напрямок досліджень "Cancer nanotechnology", присвячений розробці методів молекулярної діагностики і терапії онкологічних захворювань. Припускається, що за допомогою нанотехнологій можуть бути вирішені проблеми ранньої діагностики злоякісних новоутворень, визначення їх локалізації, адресної доставки лікарських препаратів у пухлину, а також розроблені нові методи селективної (таргетної) терапії [1].

Сьогодні в біомедицині широко застосовують наночастинки (НЧ) оксиду заліза (II, III), що обумовлено їх низькою токсичністю і стабільністю магнітних характеристик [9]. Зокрема, магнітні НЧ вже застосовують для сортування клітин, розділення ДНК, у магнітній резонансній томографії (МРТ) і генній терапії [2, 3].

Використання магнітних НЧ із метою впливу на компоненти імунної системи може відкрити нові можливості у конструюванні протипухлинних вакцин. Одним із найперспективніших напрямків протипухлинної вакцинотерапії є використання антигенпрезентуючих дендритних клітин (ДК), генерованих та навантажених пухлинними антигенами *in vitro*. Відомо, що ДК відіграють визначальну роль у протипухлинному імунітеті, оскільки вони мають здатність активувати всі клітини, які належать до основних ефektorів протипухлинного імунітету, індукуючи як первинну, так і вторинну імунні відповіді та розвиваючи імунологічну пам'ять. Водночас ефективність такої терапії обмежена недостатньою міграційною активністю ДК до лімфоїдної тканини реципієнта. Великі надії пов'язують із можливістю підвищення цільової доставки вакцин на основі ДК до лімфоїдної тканини реципієнта за допомогою магнітних НЧ та дії постійного магнітного поля [4, 5, 6].

Після захоплення ДК НЧ можуть взаємодіяти із клітинними органелами, білками, нуклеїновими кислотами; можуть залучатися у процеси внутрішньоклітинної сигналізації, проліферації і потенційно можуть викликати порушення цих процесів [7]. Однак установлено, що не завжди поглинання клітиною НЧ веде до негативного впливу на клітинну проліферацію і синтез білка або спричиняє загибель клітин [8]. Їх вплив на життєздатність клітини залежить від концентрації і часу експозиції, а також обумовлений типом клітини.

Зазначимо, що на сьогодні немає вичерпної інформації про здатність ДК поглинати та накопичувати ме-

талеві НЧ. Також залишається відкритим питанням токсичності та безпечності НЧ оксиду заліза, зокрема, не досліджений їхній вплив на життєдіяльність та функції ДК. Ураховуючи це, метою роботи було дослідити поглинальну активність та функціональні властивості ДК, генерованих із моноцитів периферичної крові та навантажених НЧ оксиду заліза для оцінювання можливості їх використання у протипухлинній вакцинотерапії.

Матеріали та методи. Культуральні методи. ДК генерували з моноцитів периферичної крові 4 практично здорових людей та 5 хворих на злоякісні новоутворення (усі маніпуляції проводили з дотриманням правил асептики). Лейкоцити сепаративно розділяли у градієнті густини фіколу ($\rho = 1,077$ г/см³), після чого клітини ресуспендували в середовищі RPMI-1640 ("Sigma", США) із додаванням 2 мМ/л L-Gly, 100 мкг/мл стрептомицину та 100 од/мл пеніциліну та інкубували у пластиковому флаконі при температурі 37 °C, 5 % CO₂ протягом 2–3 годин. Після чого клітини злегка струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їхнього змивання. Концентрацію клітин доводили до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування та додавали 1 % аутологічної плазми та 100 нг/мл рекомбінантного гранулоцитомакрофагально-колонієстимулюючого фактора (ГМК-КСФ) людини ("Leucomax Novartis", Індія / "Schering-Plough", США, або "ICN", США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (IL-4), "Sigma", США. Ростові фактори також додавали до ДК на третю добу культивування. На шосту добу культивування додавали НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 (Sigma-Aldrich) із радіусом 50 нм в різних концентраціях (4×10^{-12} , 8×10^{-12} та 12×10^{-12} мкг/мл середовища). На сьому добу дозрівання до ДК додавали 100 нг/мл ЛПС ("Sigma", США) та 2αb-IFN ("Лаферобіон", "Біофарма", Україна) у концентрації 10 тис. МО/мл.

Перед використанням готували водний розчин НЧ із використанням дистильованої води. Концентрація НЧ становила 8×10^{-12} мкг/мл. Для навантаження ДК в культуральне середовище вносили 50, 100 та 150 мкл водного розчину відповідно.

Імунологічні методи. Імунологічні дослідження проводили на 8-му добу (контроль, час експозиції ДК із НЧ – 24 години), 9-ту добу (час експозиції ДК із НЧ – 48 годин) та 10-ту добу (час експозиції ДК із НЧ – 48 годин) культивування ДК.

Цитотоксичність НЧ оцінювали за збільшенням кількості девіталізованих ДК, для цього використовували флюорохром йодистий пропідій (PI). ДК у концентрації 2×10^5 /мл ресуспендували у 0,4 мл ЗФР та додавали

5 мкл PI (робоча концентрація 0,5 мкг/мл). Клітини інкубували 15 хв у темряві при кімнатній температурі, після чого відмивали у 2 мл ЗФР. Досліджувану популяцію клітин гейтували в координатах FSC (вісь абсцис) і SSC (вісь ординат), потім аналізували на наявність флуоресценції в координатах на основі DotPlot.

Рівень клітин, що перебувають в апоптозі та розподіл клітин за фазами клітинного циклу визначали за допомогою проточної цитометрії. Фарбування клітин за допомогою PI включало такі етапи: клітини в кількості 10^6 на пробу після однократного відмивання в 5 мл ЗФР при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1%-й цитрат натрію, 0,1%-й Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Усі реагенти фірми "SigmaChemicalCo", США). Для оцінювання часткового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу ($G_{1/0}$, S, $G_2 + M$) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh.

Аналіз зразків проводили на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США) за допомогою програми CellQuest-PRO ("Becton Dickinson", США).

Цитологічні методи. Цитологічні дослідження проводили на 8-му добу культивування ДК. Одним зі способів контролю проникнення НЧ у клітини є візуалізація НЧ оксиду заліза в генерованих ДК. Тож нами розроблено методику отримання цитологічних препаратів генерованих ДК та їх забарвлення за методом Ліллі (метод виявлення Fe^{2+} та Fe^{3+} за утворенням берлінської лазурі та турнбулевої сині) [9], що дає можливість візуалізувати здатність ДК поглинати НЧ заліза та оцінити локалізацію НЧ щодо внутрішньоклітинних структур та відсоток ДК, що поглинули НЧ заліза.

ДК культивували в 24-луночному планшеті на покритих скельцях протягом 8–10 діб, після чого фіксували у 4%-му розчині параформальдегіду протягом 4 хв. Після фіксації скельця два рази промивали фізіологічним розчином. На скельця наносили розчин феріціаніду калію (жовта кров'яна сіль) для визначення тривале-

ного заліза. Клітини інкубували протягом 40 хв–1 години, після чого скельця двічі промивали у 0,01 н. р. HCl. Промиті скельця дофарбовували квасцовим карміном протягом 5–10 хв. Двічі промивали у дистильованій воді. Для аналізу отриманих зразків використовували прямий мікроскоп PrimoStar, CarlZeiss (Німеччина) та програмне забезпечення AxioVision.

Статистичні методи. Одержані результати обробляли статистично з використанням t -критерія Стьюдента. Вірогідними вважали значення при рівнях $p \leq 0,05$. Закон нормального розподілу вибірок перевіряли за допомогою статистичного тесту Колмогорова – Смирнова.

Результати та обговорення. Відомо, що існує кілька можливих шляхів, за допомогою яких НЧ можуть долати природні клітинні бар'єри. Вони здатні проникати в клітину шляхом фагоцитозу, макропіноцитозу, ендоцитозу за участю клатрина (або клатрина і кавеол), а також за допомогою дифузії та інших механізмів, що запускаються електростатичними силами, вандерваальсовими або стеричними взаємодіями. Звичайно, ступінь ефективності захоплення НЧ залежить від типу клітин, зокрема, їх фагоцитарної здатності й типу НЧ [10]. Для ДК основними шляхами поглинання НЧ є ендоцитоз та піноцитоз. Відомо, що поглинальною активністю володіють лише незрілі ДК на ранніх стадіях диференціювання. У наших дослідженнях оцінювалась здатність ДК, генерованих із моноцитів периферичної крові, поглинати НЧ оксиду заліза.

Аналізом отриманих цитологічних препаратів установлено, що ДК забарвилися в насичено рожевий колір, а НЧ – у темно-синій (рис. 1 та рис. 2). Зазначимо, що у цитологічних препаратах НЧ спостерігались у вигляді відокремлених гранул, які локалізувались вільно по всій цитоплазмі ДК, ядра клітин не містили НЧ. Однак спостерігались і скупчення НЧ заліза з утворенням великих конгломератів у цитоплазмі клітин. Нами проведено серію експериментів для визначення найоптимальнішої концентрації НЧ заліза для навантаження ДК (рис. 1).

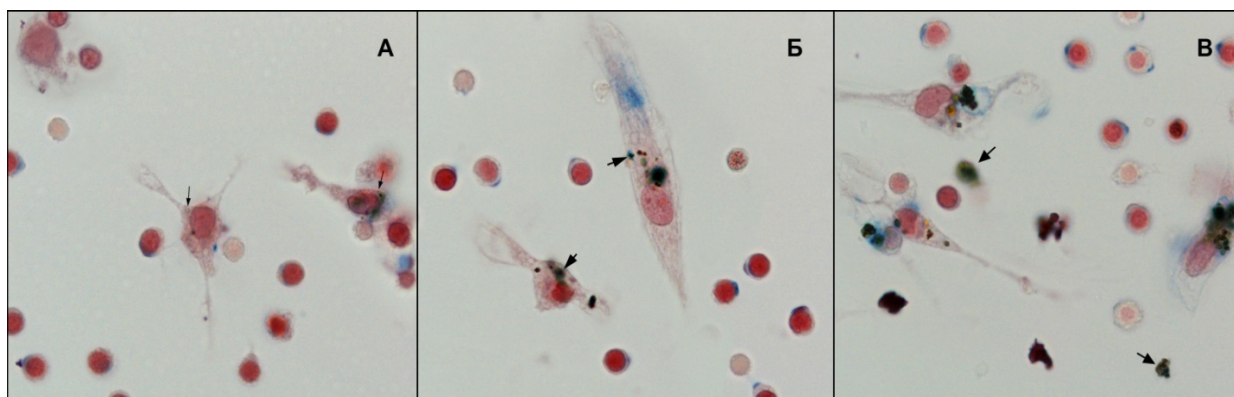


Рис. 1. Накопичення наночастинок заліза різних концентрацій у генерованих дендритних клітинах із моноцитів периферичної крові онкологічного хворого:

А – НЧ заліза в концентрації 4×10^{-6} ; Б – НЧ заліза в концентрації 8×10^{-6} ; В – НЧ заліза в концентрації 12×10^{-6} (забарвлення за адаптованим методом Ліллі. Стрілками вказано пофарбовані НЧ заліза)

Установлено, що при використанні НЧ заліза в найменшій концентрації 4×10^{-12} г/мл тільки 85 % генерованих ДК поглинули НЧ заліза (рис. 1А). При використанні НЧ у більш високих концентраціях 8×10^{-12} та 12×10^{-12} г/мл усі генеровані ДК поглинали НЧ (рис. 1Б, 1В). Однак, при застосуванні НЧ у найбільшій концентрації 12×10^{-12} г/мл спостерігались окремі НЧ, які не були захоплені ДК і вони залишилися в поживному середовищі (рис. 1В). Також при використанні цієї концентрації НЧ, спостерігалось утворення великих конгломератів НЧ

заліза в цитоплазмі генерованих ДК. Тож нами встановлено, що найбільш оптимальна концентрація НЧ заліза для навантаження генерованих ДК є 8×10^{-12} г/мл.

У попередніх дослідженнях нами встановлено, що в онкологічних хворих функціональна активність ДК, отриманих із попередників, як правило, знижена, зокрема, вони часто нечутливі до багатьох активуючих стимулів. Проти пухлини хіміо- та променева терапія також можуть бути причиною зниження ефективності утворення та гальмування дозрівання ДК, що може лі-

мітувати й ускладнювати їхнє застосування [11]. Тому нашим наступним завданням було провести порівняльний аналіз поглинальної активності ДК, що генеровані з моноцитів периферичної крові онкологічних хворих та

практично здорових людей. Результати цитологічних досліджень показали, що поглинальна здатність ДК, генерованих із моноцитів практично здорових людей та онкологічних хворих не розрізняється (див. рис.1 В,Г).

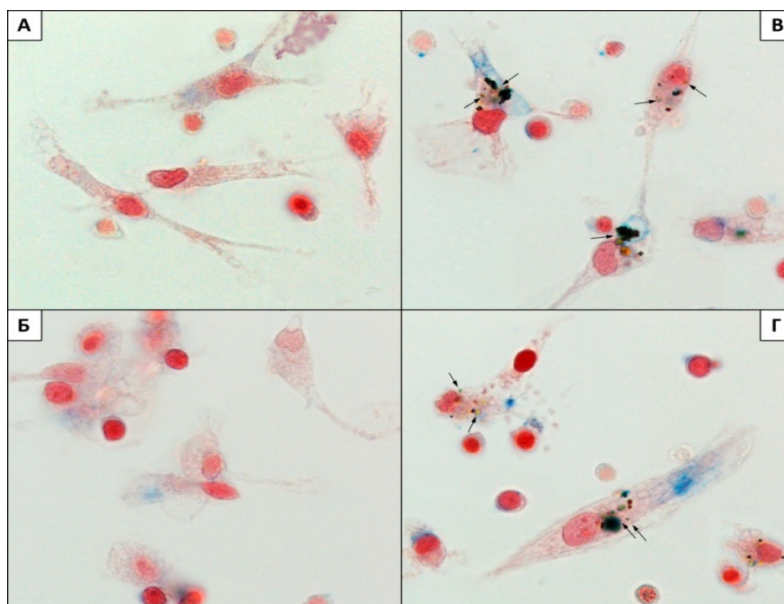


Рис. 2. Накопичення наночастинок заліза в генерованих дендритних клітинах із моноцитів периферичної крові практично здорової людини: А – контроль; В – із НЧ заліза та онкологічного хворого; Б – контроль, Г – із НЧ заліза (забарвлення за адаптованим методом Ліллі. Стрілками вказано пофарбовані НЧ заліза)

Добре відомо, що НЧ і нанопорошки металів характеризуються високою реакційною здатністю і каталітичною активністю. При цьому такого роду наноферромагнетика мають власну токсичність для клітин, тканин і компонентів біологічних рідин, обумовлену їх участю у вільнорадикальних процесах [12]. Тож наступним завданням було дослідити цитотоксичний вплив НЧ заліза на генеровані ДК.

Нами встановлено, що НЧ заліза в концентрації 8×10^{-12} мг/мл мають незначний цитотоксичний вплив на генеровані ДК, який зростає при збільшенні тривалості культивування. Так, установлено, що в контролі (ДК

на 8-му добу культивування) кількість девіталізованих клітин майже не відрізнялась від ДК, навантажених НЧ, та становила $12,60 \pm 2,42$ % проти $16,80 \pm 5,4$ %. Утім, при збільшенні часу культивування ми спостерігали збільшення девіталізованих ДК у 1,8 та 2,08 раза на 9-ту та 10-ту добу культивування відносно контролю відповідно. Однак, ці відмінності були статистично не достовірні. Також відмітимо, що рівень апоптозу залишався майже незмінним на всіх етапах спостереження. Тож нами встановлено, що НЧ заліза в концентрації 8×10^{-12} мг/мл не впливають на рівень апоптозу в генерованих ДК (рис. 2).

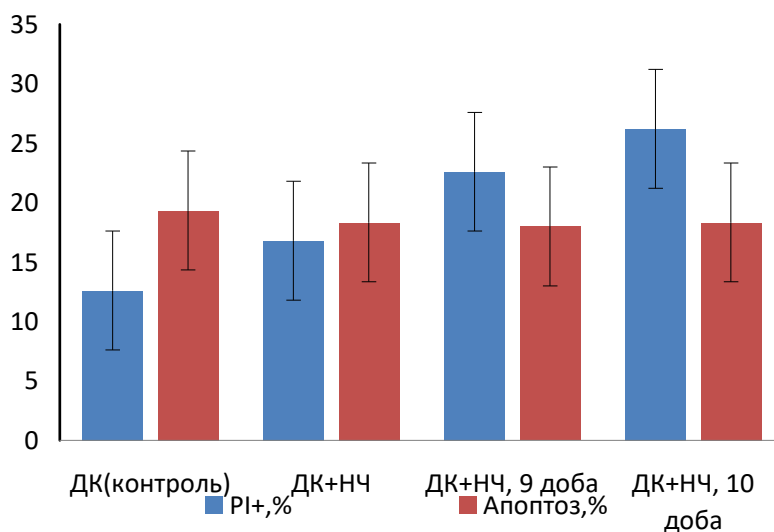


Рис. 3. Кількість девіталізованих та апоптотичних генерованих ДК у культурі

Багато дослідників стверджують, що НЧ під час потрапляння в організм здатні пошкоджувати біомембрани, впливати на функції біомолекул, у тому числі й молекул генетичного апарату клітини і клітинних органел (мітохондрій), що призводить до порушення регуляторних процесів і загибелі клітини. Механізм впливу нанооб'є-

ктів на живі структури пов'язаний з утворенням за їх присутності вільних радикалів, у тому числі перідратів, а також із виникненням комплексів із нуклеїновими кислотами. Тож наступним етапом нашого дослідження було дослідити зміни у клітинному циклі генерованих ДК під впливом НЧ заліза (табл. 1).

Таблиця 1. Зміни в розподілі генерованих ДК за фазами клітинного циклу під впливом НЧ оксиду заліза Fe_3O_4

№	Назва групи	Фази клітинного циклу, %		
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
1	ДК (контроль) (8-ма доба) (n=6)	87,99 ± 0,95	8,54 ± 0,42	3,47 ± 1,37
2	ДК+НЧ (8-ма доба) (n=6)	88,38 ± 0,12	8,64 ± 0,69	2,98 ± 0,80
3	ДК+НЧ, 9-та доба (n=6)	76,17 ± 0,52*	22,62 ± 0,59* ⁰	1,2 ± 0,11
4	ДК+НЧ, 10-та доба (n=6)	76,83 ± 0,75*	22,66 ± 0,73* ⁰	0,51 ± 0,04

Примітки. * – $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою;
⁰ – $p \leq 0,05$ порівняно з групою ДК+НЧ.

Нами встановлено, що на 8-му добу (час експозиції із НЧ – 24 години) культивування НЧ оксиду заліза не мали впливу на розподіл за фазами клітинного циклу генерованих ДК. Усі показники зберігались на рівні контрольних значень. Збільшення терміну культивування ДК із НЧ до 9–10 діб (час експозиції із НЧ становив 48–72 години) призводить до збільшення кількості клітин у G₂/M-фазі клітинного циклу. Можливо, НЧ заліза впливають на здатність ДК проходити весь мітотичний цикл, а, отже, і на його завершення, за рахунок арешту клітин у G₂/M-фазі клітинного циклу. Відомо, що G₂/M-фаза є однією з контрольних точок проходження клітинного циклу, на якій контролюється повнота реплікації ДНК, і зміни в цій точці можуть призвести до порушень проходження повноцінного клітинного циклу. Однак, отримані результати потребують подальшого детальнішого та якіснішого аналізу змін у генетичному апараті генерованих ДК.

Отже, нами була показана потенційна можливість застосування НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 при конструюванні протипухлинних вакцин на основі ДК для подальшого їх застосування при проведенні імунотерапії в онкологічних хворих. Показано, що НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 практично не впливають на життєздатність та рівень апоптозу у генерованих ДК, однак, питання застосування НЧ, як компонента протипухлинної вакцини залишається відкритим. Наше дослідження дає методичну основу для подальших досліджень вивчення ефективного та безпечного застосування НЧ металів при створенні нових клітинних технологій в онкологічній практиці.

Висновки. 1. Установлено, що найоптимальніша концентрація НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 для навантаження генерованих ДК є 8×10^{-12} мг/мл.

2. Результати цитологічних досліджень показали, що немає значної різниці у здатності поглинати НЧ заліза Fe_3O_4 у генерованих ДК практично здорових людей та онкологічних хворих.

3. Установлено, що НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 мають незначний цитотоксичний вплив на генеровані ДК, який спостерігається при збільшенні тривалості культивування.

4. Доведено, що НЧ оксиду заліза Fe_3O_4 не впливають на рівень апоптозу в генерованих ДК протягом усього часу культивування.

5. Збільшення терміну культивування ДК із НЧ до 9–10 діб призводить до статистично достовірного збільшення кількості клітин у G₂/M-фазі клітинного циклу, $p \leq 0,05$.

Список використаних джерел:

1. Nanotechnology Applications in Cancer / S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, J. W. Simons // Annu. Rev. Biomed. Eng. – 2007. – Vol. 9. – P. 257–288.
2. Carbohydrate-based nanogels as drug and gene delivery systems / S. Uthaman, S. Maya et. al. // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2014. – Vol. 14(1). – P. 694–704.
3. Estelrich J. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents / J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, M. A. Busquets // Int J. Nanomedicine. – 2015. – Vol. 10. – P. 1727–1741.
4. Дослідження механізмів протипухлинного ефекту технології магнітної нанотерапії на моделі культур клітин злоякісних пухлин людини різного тканинного генезу / В. Е. Орел, Н. О. Безденежних, О. О. Лихова та ін. // Клиническая онкология. – 2014. – № 2(14). – С. 58–61.
5. Magnetic enrichment of dendritic cell vaccine in lymph node with fluorescent-magnetic nanoparticles enhanced cancer immunotherapy / H. Jin, Y. Qian, Y. Dai et al. // Theranostics. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 2000–2014.
6. Fan Y. Nanoparticle Drug Delivery Systems Designed to Improve Cancer Vaccines and Immunotherapy / Y. Fan, J. J. Moon // Vaccines. – 2015. – Vol. 3. – P. 662–685.
7. Lewinski N. Cytotoxicity of nanoparticles / N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek // Small. – 2008. – Vol. 4(1). – P. 26–49.
8. Chaoliang T. Synthesis and applications of graphene based noble metal nanostructures / T. Chaoliang, H. Xiao, Z. Hua // Materials Today. – 2013. – Vol. 16, № 1/2. – P. 29–36.
9. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – С. 377–378.
10. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses / C. Mühlfeld, B. Rothen-Rutishauser, F. Blank et al. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2008. – Vol. 294(5). – P. 817–829.
11. Фенотипові та функціональні властивості диференційованих дендритних клітин у хворих на рак легень / Н. М. Храновська, О. В. Скачкова, В. М. Совенко та ін. // Клітинна та органна трансплантологія. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 156–161.
12. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent / S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker et al. // Part. Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 7, № 22. – P. 1–17.

References:

1. Nie S., Xing Y., Kim G. J., Simons J. Nanotechnology Applications in Cancer. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2007; 9: 257–288. doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152025.
2. Uthaman S., Maya S., Jayakumar R., Cho C., Park I. Carbohydrate-based nanogels as drug and gene delivery systems. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2014; 14(1):694–704. doi: 10.1166/jnn.2014.8904.
3. Estelrich J., Sánchez-Martín M., Busquets M. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. Int J Nanomedicine. 2015; 10: P. 1727–1741. doi: 10.2147/IJN.S76501.
4. Орел В., Безденежних Н., Лихова О., Ніколов Н., Орел І., Романов А., Кудрявцев Я., Шчепотін І. Дослідження механізмів протипухлинного ефекту технології магнітної нанотерапії на моделі культур клітин злоякісних пухлин людського різного тканинного генезу. Клиническая онкология. 2014; 2(14): 58–61. [In Ukraine].
5. Jin H., Qian Y., Dai Y., Qiao S., Huang C., Lu L., Luo Q., Chen J., Zhang Z. Magnetic Enrichment of Dendritic Cell Vaccine in Lymph Node with Fluorescent-Magnetic Nanoparticles Enhanced Cancer Immunotherapy. Theranostics. 2016; 2(6(11)):2000–2014. eCollection 2016.

6. Fan Y., Moon. J. Nanoparticle drug delivery systems designed to improve cancer vaccines and immunotherapy. *Vaccines*. 2015; 3:662-685. doi:10.3390/vaccines3030662.
7. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008; 4(1): 26-49. doi: 10.1002/sml.200700595.
8. Chaoliang T., Xiao H., Hua Z. Synthesis and applications of graphene based noble metal nanostructures. *Materials Today*. 2013; 16(1-2): 29-36. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.01.021.
9. Lilli R. Patogistologicheskaja tehnika i prakticheskaja gistohimija. M.: Mir, 1969:377-378.
10. Mühlfeld C., Rothen-Rutishauser B., Blank F., Vanhecke D., Ochs M., Gehr P. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures

and cellular responses. *Am J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2008; 294(5): 817-829. doi:10.1152/ajplung.00442.2007.

11. Khranovska N., Skachkova O., Sovenko V., Sydor P., Inomistova M., Melnyk V. Phenotypic and functional properties of generated dendritic cells in lung cancer patients. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4(2):C. 156-161. doi:10.22494/cot.v4i2.63.

12. Sohaebuddin S., Thevenot P., Baker D., Eaton J., Tang L. Nano-material cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.* 2010; 7(22): 1-17. doi.org/10.1186/1743-8977-7-22.

Надійшла до редколегії 16.10.17

О. Скачкова, канд. биол. наук, С. Антонюк, науч. сотр., В. Орел, д-р биол. наук, проф.,

Н. Храновская, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Национальный институт рака, Киев, Украина,

М. Иномистова, канд. биол. наук

УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ГЕНЕРИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Целью исследования было изучить свойства генерированных дендритных клеток (ДК) из моноцитов периферической крови, нагруженных наночастицами (НЧ) оксида железа. Результаты цитологических исследований показали, что в генерируемых ДК практически здоровых людей и онкологических больных способность поглощать НЧ железа Fe_3O_4 не отличается. Установлена наиболее оптимальная концентрация НЧ оксида железа Fe_3O_4 для нагрузки ДК – 8×10^{-12} мг/мл. Показано, что НЧ оксида железа Fe_3O_4 практически не влияют на жизнеспособность, уровень апоптоза и распределение генерированных ДК по фазам клеточного цикла на 8-е сутки культивирования (время экспозиции с НЧ – 24 часа); увеличение срока культивирования ДК с НЧ до 9-10 суток (время экспозиции с НЧ – 48-72 часа) приводит к увеличению количества клеток в G2/M-фазе клеточного цикла.

Ключевые слова: иммунотерапия, дендритные клетки, наночастицы оксида железа, поглощающая активность и жизнеспособность дендритных клеток.

O. Skachkova, PhD., S. Antonuk, researcher, V. Orel, DSc, N. Khranovska, PhD

Ukrainian National Cancer Center, Kyiv, Ukraine,

M. Inomistova, PhD

ESC "Institute of Biology and medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE INFLUENCE OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ON THE VIABILITY OF THE GENERATED HUMAN DENDRITIC CELLS

The aim of the study was to investigate the properties of generated dendritic cells (DC) from monocytes of peripheral blood loaded with nanoparticles (NP) of iron oxide. The results of cytological studies showed that the ability to absorb Fe_3O_4 iron NP in generated DCs of healthy donors and cancer patients did not differ. It was established that the most optimal concentration of Fe_3O_4 iron oxide NPs for loading of DCs was 8×10^{-12} mg/ml. It was shown that Fe_3O_4 iron oxide NPs practically does not affect viability, apoptosis and distribution of generated DCs along the phases of the cell cycle on the 8th day of cultivation (exposure time with the NP – 24 hours). Increase of the DC cultivation period with the NPs to 9-10 days (exposure time from the NP – 48-72 hours) leads to the increase in the number of cells in the G2/M phase of the cell cycle.

Key words: immunotherapy, dendritic cells, iron oxide nanoparticles, phagocytic activity and viability of dendritic cells.

УДК 612.82/83; 612.821

М. Бондаренко, канд. біол. наук, О. Бондаренко, канд. біол. наук,

В. Кравченко, канд. біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ФОРМУВАННЯ ДОВІЛЬНОЇ УВАГИ У ЧОЛОВІКІВ ТА ЖІНОК ПРИ ВИКОНАННІ ЗАВДАНЬ ІЗ ВИСОКИМ КОГНІТИВНИМ НАВАНТАЖЕННЯМ

Досліджували статеві відмінності в мозкових механізмах, що лежать в основі перемикання між мимовільною та довільною увагою. У 20 чоловіків та 20 жінок порівнювали час реакції, кількість помилок та електричну активність головного мозку під час виконання емоційного Струп-тесту на фоні візуального контенту, що містить афективні зображення за умови презентації стимулів через домінуюче око та через недомінуюче. У зазначених умовах створювалась модель значного когнітивного навантаження, коли складно правильно реагувати на пріоритетні характеристики стимулу. Виявлено залежні від статі патерни мозкової активності: у жінок тестові завдання посилюють спектральну потужність у тета-діапазоні переважно лівої півкулі, тоді як у чоловіків за таких умов знижується потужність альфа-ритму в тім'яно-потиличний асоціативній корі з локальним підвищенням тета-ритму в задньолобових ділянках та бета-ритму в лівій префронтальній зоні. За високого когнітивного навантаження, створеного відволікаючим візуальним змістом та подачею зорових стимулів через недомінуюче око, мозкові механізми довільної уваги забезпечують більш ретельний аналіз релевантних стимулів у жінок порівняно з чоловіками, що виявляється в наданні точніших відповідей за довший період часу.

Ключові слова: увага, емоційний Струп-тест, IAPS, EEG, недомінуюче око, статеві відмінності.

Вступ. Увага є однією з базових когнітивних функцій головного мозку, що дозволяє вибірково зосередитись на сприйнятті одних об'єктів при ігноруванні інших. З'ясування механізмів, що лежать в основі перемикання між мимовільною та довільною увагою, є вкрай важливим завданням психофізіології, оскільки сучасні реалії вказують на подальше збільшення інформаційного потоку, в

якому утримувати фокус стає все більшим викликом для людини, що часто призводить до неправильних рішень. Стандартною моделлю для вивчення взаємодії автоматичних та контрольованих процесів перемикання уваги є парадигма Струп-тесту [Stroop, 1935], у рамках якої обстежувані стикаються з так званими "конфліктними" завданнями, коли вони мають звертати увагу на певний

параметр стимулу й ігнорувати інший, так, у класичному варіанті цього завдання значення слова виступає у пріоритеті перед кольором його написання.

У попередніх працях ми досліджували мозкову активність під час виконання складних конфліктних завдань, коли потреба реагувати винятково на колір шрифту вступала в конфлікт з емоційним сенсом використаних слів та фоновими зображеннями з бази International Affective picture system (IAPS), що також апелюють до автоматичної емоційної реакції. Було показано, що такі завдання виконуються важче при використанні недомінантного зорового каналу, що збільшує когнітивне навантаження на залучені в цей вид активності мозкові структури [1].

Метою цього дослідження було з'ясувати, чи існують якісь статевоспецифічні патерни реагування на описані вище завдання. На сьогодні добре відомо, що завдяки організуючим ефектам статевих гормонів розвивається статевий диморфізм головного мозку, на базі якого під впливом циркулюючих статевих гормонів формується функціональний статевий диєргізм, який у свою чергу зумовлює характерну для чоловічої чи жіночої статей поведінку та статовоспецифічний перебіг основних психічних процесів [8]. Накопичено велику кількість досліджень, в яких описано вибіркові переваги в різних завданнях, що потребують ефективного розподілу уваги, у представників різної статі, див. огляд [13]. Отримані результати різних авторів досить суперечливі, хоча в цілому дозволяють припустити, що чоловіки краще виконують завдання на уважність у тих тестах, які потребують просторових операцій, тоді як жінки частіше показують перевагу в утримванні уваги в тестах із вербальними стимулами. При цьому вплив домінантності зорового каналу на статеві відмінності не досліджувалася у відомих нам роботах. З огляду на це, нашим завданням було виявити можливі відмінності у представників різної статі щодо здатності утримувати увагу за умов висококогнітивного навантаження, створеного емоційно забарвленим візуальним фоном, семантичним значенням використаних слів та недомінантним каналом сприйняття зорової інформації

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь 40 обстежуваних (праворуких студентів із правим домінантним оком) обох статей (20 жінок та 20 чоловіків), віком від 19 до 22 років. Домінантне око та ведучу руку кожного обстежуваного визначали відповідно до профілю міжпівкульної асиметрії [3]. Сформовано дві групи по 20 осіб, яким презентували тестові завдання через домінантне око (перша група) та через недомінантне око (друга група). У кожній групі було по 10 представників різної статі.

Обстежувані обох груп проходили емоційний Струп-тест (ТЕ), що складався з емоційно забарвлених (наприклад: зрада, труна) та нейтральних слів (наприклад: чашка, жакет). При цьому всі слова складались із 5 літер. Завдання обстежуваних було таке: при появі на моніторі комп'ютера натискати клавішу Р правою рукою, у разі якщо слово було написано червоним кольором, та натискати клавішу Q лівою рукою, якщо слово написано зеленим кольором. Тестові слова з'являлись на фоні афективних зображень із міжнародної бази IAPS [6], які належали до різних категорій за здатністю викликати ті чи інші емоції: Т1 – приємні; Т2 – еротичні; Т3 – нейтральні; Т4 – неприємні. Кожному з чотирьох етапів тестів передував стан спокою, коли обстежувані не виконували жодних завдань і розслаблено сиділи в кріслі.

У всіх обстежуваних реєстрували електроенцефалограму (ЕЕГ) за такою схемою: стан спокою (СП 1) –

2 хв, під час виконання Т1 – 2 хв, стан спокою (СП 2) – 2 хв, під час виконання Т2 – 2 хв, стан спокою (СП 3) – 2 хв, під час виконання Т3 – 2 хв, стан спокою (СП 4) – 2 хв, під час виконання Т4 – 2 хв.

Під час проходження тестів обох етапів дослідження у всіх обстежуваних реєстрували латентні періоди (ЛП) сенсомоторних реакцій (середній, для правої та лівої рук, окремо для різних типів стимулів – нейтральних, емоційно забарвлених слів) та кількість помилкових реакцій у кожному тесті.

Обладнання та частотні діапазони аналізу ЕЕГ.

Реєстрацію біоелектричної активності мозку обстежуваних здійснювали за допомогою діагностичного комплексу "Нейрон-Спектр" (ТОВ "Нейрософт", Росія). ЕЕГ реєстрували монополярно, як референтний використовувався іпсілатеральний вушний електрод. Електроди розміщували за міжнародною системою 10–20 % у 16 симетричних точках поверхні голови: передньолобовових (Fp1/Fp2), середньолобовових (F3/F4), бічнолобовових (F7/F8), центральних (C3/C4), передніх (T3/T4) та задніх скроневих (T5/T6), тім'яних (P3/P4) та потиличних (O1/O2). Для аналізу ЕЕГ-показників використовували лише безартефактні фрагменти запису. За допомогою програмного забезпечення "Нейрон Спектр" на основі алгоритму швидкого перетворення Фур'є обчислювали спектральну потужність (СП) для таких частотних діапазонів: тета (4,0–7,9 Гц), альфа (8,0–12,9 Гц), бета-низькочастотний (13,0–19,9 Гц), бета-високочастотний (20,0–35,0 Гц). Епоха аналізу становила 2,56 с, епоха перекриття 1,28 с, смуга пропускання від 1 до 35 Гц.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету комп'ютерних програм STATISTICA 8.0 (Statsoft, USA, 2004). Оскільки розподіли більшості показників, отриманих у дослідженнях, за критерієм Лілліфора були відмінними від нормального, то при порівнянні залежних вибірок застосовували непараметричний Т-критерій знакових рангів Вілкоксона, а при порівнянні незалежних – Мана-Уїтні. Критичний рівень значущості міжгрупових відмінностей при перевірці статистичної гіпотези приймався рівним $p=0,05$. Для опису вибіркового розподілу вказували медіани та міжквартильний розкид (Me [25 %; 75 %]).

Результати та їх обговорення. Статистичний аналіз не виявив значущих статевих відмінностей у результатах виконання емоційного Струп-тесту при презентації стимулів через домінантний зоровий канал (рис. 1), натомість показано, що при сприйнятті інформації недомінантним оком час реакції у жінок був довшим, ніж у чоловіків. У наших попередніх дослідженнях [2; 1] показано, що сприйняття інформації різного рівня складності домінантним оком не впливає на точність виконання конфліктних завдань, тоді як ефективність виконання таких завдань суттєво погіршується за умови сприйняття інформації недомінантним оком. Оскільки за нормально-бінокулярного сприйняття проекції від домінантного ока до кіркових та підкіркових зорових центрів складають переважну частину, більша частка зорової інформації обробляється від ведучого ока. За умов його "виключення", як це було зроблено у другій експериментальній групі, мозкові структури, залучені в аналіз зорової інформації, працюють у незвичному режимі, що створює додаткове когнітивне навантаження. Нетипова сенсорна стимуляція утруднює фільтрацію нерелевантних сигналів, якими в цьому випадку є емоційні компоненти фонових зображень та семантичного значення слів у тесті.

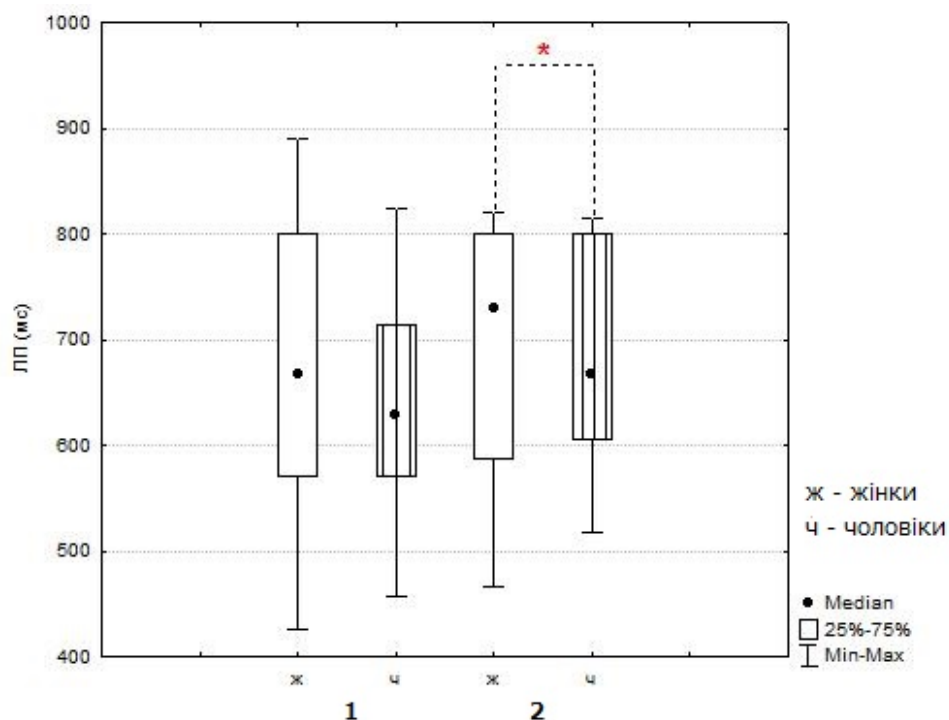


Рис. 1. Латентні періоди реакції жінок та чоловіків в емоційному Струп-тесті на фоні різних зображень IAPS (медіана та квартилі 25 % і 75 %), $n=40$

Примітки. * – $p < 0,05$;

група 1 виконувала завдання з відкритим домінуючим оком;

група 2 виконувала завдання з відкритим недомінуючим оком.

Описані далі відмінності зареєстровано за умови перегляду недомінуючим оком, що є нетиповим викликом для зорової системи і збільшує загальний рівень когнітивного навантаження та активації мозку порівняно з бінокулярними чи домінуючими презентаціями [2].

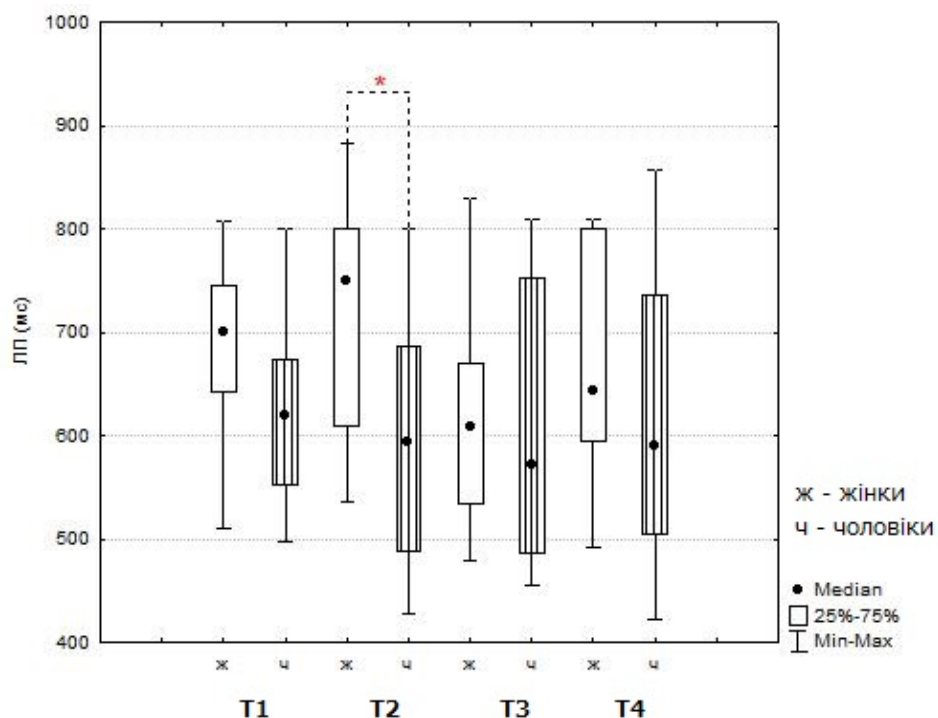


Рис. 2. Латентні періоди реакції жінок та чоловіків в емоційному Струп-тесті на фоні різних категорій зображень IAPS (медіана та квартилі 25 % і 75 %), $n = 20$ (треба вказати кількість чоловіків і жінок)

Примітки. * – $p < 0,05$; T1 – позитивні зображення IAPS; T2 – еротичні зображення IAPS; T3 – нейтральні зображення IAPS; T4 – негативні зображення IAPS.

Як видно з рис. 2, час реагування на слова, що були показані на фоні афективних зображень різного типу загалом довший у жінок. Проте статистично значуща різниця виявлена тільки для тих стимулів, що презентувались на фоні еротичних зображень. Так, латентні періоди реакції у жінок достовірно довші, ніж у чоловіків в емоційному Струп-тесті на фоні еротичних зображень IAPS.

При порівнянні точності наданих відповідей виявилося, що при виконанні завдання з відкритим доміантним оком відсутня різниця в кількості помилок між чоловіками та жінками, тоді як при проходженні тесту з відкритим недоміантним оком така різниця є. Чоловіки допускають достовірно більшу (7) кількість помилок [5; 8], ніж жінки (5) [3; 5] на фоні еротичних зображень при сприйнятті недоміантним оком. Таким чином можна припустити, що мозкові системи забезпечення достатньої уваги у жінок вирішують конфлікти інтересів різних вхідних сигналів на користь більшого часу обробки ін-

формації, проте з більшою точністю. Чоловіки ж виконують завдання швидше, але з більшою кількістю помилок. Згідно з даними літератури, жінки різних вікових груп менш схильні до інтерференції при виконанні Струп-тесту [15], хоча в цьому дослідженні вивчали найпростішу версію даного виду завдань. У нашому випадку використовували набагато більш виснажливе завдання для утримання фокусу уваги на найменш ресурсному порівняно з іншими параметрами стимулу – кольорі. Очевидно, що чоловіки та жінки використовують різні стратегії виконання такого роду конфліктних завдань. На користь цього свідчать отримані дані енцефалографії. Як видно з рис. 3А у жінок при виконанні емоційного Струп-тесту на фоні еротичних фото збільшувалася спектральна потужність у тета-діапазоні ЕЕГ у фронтальних, центральних та тім'яних зонах обох півкуль та латерофронтальному і скроневих відведеннях лівої півкулі порівняно з попереднім станом спокою.

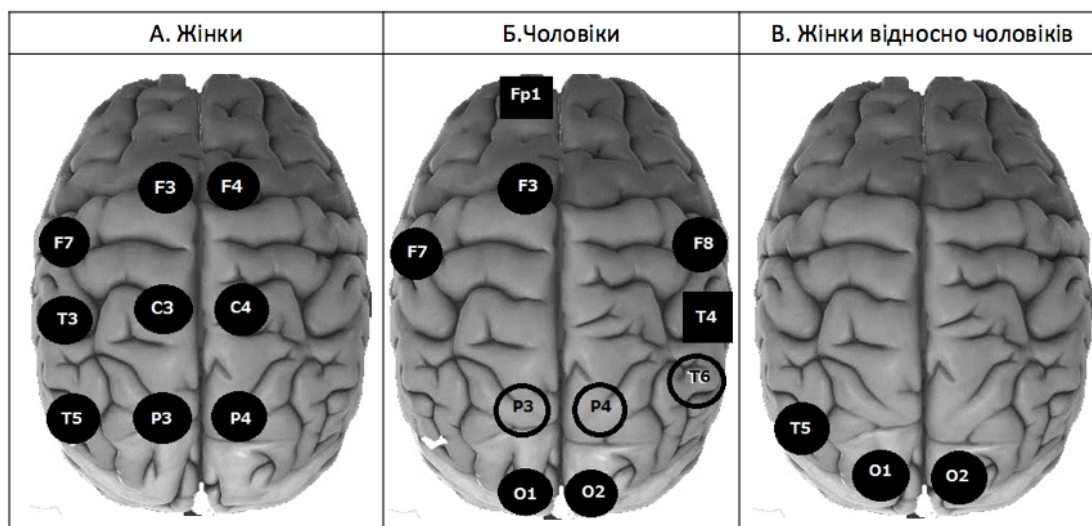


Рис 3. Топокарти значущих змін спектральної потужності основних ритмів ЕЕГ за умови сприйняття недоміантним оком під час виконання емоційного Струп-тесту на фоні еротичних зображень IAPS відносно стану спокою, $n=20$ (зафарбоване коло – збільшення СП в θ -діапазоні, незафарбоване коло – зменшення СП в α -діапазоні, зафарбований квадрат – збільшення СП в β -низькочастотному та β -високочастотному діапазонах)

У чоловіків у цих самих умовах (рис. 3Б) спостерігаємо збільшення СП в тета-діапазоні ЕЕГ у потиличних та лобових бічних зонах обох півкуль, лівій лобовій зоні. Збільшення СП в бета-низькочастотному діапазоні відбувалося в лівій передлобовій зоні, а в бета-високочастотному діапазоні – у правій передній скроневій зоні. Зменшення спектральної потужності альфа-ритму можна побачити в тім'яних зонах обох півкуль, а також у задній скроневій зоні правої півкулі.

При порівнянні даних жінок під час проходження тесту відносно даних чоловіків (рис. 3В) виявлено достовірно більший показник спектральної потужності тета-хвиль в обох потиличних відведеннях, а також у лівому задньому скроневому відведенні. Абсолютні значення вказують на те, що жінки мали початково більший показник СП в тета-діапазоні 28 [24; 31] під час стану спокою, що передувало завданню на фоні еротичних зображень, ніж чоловіки 16 [12; 25]. Оскільки з рис. 3А видно, що значення СП тета-ритму не змінюються в потиличних зонах під час тесту відносно стану спокою, навіть статистично значуще підвищення СП тета-ритму у чоловіків під час тесту 19 [16; 21] не перевищило значення жінок у Т2, тому при порівнянні ми бачимо більші значення СП тета-ритму у скроневих зонах.

Інтерпретуючи отримані результати електричної активності головного мозку при виконанні емоційного Струп-тесту на фоні еротичних зображень, передусім треба наголосити на тому, що за даними літератури перегляд таких зображень виявляє більшу активацію мозку чоловіків порівняно з жінками. Так, згідно з даними дослідження [9] еротичні стимули активували потилично-тім'яно-центральної зони мозку чоловіків (депресія альфа- та низькочастотного бета-діапазону та зростання СП високочастотного бета-діапазону), що відображає обробку в екстрастріарній зоровій корі на фоні потужної неспецифічної активації. У цій же роботі показано, що еротичні картини IAPS викликають найбільшу перебудову ритміки ЕЕГ чоловіків, поступаючись незначно лише зображенням із негативними сенсами. Для жінок перегляд еротичних зображень оцінювався як менш приємний, порівняно з картинками, що викликають позитивні емоції, тоді як у чоловіків за шкалою приємності еротичні зображення стояли на першому місці. Усе це свідчить про потужну активацію емоційних зон мозку, які традиційно мають пріоритет при розподілі ресурсів уваги.

Характерним є те, що у жінок під час виконання завдання чітко видно лівопівкульний профіль активності мозку, і зокрема видно збільшення СП тета-ритму в

зонах, пов'язаних із лексичним і семантичним аналізами (visual wordform area), що відповідають лівим потилично-скроневим асоціативним ділянкам. Зважаючи на те, що збільшення тета-ритму відображує гіпокампально-неокортикальні взаємодії, пов'язані з операціями в робочій пам'яті [11; 4], можемо припустити, що саме ці процеси відбувались у мозку жінок. Велика зона мозку, в якій зареєстровані тета-коливання вказує на процеси синхронізації віддалених груп нейронів, об'єднаних для виконання складного мультимодального завдання з мовними стимулами.

При аналізі електричної активності в мозку чоловіків можна бачити менш специфічні патерни, що відображують активацію екстрастріарної кори (зниження СП альфа-ритму), і більш локальні зміни в тета-діапазоні в зонах, не пов'язаних із семантичним аналізом. При цьому бачимо точкове зростання СП в бета-діапазоні у лівій передлобовій ділянці, яка виконує основну роль у процесі утримання довільної уваги. Такі зміни часто пов'язують із залученням мереж гальмівних нейронів, що сприяє виконанню функції центрального адміністратора в парадигмі ролі префронтального кортекса в системі робочої пам'яті [12]. Проте, як видно із результатів порівняння точності виконання завдання, зазначені механізми не можуть ефективно протидіяти збуджуючому впливу фонового еротичного контенту, що відображується в більшій швидкості та помилковості реакцій у чоловіків порівняно з обстежуваними жінками.

Зазначимо, що в цій роботі не враховано фази менструального циклу, в якому перебували обстежувані жінки, що може позначитись на отриманих результатах. На сьогодні описано чимало робіт, в яких результати виконання різних завдань для оцінювання когнітивних функцій мозку, відрізняються в одних і тих самих жінок, що його виконують у різних фазах оваріального циклу [10]. Хоча у вказаній роботі було показано, що жінки найкраще виконували Струп-тест, перебуваючи у ранньофолікулярній фазі, яка відома мінімальними рівнем естрогену та прогестерону, тобто в цій фазу жінки зазвичай демонструють найбільш подібні до чоловіків результати. Можна припустити, що сповільнення реакції жінок під час овуляції якраз зумовлено збільшенням вмісту ГАМК у префронтальній корі в цей період [7], що не позначиться на точності, а тільки на швидкості відповідей. Тому, виявивши загальну тенденцію у відмінностях концентрації уваги між чоловіками і жінками, ми врахуємо циклічні коливання статевих гормонів у подальших дослідженнях.

Висновок. За умов високого когнітивного навантаження, створеного відволікаючим емоційно забарвленим візуальним фоном та подачею зорових стимулів через недомінантне око, у жінок мозкові механізми довільної уваги забезпечують ретельніший аналіз релевантних стимулів, що виявляється в них більш точними відповідями за довший період часу порівняно з чоловіками.

Список використаних джерел:

1. ЕЕГ-активність правшів та лівшів при моно- та бінокулярному сприйнятті вербальної емоційно забарвленої інформації / М. Бондаренко, В. Кравченко, М. Макачук та ін. // *Нейрофізіологія*. – 2016. – Т. 48, №1. – С. 48–58.
2. *Rassomagina M.* Electrophysiological correlates of monocular dominant perception of verbal stimuli in emotional Stroop-test / *M. Rassomagina, V. Kravchenko, M. Makarchuk* // *Biologija*. – 2014. – Vol. 60, № 2. – P. 79–95.
3. *Bragina N.* Human Functional Asymmetries / *N. Bragina, A. Dobrohotova* // *Medicine*. – 1988. – Vol. 2. – P. 240. In Russian.
4. Theta responses are involved in lexical-semantic retrieval during language processing / *M. Bastiaansen, M. van der Linden, M. TerKeurs et al.* // *J CognNeurosci*. – 2005. – Vol. 17, № 3. – P. 530–41.

5. *Bastiaansen M.* Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension / *M. Bastiaansen, P. Hagoort* // *Prog Brain Res*. – 2006. – Vol. 159. – P. 179–96.
6. *Bradley M.* The International affective picture system (IAPS) in the study of emotion and attention. *Handbook of emotion elicitation and assessment* / *J. A. Coan, J. B. Allen (ed.)* / *Bradley M., Lang P.* // *Oxford Univ. Press. Oxford New York*. – 2007. – P. 29–46.
7. Prefrontal GABA concentration changes in women—Influence of menstrual cycle phase, hormonal contraceptive use, and correlation with premenstrual symptoms / *T. Bondt, F. Belder, F. Vanhevel et al.* // *Brain Research*. – 2015. – Vol. 1597. – P. 129–138.
8. *Cosgrove K.* Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function and Chemistry / *K. P. Cosgrove, C. M. Mazure, J. K. Staley* // *Biol Psychiatry*. – 2007. – Vol. 62, № 8. – P. 847–855.
9. EEG Activity during Viewing of Neutral and Emotionally Colored Pictures by Men and Women with Different Levels of Empathy / *K. Yu. Demidova, V. V. Dubovik, V. I. Kravchenko et al.* // *Neurophysiology*. – 2014. – Vol. 46, № 2. – P. 160–168.
10. *Hatta T.* Menstrual cycle phase effects on memory and Stroop task performance / *T. Hatta, K. Nagaya* // *Arch Sex Behav*. – 2009. – Vol. 38, № 5. – P. 821–7.
11. *Klimesch W.* EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis / *W. Klimesch* // *Brain Res*. – 1999. – Vol. 29, № 2–3. – P. 169–95.
12. *Konishi S.* Frontal lobes and inhibitory function / *S. Konishi* // *Brain Nerve*. – 2011. – Vol. 63, № 12. – P. 1346–51.
13. *Stoet G.* Sex differences in the Simon task help to interpret sex differences in selective attention / *G. Stoet* // *Psychol Res*. – 2017. – Vol. 81, № 3. – P. 571–581.
14. *Stroop J.* Studies of interference in serial verbal reactions / *J. Stroop* // *Journal of Experimental Psychology*. – 1935. – Vol. 18. – P. 643–662.
15. The Stroop color-word test: influence of age, sex, and education; and normative data for a large sample across the adult age range / *W. Van der Elst, M. P. Bortel, G. J. Van Breukelen, J. Jolles* // *Assessment*. – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 62–79.

Reference:

1. *Bondarenko M.* EEG Activity in Dextrals and Sinistrals during Visual Monocular/Binocular Perception of Verbal Emotionally Colored Information. / *Bondarenko M., Bondarenko O., Kravchenko V., Makarchuk N.* // *Neurophysiology*. – 2016. Vol. 48. P. 43–53.
2. *Rassomagina M.* Electrophysiological correlates of monocular dominant perception of verbal stimuli in emotional Stroop-test. *Rassomagina M., Kravchenko V., Makarchuk M.* // *Biologija*. – 2014. – Vol. 60, No 2. – P. 79–95.
3. *Bragina N.* Funkcionalnue asimetrii cheloveka / *Bragina N., Dobrohotova A.* // *Medicina. Funktsionalnye asimmetrii cheloveka* / *Bragina H., Dobrohotova A.* // *Медицина*. – 1988. – Vol. 2. – P. 240.
4. *Bastiaansen M.* Theta responses are involved in lexical-semantic retrieval during language processing / *M. Bastiaansen, M. van der Linden, M. TerKeurs et al.* // *J CognNeurosci*. – 2005. – Vol. 17, №3. – P. 530–41.
5. *Bastiaansen M.* Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension / *M. Bastiaansen, P. Hagoort* // *Prog Brain Res*. – 2006. – Vol. 159. – P. 179–96.
6. *Bradley M.* The International affective picture system (IAPS) in the study of emotion and attention. *Handbook of emotion elicitation and assessment* / *J. A. Coan, J. B. Allen (ed.)* / *Bradley M., Lang P.* // *Oxford Univ. Press. Oxford New York*. – 2007. – P. 29–46.
7. *Bondt T.* Prefrontal GABA concentration changes in women—Influence of menstrual cycle phase, hormonal contraceptive use, and correlation with premenstrual symptoms / *T. Bondt, F. Belder, F. Vanhevel et al.* // *Brain Research*. – 2015. – Vol. 1597. – P. 129–138.
8. *Cosgrove K.* Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function and Chemistry / *K. P. Cosgrove, C. M. Mazure, J. K. Staley* // *Biol Psychiatry*. – 2007. – Vol. 62, №8. – P. 847–855.
9. *Demidova K.* EEG Activity during Viewing of Neutral and Emotionally Colored Pictures by Men and Women with Different Levels of Empathy / *K. Yu. Demidova, V. V. Dubovik, V. I. Kravchenko et al.* // *Neurophysiology*. – 2014. – Vol. 46, № 2. – P. 160–168.
10. *Hatta T., Nagaya K.* Menstrual cycle phase effects on memory and Stroop task performance / *T. Hatta, K. Nagaya* // *Arch Sex Behav*. – 2009. – Vol. 38, №5. – P. 821–7.
11. *Klimesch W.* EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis / *W. Klimesch* // *Brain Res*. – 1999. – Vol. 29, №2–3. – P. 169–95.
12. *Konishi S.* Frontal lobes and inhibitory function / *S. Konishi* // *Brain Nerve*. – 2011. – Vol. 63, №12. – P. 1346–51.
13. *Stoet G.* Sex differences in the Simon task help to interpret sex differences in selective attention / *G. Stoet* // *Psychol Res*. 2017. – Vol. 81, №3. – P. 571–581.
14. *Stroop J.* Studies of interference in serial verbal reactions / *J. Stroop* // *Journal of Experimental Psychology*. 1935. – Vol. 18. – P. 643–662.
15. *Van der Elst W.* The Stroop color-word test: influence of age, sex, and education; and normative data for a large sample across the adult age range / *W. Van der Elst, M. P. Bortel, G. J. Van Breukelen, J. Jolles* // *Assessment*. – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 62–79.

М. Бондаренко, канд. биол. наук, О. Бондаренко, канд. биол. наук,

В. Кравченко, канд. биол. наук, Н. Макачук, д-р биол. наук

УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФОРМИРОВАНИЕ ПРОИЗВОЛЬНОГО ВНИМАНИЯ У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЗАДАЧ С ВЫСОКОЙ КОГНИТИВНОЙ НАГРУЗКОЙ

Исследовали различия мозговых механизмов, которые лежат в основе переключения между непроизвольным и произвольным вниманием, связанных с полом. У 20 мужчин и 20 женщин сравнивали время реакции, количество ошибок и электрическую активность головного мозга во время выполнения эмоционального Струпа-теста на фоне визуального контента, содержащего аффективные изображения при презентации стимулов через доминантный глаз и через недоминантный. В указанных условиях создавалась модель значительной когнитивной нагрузки, когда правильно реагировать на приоритетные характеристики стимула достаточно сложно. Были найдены различные паттерны мозговой активности: у женщин данное задание сопровождается увеличением спектральной мощности в тета-диапазоне ЭЭГ преимущественно левого полушария, у мужчин снижалась мощность альфа-ритма в теменно-затылочной ассоциативной коре с локальным повышением тета-ритма в задне-лобных участках и бета-ритма в левой префронтальной зоне. В условиях высокой когнитивной нагрузки, созданной отвлекающим визуальным содержанием и подачей зрительных стимулов через недоминантный глаз, мозговые механизмы произвольного внимания обеспечивают более тщательный анализ релевантных стимулов у женщин, что проявляется в предоставлении большего количества правильных ответов с меньшей скоростью по сравнению с мужчинами.

Ключевые слова: внимание, эмоциональный Струпа-тест, IAPS, ЭЭГ, недоминантный глаз, половые различия.

M. Bondarenko, PhD, O. Bondarenko, PhD, V. Kravchenko, PhD, M. Makarchuk, DSc

ESC "Institute of Biology and medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FORMATION OF ATTENTION IN MEN AND WOMEN DURING TASKS PERFORMING WITH HIGH COGNITIVE LOAD

The differences in brain mechanisms that underlie the switch between involuntary and voluntary attention associated with gender were investigated. We compared reaction time, the number of errors and the electrical activity of the brain during the Emotional Stroop test on the background of visual content that contained affective images when presenting stimuli through a dominant and non-dominant eye in 20 men and 20 women. The model of significant cognitive load was created, when it is quite difficult to correctly respond to the relevant characteristics of the stimulus. Different patterns of brain activity have been found: in women, this task is accompanied by an increase in spectral power in the theta range of the predominantly left hemisphere; in men, the power of alpha rhythm in the parietal-occipital associative cortex decreases with the local increase of theta rhythm in the posterior-frontal areas and beta-rhythm in left prefrontal zone. Under the conditions of high cognitive load created by the distracting visual content and the perception of visual stimuli through the non-dominant eye, the brain mechanisms of voluntary attention provide a more thorough analysis of the relevant stimuli in women that is seen in accurate responses over a longer period in comparison with men.

Key words: attention, emotional Stroop test, IAPS, EEG, no dominant eye, sex differences.

УДК 616.329-001.37-053

В. Дмитрик, асп., Я. Раєцька, канд. біол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЛУЖНОМУ ОПІКУ СТРАВОХОДУ II СТУПЕНЯ

ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ ВОДНОГО РОЗЧИНУ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ЛУШПИННЯ *P. VULGARIS*

При моделюванні лужного опіку стравоходу II ступеня у статевонезрілих щурів спостерігаються порушення різних систем метаболізму. Показано, що за умов опіку стравоходу відбувається порушення білкового (загальний білок, альбумін), азотистого (креатинін, сечовина) обміну, змінюється ферментативна активність (АЛТ, АСТ), порушується водно-електролітний баланс (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}), при введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння квасолі звичайної (*P. vulgaris*) спостерігається динаміка зміни біохімічних показників у напрямку до нормалізації. Водний розчин сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* характеризується широким спектром біологічної активності і може бути ефективним при лікуванні травм шлунково-кишкового тракту, у тому числі опіку стравоходу.

Ключові слова: опік стравоходу, біохімічні параметри, метаболізм, поліфеноли, водний розчин сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*

Вступ. За останні роки значно збільшилась частота випадків опіку стравоходу агресивними рідинами. Як правило це відбувається випадково. Медична статистика свідчить, що серед загальної кількості людей, що отримали опіки стравоходу, 70 % складають діти, яким ще не виповнилося 10 років [2, 13]. Найчастіше фіксують проковтування речовин лужної основи [2, 27, 17]. Стероїди, антибіотики та бужування стравоходу вважають одними з найпоширеніших методів при лікуванні для запобігання можливих ускладнень, які виникають унаслідок пошкоджень стравоходу [21, 25, 11, 28, 18, 3]. Ряд авторів вважають застосування цих методів мало-ефективним при лікуванні опіків стравоходу [26, 21, 25, 7, 11]. Незважаючи на це, існують альтернативні методи лікування, які були протестовані та проявили позитивний вплив. До таких методів включають застосування різних антиоксидантів, стероїдів, нестероїдних протизапальних препаратів, мітоміцину-С, кофеїнової кислоти, гепарину, вітаміну С, вітаміну Е, андомепразолу

та інших сполук рослинного та синтетичного походження [17, 21, 7]. Таким чином, на сьогоднішній день недостатньо ефективних схем лікування при хімічних опіках стравоходу [17, 25, 28].

Нашу увагу привернули продукти рослинного походження, які є потенційними загоєвальними агентами і які через широке поширення, простоту застосування і ефективність навіть неочищених препаратів можуть розглядатися як свого роду природна терапія [24, 10, 23]. Лікарським рослинам притаманна полівалентність дії, що обумовлює їх сприятливий вплив на різні патогенетичні ланки захворювань та їх ускладнень. На доповнення, приблизно третину терапевтичних засобів, які використовують для загоєння, отримують із рослинної сировини [24, 9, 10, 23, 22]. Екстракт лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) позитивно впливає на контроль апетиту та маси тіла і належить до IV класу токсичності – малотоксичних речовин, за класифікацією К. К. Сидорова [4, 12]. Експериментально доведено

позитивний вплив поліфенольного препарату – водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* при різних патологіях [22, 24]. Водний розчин сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* характеризується широким спектром біологічної активності й може бути ефективним при лікуванні травм шлунково-кишкового тракту, у тому числі – опіку стравоходу [22, 24].

Тому метою нашого дослідження було з'ясувати зміни біохімічних показників сироватки крові при моделюванні лужного опіку стравоходу II ступеня у щурів за умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*.

Матеріали та методи. У роботі дотримувались загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів масою 90 ± 10 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію, тваринам моделювали опік стравоходу II ступеня 20%-м розчином NaOH в обсязі 0,2 мл [2].

Для приготування екстракту 132 г подрібненого сухого лушпиння квасолі звичайної заливали 1 л окропу. Посудину щільно закривали і настоювали на киплячій водній бані протягом 15 хв. Потім екстракт охолоджували при температурі 25 °С. Отриманий екстракт фільтрували через кілька шарів марлі та центрифугували при 1000g протягом 10 хв для відокремлення грубих залишків рослинної сировини. Супернатант заморожували, після чого висувували шляхом ліофілізації. У результаті описаних вище маніпуляцій отримали 8 г сухого екстракту, який зберігали при –20 °С [22]. У дослідженнях використовували свіжевикотворені водні розчини сухого екстракту.

Водний розчин сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* вводили перорально, із розрахунку 200 мг сухого екстракту на кг ваги тварин на добу. Як контроль використовували щурів, яким одноразово перорально вводили 0,2 мл води для ін'єкцій. Тварин декапітували на 21 та 30 добу після моделювання опіку стравоходу II ступеня. Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові. Для вилучення фібриногену та супутніх білків кров залишали при 37 °С на 4 години. Після цього чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно відділяли від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки і центрифугували при 2500g протягом 30 хв. Отриманий супернатант (сироватку) швидко відокремлювали від формених елементів крові і заморожували при –20 °С до подальшого використання.

Визначення біохімічних параметрів (загальний білок, альбумін, сечовина, креатинін, аланінамінотрансферазна активність, аспартатамінотрансферазна активність, вміст Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}) проводили із застосуванням біохімічного аналізатора Humalyzer 3000, із використанням відповідних інструкцій, методик та реагентів. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Ст'юдента (t). При цьому достовірними вважалися різниці $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Для оцінювання фізіологічного стану організму тварин та людини використовують біохімічні показники сироватки крові. Зміна вмісту загального білка може слугувати маркером порушення багатьох важливих функцій в організмі, як приклад, підтримання сталості рН крові, перенесення багатьох речовин, порушення в імунних реакціях та згортанні крові [19]. Відомо, що при опіковій хворобі відбувається зниження вмісту загального білка [2, 5]. Ми дослідили зміни вмісту загального білка в нормі, за умови лужного опіку стравоходу та за умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris*. Унаслідок лужного опіку стравоходу II ступеня, вміст загального білка в сироватці крові знижується на 9 % на 21 добу та на 6,5 % на 30 добу, порівняно зі значеннями контрольної групи. Показані зміни пов'язані з активацією катаболічних процесів в організмі внаслідок опіку [5]. При введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* тваринам, з опіком стравоходу, вміст загального білка зменшується на 1,5 %, 1,4 %, відповідно, на 21 та 30 добу. За умови введення екстракту тваринам із відтвореною моделлю опіку стравоходу, значення вмісту загального білка достовірно не відрізняються від контрольних значень, тобто застосування водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* сприяє нормалізації цього показника у тварин з опіком стравоходу II ступеня.

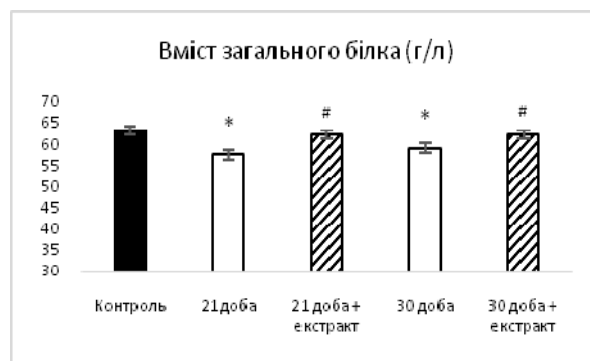
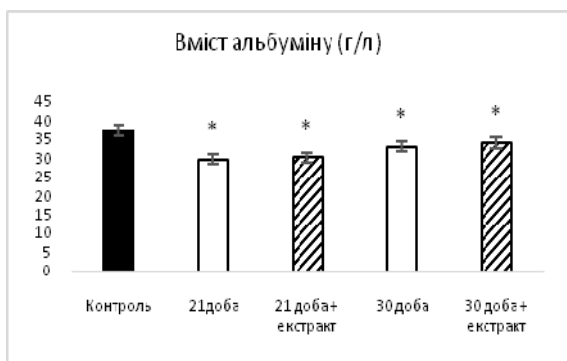


Рис. 1. Значення показників білкового обміну в сироватці крові щурів із лужним опіком стравоходу II ступеня та за умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* ($M \pm m$, $n=10$), де * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи, # – $p < 0,05$ відносно групи тварин із лужним опіком стравоходу

Основна маса білків плазми крові синтезується в печінці – це альбуміни. Сироватковий альбумін людини на 80 % визначає онкотичний тиск. Транспортні молекули зв'язують вільні жирні кислоти і транспортують їх. Таке зв'язування забезпечує зниження концентрації

фізіологічно активних вільних жирних кислот у 10 000 разів. Тому зниження кількості альбумінів може бути однією із причин розвитку жирової інфільтрації печінки [13, 8, 14]. При визначенні концентрації альбуміну в сироватці крові, прослідковуються такі зміни: на

21 та 30 доби вміст альбуміну знижується на 20,5 % та на 11,4 %, відповідно, порівняно з контрольною групою. За умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* тваринам, із відтвореною моделлю опіку стравоходу, вміст альбуміну достовірно зменшується на 19,4 % та на 9,3 % на 21 та 30 доби порівняно з контрольною групою тварин. Порівняно із групою тварин, яким не вводили екстракт, достовірних змін ми не спостерігаємо. Отримані результати вказують на розвиток гіпопротеїнемії сироватки крові піддослідних тварин, яка виникає переважно за рахунок зменшення альбумінів. Тому можна припустити, що за даної концентрації екстракт не проявляє достовірних коригуючих властивостей на вміст альбуміну в сироватці крові піддослідних тварин. Тобто, спостерігається нормалізація рівня

загального білка, але при цьому не спостерігається достовірної нормалізації вмісту альбуміну. Можливим механізмом нормалізації рівня загального білка може бути посилений синтез гаммаглобулінів, унаслідок стимуляції імунної відповіді компонентами екстракту. Також такі зміни можна пояснити тим, що на пізніших етапах опікової хвороби досягають максимуму процеси клітинної проліферації, колагеноутворення та епітелізації, що пов'язано з активним процесом синтезу білків [5].

Важливим показником рівня втрати білка є показники азотистого балансу. Для оцінювання функції нирок визначали концентрацію сечовини в сироватці крові щурів за умов експериментального лужного опіку стравоходу II ступеня.

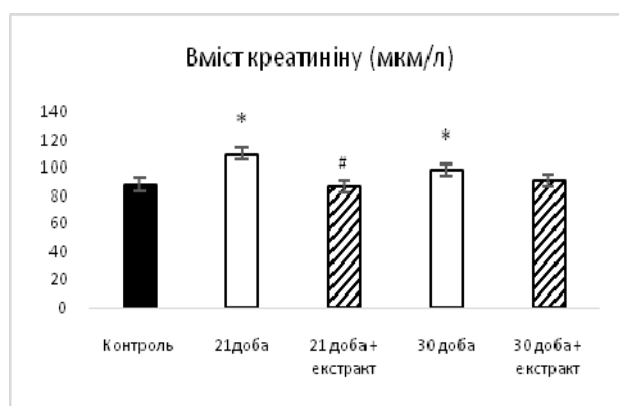
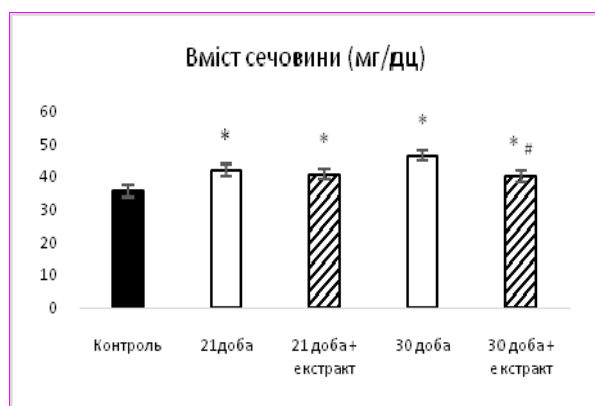


Рис. 2. Значення показників азотистого обміну в сироватці крові щурів із лужним опіком стравоходу II ступеня та за умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* ($M \pm m$, $n=10$), де * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи, # – $p < 0,05$ відносно групи тварин із лужним опіком стравоходу

Сечовина синтезується в печінці при знешкодженні аміаку, який утворюється в реакціях дезамінування амінокислот та виводиться з організму нирками. Відповідно, якщо із крові сечовина виводиться повільно, то це є ознакою порушення видільної функції нирок [5]. Розлади гемодинаміки, які розвиваються при опікових травмах, призводять до порушень функцій органів і систем, які найбільш виражено проявляються розладами функції нирок [5].

За умов лужного опіку стравоходу відбувається підвищення вмісту сечовини на 18,4 % та на 30,5 %, відповідно, на 21 та 30 дні. За умов введення водного екстракту тваринам, із відтвореною моделлю опіку стравоходу, спостерігається підвищення вмісту сечовини в сироватці крові на 21 добу на 14,8 %, та на 30 добу на 13,1 %, відповідно до значень у контрольній групі тварин.

Креатинін бере участь в енергетичному обміні тканин організму, утворюється в м'язах в результаті неферментативного відщеплення фосфатної групи від креатинфосфату. Креатинін виводиться із крові нирками. У ниркових клубочках він вільно фільтрується і, не піддаючись зворотному всмоктуванню або додатковій секреції в каналцях, повністю виводиться з організму із сечею. Тому збільшення рівня креатиніну в сироватці крові вказує на зменшення рівня ниркової фільтрації [5, 13,

8, 14]. Унаслідок лужного опіку стравоходу II ступеня відмічається підвищення рівня креатиніну в сироватці крові на 21 та 30 добу на 24,8 % та на 11,5 %, відповідно, порівняно з контрольними значеннями. При введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* спостерігається зниження рівня на 2,1 % на 21 добу та підвищення на 2,8 % на 30 добу відносно контрольної групи тварин.

Печінка відіграє важливу роль при опіковій хворобі. Це – орган, що відповідає за продукування гострофазних білків. При опіковій хворобі, синтез білків зміщується від конститутивних білків, таких як альбумін, трансферин, ретинол-зв'язувальний білок, до білків гострої фази, які слугують медіаторами запального процесу, функціонують як транспортні білки та беруть участь у загоєнні післяопікової рани. При опіковій хворобі зростає ферментативна активність у сироватці крові. Аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза є найбільш чутливими індикаторами ушкодження гепатоцитів [13, 14, 20]. Тому наступним етапом нашої роботи ми визначали ферментативну активність у сироватці крові щурів за умови лужного опіку стравоходу II ступеня.

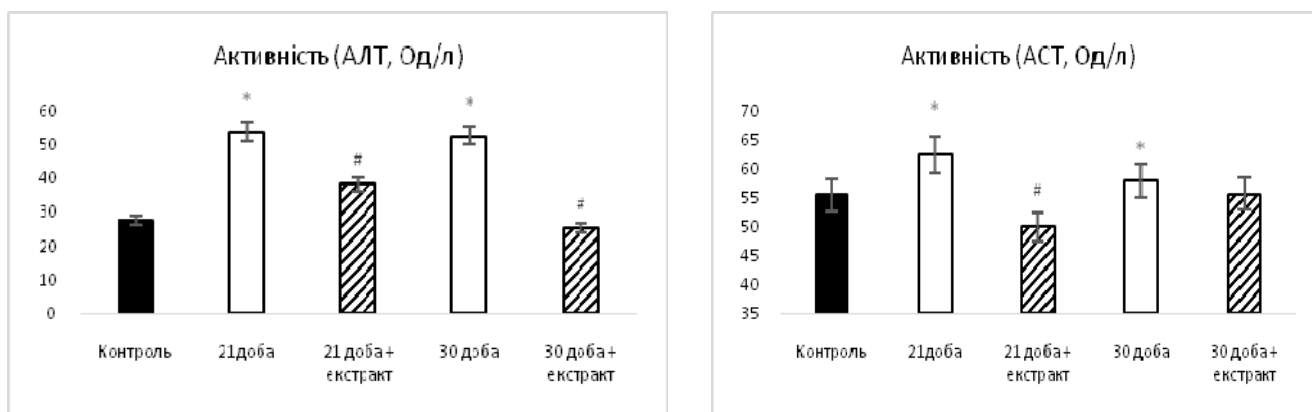


Рис. 3. Значення ферментативної активності в сироватці крові щурів із лужним опіком стравоходу II ступеня та за умов уведення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* ($M \pm m$, $n=10$), де * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи, # – $p < 0,05$ відносно групи тварин із лужним опіком стравоходу

При визначенні аланінамінотрансферазної активності в сироватці крові, ми відмічаємо такі зміни (рис. 3.): збільшення аланінамінотрансферазної активності на 95 % на 21 добу, та на 90,4 % на 30 добу, порівняно з контрольною групою, за умови введення водного екстракту стручків *P. vulgaris*, прослідковується зниження аспартатамінотрансферазної активності на 29 % на 21 добу, та на 52,4 % на 30 добу відносно групи тварин з опіком стравоходу, яким не вводили дослідний препарат. У групі тварин з опіком стравоходу, відмічено збільшення аспартатамінотрансферазної активності на 12,5 % на 21 добу та на 4,5 % на 30 добу порівняно з контрольною групою. При введенні водного екстракту стручків *P. vulgaris* тваринам з опіком стравоходу відмічається зниження аспартатамінотрансферазної активності на 8,7 % на 21 добу, та на 4 % на 30 добу відносно групи тварин з опіком, яким не вводили дослідний препарат. Таким чином, ми спостерігаємо нормалізацію досліджуваних показників у групі тварин,

котрим вводили екстракт, порівняно із групою з відтвореною моделлю опіку стравоходу, переважно на 21 добу. Дані зміни можуть вказувати на гепатопротекторну властивість екстракту.

Водно-сольовий обмін – сукупність процесів надходження води та солей (електролітів) в організм, їх усмоктування, розподілу у внутрішніх середовищах і виділення. Системи регуляції цього обміну забезпечують підтримку загальної концентрації електролітів (натрію, калію, кальцію, магнію) та іонного складу внутрішньоклітинної та позаклітинної рідини на одному і тому ж рівні [25]. Водно-сольовий обмін є важливою складовою загального метаболізму, направленою на підтримання постійності внутрішнього середовища організму. Порушення водно-сольового балансу безпосередньо визначає симптоматику і тяжкість стану хворих при опіковій хворобі [14]. Порушення водно-сольового балансу характеризується значними позанирковими втратами рідини.

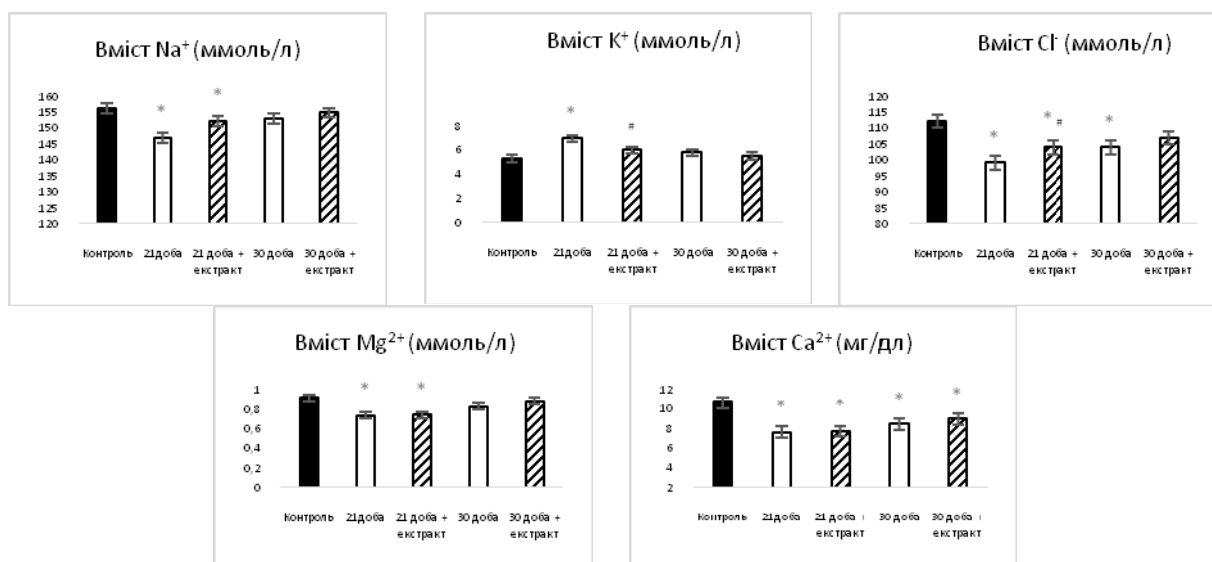


Рис. 4. Значення показників електролітів у сироватці крові щурів із лужним опіком стравоходу II ступеня та за умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* ($M \pm m$, $n=10$), де * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи, # – $p < 0,05$ відносно групи тварин із лужним опіком стравоходу

Натрій підтримує постійно існуючу рівновагу між іонами електролітів, він разом із водою входить у клітини, викликаючи їх набряк, настає клітинна гіпергідратація спочатку в ділянці опіку, а потім і поза ним. Одночасно проходить переміщення іонів натрію в позаклітинний

простір вогнища ураження, викликаючи накопичення значної кількості рідини, збільшення набряку, а також переміщення іонів натрію в непошкоджені клітини [2, 5, 14]. Описані вище процеси призводять до зменшення вмісту натрію, на що і вказують результати досліджен-

ня. Унаслідок лужного опіку стравоходу II ступеня, концентрація Na^+ в сироватці крові знижується на 5,8 % на 21 добу та на 1,9 % на 30 добу. При введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* тваринам з опіком стравоходу, концентрація Na^+ підвищувалася на 2,6 % та на 0,8 % станом на 21 та 30 добу порівняно із групою тварин, котрим не вводили препарат. При посиленому розпаді білків, збільшується вихід іонів K^+ із клітин у позаклітинне середовище з подальшим виведенням їх через нирки. Суттєвий дефіцит калію розвивається при хворобах і патологічних станах, що супроводжуються порушенням трофіки тканин, а також при опіках із великим ареалом ушкодження, перитоніті, злоякісних пухлинах. Для опікової хвороби характерне підвищення рівня калію в судинному руслі [2, 14]. При визначенні концентрації K^+ в сироватці крові прослідковуються такі зміни (рис. 4): у групі тварин з опіком стравоходу вміст іонів K^+ збільшується на 21 та 30 добу на 30,1 % та на 9,4 %, відповідно, порівняно з контрольною групою. При введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* тваринам із відтвореною моделлю опіку стравоходу концентрація K^+ знижується на 13,2 %, 3,7 % щодо контрольної групи, на 21 та 30 добу. Концентрація Cl^- в сироватці крові зменшується на 11,5 % на 21 добу та на 7,2 % на 30 добу внаслідок лужного опіку стравоходу II ступеня. За умови введення водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* тваринам із лужним опіком стравоходу концентрація Cl^- зростає на 7,2 % та на 4,5 %, відповідно, на 21 та 30 добу, порівняно з групою тварин з опіком, котрим не вводили екстракт. У групі тварин, котрим вводили екстракт, значення концентрації Cl^- достовірно не відрізняються від значень у контрольній групі тварин. За умов лужного опіку стравоходу вміст Mg^{2+} в сироватці крові тварин з лужним опіком стравоходу зменшується на 18,6 % на 21 добу та на 8,7 % на 30 добу порівняно з контрольною групою тварин. При введенні екстракту тваринам з опіком вміст Mg^{2+} знижується на 18,6 % та 3,2 %, відповідно, на 21 та 30 добу. Вміст Ca^{2+} в сироватці крові тварин з опіком зменшується на 21 та 30 добу на 28,3 % та на 20,7 %, відповідно, порівняно з контрольною групою. У групі тварин, яким вводили водяний екстракт, концентрація Ca^{2+} зменшується на 27,3 % і 16 %, відповідно, на 21 та 30 добу.

Висновки. Таким чином, проведені дослідження показали, що при лужному опіку стравоходу II ступеня спостерігаються патологічні зміни білкового обміну, азотистого та водно-сольового обмінів, змінюється активність печінкових амінотрансфераз найбільше станом на 21 добу. На 30 добу відбувається певна нормалізація показників (загальний білок, альбумін, сечовина, креатинін, АЛТ, АСТ, Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}) порівняно із 21 добою дослідження, завдяки включенню адаптаційно-компенсаторних механізмів. При введенні водного розчину сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* піддослідним тваринам, які експериментально отримали лужний опік стравоходу II ступеня, спостерігалась динаміка зміни біохімічних показників у напрямку до нормалізації (контрольних значень) протягом усіх термінів дослідження.

Список використаних джерел:

1. Клименко М. О. Опікова хвороба (патогенез і лікування) / М. О. Клименко, Л. Г. Нетухайло // К.: Вид. дім "Полтава", 2009. – 118 с.
2. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу I ступеня у щурів / Я. Б. Раєцька, Т. В. Ішук, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко // Медична хімія. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 30–34.
3. Самойленко Г. Е. Ожоги у дітей / Г. Е. Самойленко // Здоров'я ребёнка. – 2006, № 1. – С. 111–115.

4. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. Держ. фармакол. центр / О. В. Стефанов // К.: Вид. дім "Авіцена", 2001. – С. 256–262.
5. Комбустіологія / Е. Я. Фісталь, Г. П. Козинець, Г. Є. Самойленко та ін. // К.: Вид. дім "Інтерлінк", 2004. – С. 184.
6. Adam J. Pediatric caustic ingestion / J. S. Adam, H. G. Birk // Ann Otol Rhinol Laryngol. – 1982, № 91. – P. 656–658.
7. Akbal E. Beneficial effects of Ankaferd blood stopper on caustic esophageal injuries: an experimental model / E. Akbal, S. Köklü, G. Karaca // Dis Esophagus. – 2012, № 25. – P. 188–194.
8. Alov P. Computational studies of free radical scavenging properties of phenolic compounds / P. Alov, I. Tsakovska, I. Pajeva // Curr. Top. Med. Chem. – 2015. – 15. – P. 85–104.
9. Wound healing activity of the ethanol root extract and polyphenolic rich fraction from *Potentilla fulgens*. / K. Anindita, G. Arka, K. S. Narendra et al. // Taylor & Francis. – 2016, № 11. – Vol. 54. – P. 2383–2393.
10. Bahramsoltani R. Medicinal plant sand their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. / R. Bahramsoltani, M. H. Farzaei, R. Rahimi // Arch. Dermatol. Res. – 2014. – Vol. 306. – P. 601–617.
11. The protective effect of erythropoietin on the acute phase of corrosive esophageal burns in a rat model / V. Bakan et al. // Pediatr Surg Int. – 2010. – № 26. – P. 195–201.
12. Barrett M. L. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control / M. L. Barrett, J. K. Udani // Nutr J. – 2011 Mar. – Vol. 17, № 10. – P. 24.
13. Contini S. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries / S. Contini, A. Swarray-Deen, C. Scarpignato // B. Wor. Heal. Org. – 2009. – Vol. 87, № 12. – P. 950–954.
14. Chornenka N. M. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. / N. M. Chornenka, Ya. B. Raetska, O. M. Savchuk et al. // RJPBCS 7(5), September–October. – 2016. – P. 1042.
15. Ercan S. The Effect of Pepper Gas (OC) on Some Biochemical Parameters in Rats / S. Ercan, M. Nihat // KafkasUnivVetFakDerg. – 2012. – 18 (2). – P. 259–266.
16. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study / A. K. Gokakin, K. Deveci, A. Kurt et al. // Burns. – 2013. – Vol. 39. – P. 1193.
17. Gundogdu H. Z. Conservative treatment of caustic esophageal strictures / H. Z. Gundogdu, F. C. Tanyel, N. Buyukpamukcu // J Pediatr Surg. – 1992. – 27. – P. 767–770.
18. Hawkins D. B. Caustic ingestion -- controversies in management: a review of 214 cases / D. B. Hawkins, M. J. Demeter, T. E. Bornett // Laryngoscope. – 1980. – 90. – P. 98–109.
19. Changes in blood protein composition under experimental chemical burns of esophageal development in rats / T. V. Ishchuk, Ya. B. Raetska, O. M. Savchuk et al. // Biomedical Research and Therapy. – 2015. – 2(4). – P. 241–249.
20. Jeschke M. The Hepatic Response to Thermal Injury: Is the Liver Important for Postburn Outcomes? / M. Jeschke // Molecular Medicine. – 2009. – № 15. – P. 337–351.
21. Karnak I. Combined use of steroid, antibiotics and early bougienage against stricture formation following caustic esophageal burns / I. Karnak, F. C. Tanyel, N. Büyükpamukçu // Hiçsönmez Cardiovasc Surg (Torino). – 1999. – № 40. – P. 307.
22. Effect of Aqueous Extract from *Phaseolus vulgaris* Pods on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in the Liver and Kidney of Diabetic Rats / M. Kyznetsova, O. Makieieva, D. Lavrovska et al. // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2015. – № 5. – P. 001–006.
23. Mantle D. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders / D. Mantle // Pharmaceutical biology Adverse Drug React Toxicol Rev. – 2001. – Vol. 20. – P. 89–103.
24. Mutaf O. Treatment of corrosive esophageal strictures by long term stenting / O. Mutaf // J Pediatr Surg. – 1996. – № 31. – P. 681.
25. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in inhibition of wound healing in corrosive esophageal burns: a prospective randomised trial in rats / A. Nayci, M. Cakmak, N. Renda et al. // Int J Surg. – 1997. – P. 371–375.
26. Caustic ingestion in childhood: current treatment possibilities and their complications. / C. Pintus, C. Manzoni, S. Nappo et al. // Pediatr Surg Int 1993. – № 8. – P. 109–112.
27. Balon dilatation in esophageal strictures. / B. Tander, H. Baskaya, E. Arıturk et al. // In: Colloquium on gastroesophageal reflux and esophageal strictures. Izmir, Turkey. – 2003. – P. 1–5.
28. Protein loss across burn wounds. / K. Waxman, T. Rebello, L. Pinderski et al. // J Trauma 1987. – № 27. – P. 136–140.
29. Yousef I. M. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. / I. Yousef, E. Demerdash, M. Radwan // FoodChemToxicol. – 2008. – 48. – P. 3506.

Reference:

1. Klimenko M., Netyuhaylo L. Burn disease (pathogenesis and treatment). 2009. 118 p.

2. Raetska Y., Ishchuk T., Savchuk O., Ostapchenko L. Experimental modeling of first-degree chemically-induced esophageal burns in rats. *Medical chemistry*; 2013. 15, № 4. P. 30-34.
3. Samojlenko G. Burns in children. *Child Health*; 2006. V.1. P. 111-115.
4. Stefanov O. Doklinichni doslidzhennya likars'kykh zasobiv: Metod. Rekomendatsiyi Derzh. farmakol. tsentr. K.: Vyd. dim "Avitsena"; 2001. P. 256-262.
5. Fistol E., Kozinets G., Samoilenko G. et al. *Combustiology*. Kharkov; 2004. P.184.
6. Adam J., Birk H. Pediatric caustic ingestion. *Ann OtolRhinol Laryngol*; 1982. V.91: P. 656-658.
7. Akbal E., Köklü S., Karaca G. et al. Beneficial effects of Ankaferd blood stopper on caustic esophageal injuries: an experimental model. *Dis Esophagus* 2012; 25: P.188-94
8. Alov P., Tsakovska I., Pajeva I. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr. Top. Med. Chem*; 2015. 15. P. 85-104.
9. Anindita K., Arka G., Narendra K., Gireesh K., Ankit S., Santosh K., Siva H., Damiki L. Wound healing activity of the ethanol root extract and polyphenolic rich fraction from *Potentilla fulgens*. *Taylor & Francis*, 11 54 ed., 2016. P. 2383-2393.
10. Bahramsoltani R., Farzaei M., Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. *Arch. Dermatol. Res*; 2014. 306. P. 601-617.
11. Bakan V., Garipardic M., Okumus M. et al. The protective effect of erythropoietin on the acute phase of corrosive esophageal burns in a rat model. *Pediatr Surg Int* 2010; 26: P. 195-201
12. Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J*. 2011 Mar;17(10):24. P. 24.
13. Contini S. Esophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries. *B. Wor. Heal. Org.* – 2009. – Vol. 87, № 12. – P. 950 – 954.
14. Chornenka N., Raetska Y., Savchuk O., Torgalo E., Beregova T., Ostapchenko L. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. *RJPBCS* 7(5), September – October; 2016. P.1042
15. Ercan S., Nihat M. The Effect of Pepper Gas (OC) on Some Biochemical Parameters in Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*; 2012. 18 (2); P. 259-266.
16. Gokakin A., Deveci K., Kurt A., Karakus B., Duger C. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. *Burns*; 2013; V – 39: P. 1193.
17. Gundogdu H., Tanyel F., Buyukpamukcu N., Conservative treatment of caustic esophageal strictures. *J Pediatr Surg*, 1992. 27. P. 767-770
18. Hawkins D., Demeter M., Bornett T. Caustic ingestion – controversies in management: a review of 214 cases. *Laryngoscope*, 1980. V. 90. P.98-109
19. Ishchuk T., Raetska Y., Savchuk O., Ostapchenko L. Changes in blood protein composition under experimental chemical burns of esophageal development in rats. *Biomedical Research and Therapy*; 2015. 2(4). P. 241-249
20. Jeschke M. The Hepatic Response to Thermal Injury: Is the Liver Important for Postburn Outcomes? *Molecular Medicine*. 2009;15(9-10). P. 337-351.
21. Karnak I., Tanyel F., Büyükpamukcu N., Hiçsönmez A. Combined use of steroid, antibiotics and early bougienage against stricture formation following caustic esophageal burns. *JCardiovasc Surg (Torino)* 1999; 40. P. 307-10.
22. Kyznetsova M., Makieieva O., Lavrovska D., Tymoshenko M., Sheverova D., Halenova T., Savchuk O., Ostapchenko L. Effect of Aqueous Extract from *Phaseolus vulgaris* Pods on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in the Liver and Kidney of Diabetic Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015 May;5(5). P.1-6.
23. Mantle D. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Pharmaceutical biology Adverse Drug React Toxicol Rev.*, 2001. vol. 20. P. 89-103.
24. Mutaf O. Treatment of corrosive esophageal strictures by longterm stenting. *J Pediatr Surg* 1996; V.31. P.681
25. Nayci A., Cakmak M., Renda N., Ereku S. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in inhibition of wound healing in corrosive esophageal burns: a prospective randomised trial in rats. *Int J Surg*, 1997.82. P. 371-375.
26. Pintus C., Manzoni C., Nappo S., Perrelli L. Caustic ingestion in childhood: current treatment possibilities and their complications. *Pediatr Surg Int*, 1993. 8. P.109-112.
27. Tander B., Baskaya H., Ariturk E., Rizalar R. Balon dilatation in esophageal strictures. In: *Colloquium on gastroesophageal reflux and esophageal strictures*. Izmir, Turkey, 2003. P. 1-5.
28. Waxman K., Rebello T., Pinderski L., O'Neal K., Khan N., Tourangeau S. Protein loss across burn wounds. *J Trauma* 1987. N-27-P. 136-140.
29. Yousef I., El-Demerdash M., Radwan F. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. *FoodChemToxicol*; 2008 – N.48 – P. 3506.

Надійшла до редколегії 02.10.17

В. Дмитрик, асп., Я. Раецкая, канд. биол. наук

УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У КРЫС ПРИ ЩЕЛОЧНОМ ОЖОГЕ ПИЩЕВОДА II СТЕПЕНИ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ВОДНОГО РАСТВОРА СУХОГО ЭКСТРАКТА *P. VULGARIS*

При моделировании щелочного ожога пищевода II степени у половозрелых крыс наблюдаются нарушения различных систем метаболизма. Вследствие ожога пищевода замечено нарушение белкового (общий белок, альбумин), азотистого (креатинин, мочевины) обменов, изменялась активность ферментов (АЛТ, АСТ), наблюдалось нарушение водно-электролитного баланса (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}), при введении водного раствора сухого экстракта стручков *P. vulgaris* наблюдается динамика изменений в сторону нормализации показателей. Водный раствор сухого экстракта стручков *P. vulgaris* характеризуется широким спектром биологической активности и может быть эффективным при лечении травм желудочно-кишечного тракта, в том числе ожога пищевода.

Ключевые слова: ожог пищевода, биохимические параметры, метаболизм, полифенолы, водный раствор сухого экстракта стручков *P. vulgaris*.

V. Dmytryk, PhD stud., Ya. Raetska, PhD

ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

BIOCHEMICAL CHANGES IN BLOOD SERUM OF RATS WITH EXPERIMENTAL BURN ESOPHAGUS II DEGREE UNDER TREATMENT WITH AQUEOUS EXTRACT OF PODS *P. VULGARIS*

During modeling of esophageal alkali burns II degree in immature rats were observed violations of various metabolic systems. It was shown that under the esophageal burns there occurred violations of protein (total protein, albumin), nitrogen metabolism (creatinine, urea), changed the activity of enzymes (GOT, GPT), violated fluid and electrolyte balance (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}). In the groups of animals with the alkaline burn of the esophagus, that were injected aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*) there can be traced a change of the indicators in the direction of normalization, indicating about the obvious therapeutic effect of aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*).

Key words: burn the esophagus, biochemical parameters, metabolism, polyphenols, aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*).

UDK 57.084:615.357

O. Kalmukova, PhD stud., A. Pustovalov, PhD,
I. Vareniuk, PhD, M. Dzerzhynsky, DSc.
ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF MELATONIN DIFFERENT TIME ADMINISTRATION ON THE DEVELOPMENT OF DIET-INDUCED OBESITY IN RATS

In recent years much attention has been paid for study of the melatonin use possibilities for improving obesity comorbidities. The aim of our study was to determine the influence of melatonin different time treatment on body weight changes of diet-induced obesity in rats. The administration by gavage of melatonin in dose 30 mg/kg for 7 weeks had the potential to decrease visceral fat weight, Lee index (both after morning and evening treatment) and body weight gain rate (only after evening dose).

Key words: melatonin, obesity, high-fat diet, chronobiology.

Introduction. Overweight and obesity have become major global public health problems. Worldwide, the proportion of adults with a body mass index (BMI) of 25 kg/m² or greater increased from 28.8% to 36.9% in men, and from 29.8% to 38.0% in women between 1980 and 2013 [1]. According to the official data of the WHO Bulletin published in May 2017, in 2014 year the nearly 2 billion adults worldwide are overweight and, of these, more than half a billion were obese [2]. Increasing evidence shows that obesity is associated with inflammatory and oxidative stress responses, which cause chronic disturbances including type 2 diabetes [3], cardiovascular disease [4], dyslipidemia, cancers [5], and other disease. The drivers of the obesity epidemic have been much debated [6]. An increased food energy supply and the globalization of the food supply, increasing the availability of obesogenic ultra-processed foods, are arguments for a predominant driver of population weight gain [7]. In the other hand, the involvement of both the behavioral aspects, such as calorie-rich diet, low physical activity and sleep deprivation, and the intrinsic factors, including adipose tissue deregulation, chronic inflammation, oxidative stress, and chronodisruption, has been identified.

Melatonin, the neurohormone of the pineal gland that transduces environmental information, especially about the photoperiod, to regulate and reset circadian rhythms [8]. This signal molecule involve in the measurement of daylength (because pineal melatonin synthesis and release are uniquely elevated at night, it is referred to as the chemical expression of darkness) for seasonal timing of reproduction, energy metabolism, thermoregulation and behavior in mammals [9]. In the latter, melatonin is known to affect body mass, adiposity, inflammation state, and both energy intake and expenditure [10, 11]. These effects may influence to the obesity development [12]. Especially, deficiency of melatonin (one of the consequences of sleep deprivation), that may rely on circadian dysruption of leptin and adiponectin secretion, has also been demonstrated to correlate with obesity [13].

Chronopharmacological studies show that drug effects may vary according to the time of administration [14]. These differences are mainly due to circadian variations in multiple physiological variables, such as blood flow and binding to plasma proteins that influence drug's absorption, distribution, metabolism or elimination [15]. In the case of melatonin, it is worth noting that, although many variables have been reported to influence its pharmacokinetics among them there is circadian time regulation [16]. The influence of the time of day on the effects of oral melatonin are important not only for circadian studies [17] but also for metabolism studies since, melatonin has different effects on glucose tolerance between day and night [18]. When

melatonin levels are highest (during the hours of darkness), the affinity of melatonin for its receptor, total binding and the expression of melatonin receptor mRNA are lowest. In addition, when cultured or recombinant cells expressing melatonin receptors are exposed to melatonin chronically, the potency of melatonin at melatonin receptors decreases perhaps due to an uncoupling of the receptor from its effector, due to receptor internalization and/or due to receptor down-regulation [19, 20, 21]. However, when melatonin levels are lowest (during the hours of daylight), the affinity of melatonin for binding, total binding and the expression of melatonin receptor mRNA are highest [22].

Despite the large number of scientific papers devoted to studying melatonin for the treatment and prevention of obesity [10, 11, 12, 13], we still lack knowledge on the use of this signal molecule, since different doses, duration, route and time of administration were taken in the researches. This dependence is due to the different sensitivity (density, affinity) of melatonin receptors throughout the day [23], but the mechanism of such regulation is still completely unclear [24].

The aim was to study body mass and food consumption changes on the development of rat high-calorie diet-induced obesity after melatonin use and perform comparative study the treatment efficacy of melatonin evening (1 hour before light-off) vs morning administration (1 hour after light-on) for the prevention and treatment of development obesity.

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100-120 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-off at 19:00 h. All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasburg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow. On the 8th day, the animals were randomized into 2 groups: control animals received standard chow (3,81 kcal/g) for 10 weeks and experimental rats received high-calorie diet (5,35 kcal/g) consisting of standard chow (60%), pork fat (10%), eggs (10%), sugar (9%), peanut (5%), dry milk (5%) and vegetable oil (1%) [25]. Food and water were available *ad libitum*. To confirm the development of obesity the animals were weighed one times a week until the average body gain reached a significant difference of at least 30% between the two groups. They were then divided into 6 group according to table 1.

Table 1. Characteristics of animals experimental groups

№	Group name	Diet type	Melatonin treatment
1	Control (C)	Standard	–
2	HCD	High-calorie	–
3	M ZT01	Standard	1 h after lights-on
4	M ZT11	Standard	1 h before lights-off
5	HCD ZT01	High-calorie	1 h after lights-on
6	HCD ZT11	High-calorie	1 h before lights-off

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by gavage for 7 wk (30 mg/kg) either 1 h after lights-on (Zeitgeber time (ZT) 1) or 1 h before lights-off (ZT11) (Fig. 1). Melatonin treatment was began at 6th week of study after obesity is developed.

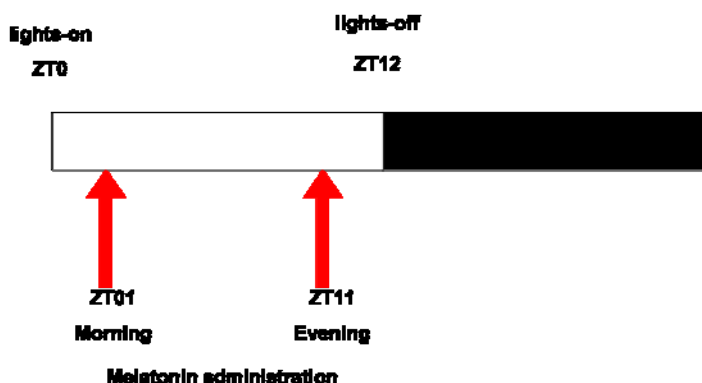


Fig. 1. Schematic protocol of melatonin administration

Food and water consumption were measured daily at the same time (09:00 to 10:00 h) and body weights were determined once a week. Body weight gain, relative daily food (kcal/day/g body weight) and relative daily water consumption (ml/day/g body weight) was determined for each rat. Body length was measured; body mass index (BMI) (the ratio of body weight (kg) of rats to the square of the body length (m²)) and Lee obesity index (the ratio of cube root of body weight (g) by nasoanal length (cm) and multiplying the result by 1000 [26]) were also calculated. The epididymal, retroperitoneal, perirenal fat pads were dissected and immediately weighed.

The statistical analysis of the results obtained was conducted using the Statistica 6.0 (StatSoft, USA) and Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) software. Normality of data distribution was determined by the Shapiro-Wilks cri-

terion. To assess the validity of the revealed changes, parametric (Student t-test for two-samples) and non-parametric (Mann-Whitney U-test for the independent groups) methods of variation statistics were used, the difference was significant at $p < 0.05$. The obtained results are presented as $M \pm SEM$ (mean $\pm$ standard error of mean).

Results and discussion. To establish the obesity model, animals were fed HCD until there was a minimum difference of 30 % body weight gain between rats fed HCD compared with those who were fed standard diet. As soon as this difference reached significance ($p < 0.05$), parts of HCD and standard diet fed rats were treated with melatonin either 1 h after lights-on (ZT1) or 1 h before lights-off (ZT11). The baseline information of body weight, related visceral fat weight, body mass index, and Lee index of experimental animals are presented on the table 2.

Table 2. Body weight gain, body mass index, Lee index and visceral fat weight of experimental animals

Parameter	Control	HCD	M ZT01	M ZT11	HCD ZT01	HCD ZT11
Weight gain (%)	195 $\pm$ 23	271 $\pm$ 17*	236 $\pm$ 16 [#]	207 $\pm$ 23 [#]	254 $\pm$ 25	248 $\pm$ 26
Body mass index (kg/m ²)	6,12 $\pm$ 0,29	6,87 $\pm$ 0,23*	6,12 $\pm$ 0,19 [#]	6,24 $\pm$ 0,05 [#]	6,44 $\pm$ 0,09	6,41 $\pm$ 0,04
Lee index	288 $\pm$ 5	309 $\pm$ 3*	292 $\pm$ 4 [#]	293 $\pm$ 2 [#]	297 $\pm$ 1 [#]	295 $\pm$ 3 [#]
Visceral fat weight (%)	1,78 $\pm$ 0,03	2,93 $\pm$ 0,31*	0,92 $\pm$ 0,09* [#]	0,94 $\pm$ 0,23* [#]	1,81 $\pm$ 0,14 [#]	1,59 $\pm$ 0,18 [#]

Data are presented as the $M \pm SEM$;

* – $p < 0.05$ compared with control value,

– $p < 0.05$ compared with HCD.

The weight gain, BMI and Lee index in rats received standard chow, which administrated melatonin (M ZT01 and M ZT11), were not significantly different compared with control group, but the level of visceral fat weight was decrease ($p < 0.05$) in M ZT01 by 48% and in M ZT11 by 47%. However, the data in literature about melatonin influence on body weight in rats with normal type of diet are disputed: was shown decrease (continuously in drinking water for 12 and 24 weeks in dose 0.4 μ g/mL [27], or for 9 weeks in dose 25 μ g/mL [28], or for 3 and 6 weeks in dose 4 mg/kg/day [29]) or no effect (intraperitoneal injection for 6 months at 09:00 hr in dose 3 mg/kg/day [30], or

for 2 weeks at 07:00 hr in dose 1 and 10 mg/kg/day [31], or for 5 weeks at 18:00 hr in dose 10 mg/kg/day [32], or continuously in drinking water for 10 weeks in dose 25 μ g/mL [33], or for 8 weeks in dose 100 mg/kg/day [34]). In our study reduce in visceral fat weight in the absence of significant differences in food intake (data not shown) are worth exploring. A key piece of evidence in this regard is the observation that melatonin plays a role in seasonal changes in adiposity by increasing the activity of the sympathetic nervous system innervating white fat which leads to lipolysis [35].

The weight gain and BMI in HCD ZT01 and HCD ZT11 groups take intermediate value: there no significant difference

compare both to control and HCD group. If we pay attention to dynamics of weight gain (Fig. 2), all this data means that melatonin have influence to body mass changes and tendency to decrease weight gain during development of obesity. After 1 weeks of melatonin administration (on the 7th and 8th weeks of experiment) the weight gain of HCD ZT01 and HCD

ZT11 groups begin stop growing and this tendency was maintained during following final 5 weeks (decreases in HCD ZT01 by 6% and in HCD ZT11 by 8% groups in relation to HCD, but still increased by 30% and 27% in HCD ZT01 and HCD ZT11 respectively in relation to control, to note HCD weight gain was higher by 40% than control).

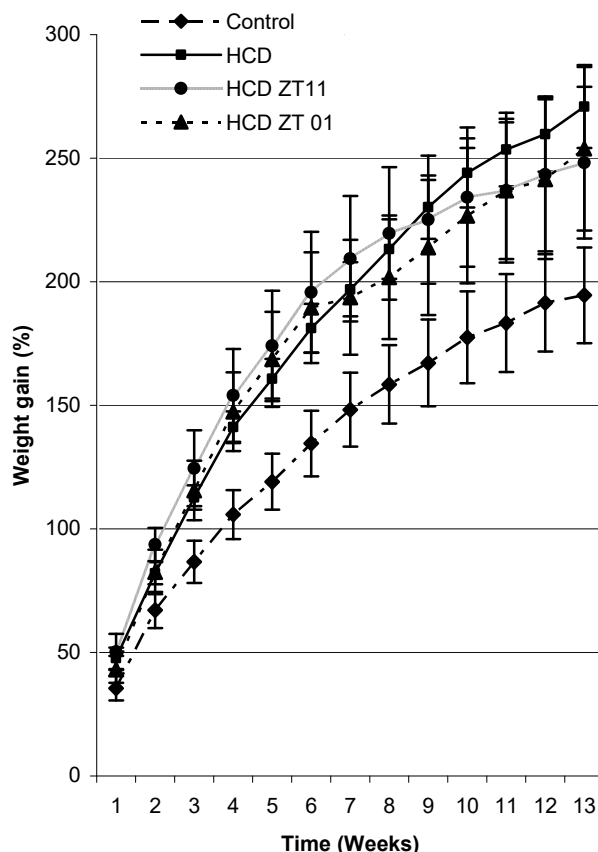


Fig. 2. Dynamics of weight gain during melatonin treatment

Surprisingly, we observed significant difference in weight gain rate (Fig. 3 A, B). At 2nd and 3th weeks after melatonin treatment (8th and 9th weeks of experiment) the weight gain rate were reduced both in HCD ZT01 by 50% and 29%, in HCD ZT11 by 38% and 67% ($p < 0.05$ compared with HCD). Lower values in HCD ZT01 at 1st weeks melatonin use (by 73% $p < 0.05$ compared with HCD) we explain the stress

action under first week of morning administration by gavage, because the same raise we mark in M ZT01 by 62% ($p < 0.05$ compared with control). Anyway, except 1st week melatonin effect on weight gain rate in M ZT01 and M ZT11 groups was without significant difference throughout the experiment in compared with control (data not shown).

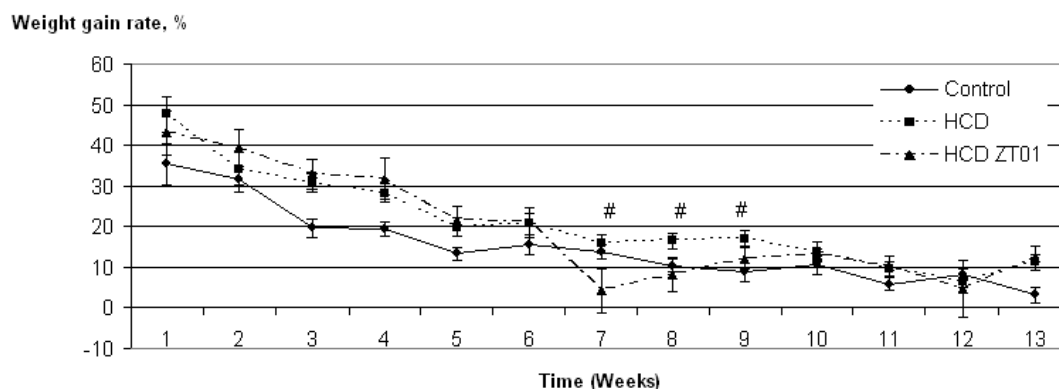


Fig. 3 A. Dynamics of weight gain rate during morning melatonin treatment

– HCD ZT01 $p < 0.05$ compared with HCD.

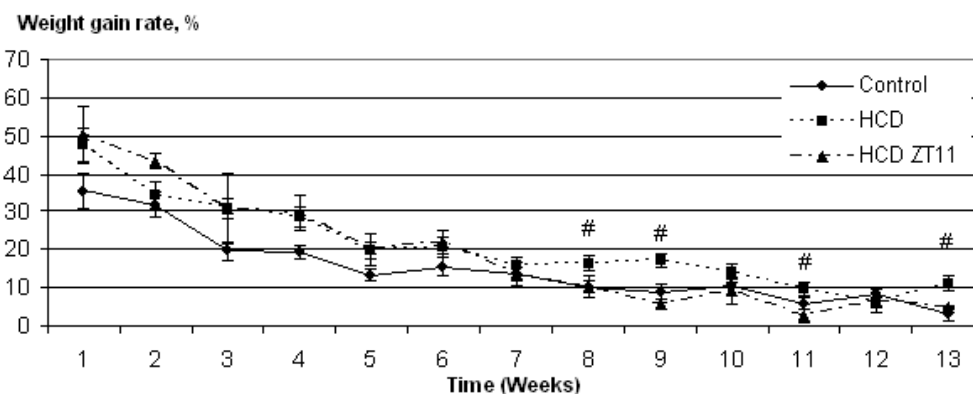


Fig. 3 B. Dynamics of weight gain rate during evening melatonin treatment

– HCD ZT11 $p < 0.05$ compared with HCD.

The following 4th and 6th weeks (10th and 12th weeks of all experiment) we found reduce value of this parameter in HCD, HCD ZT01 and HCD ZT11 groups to control level due to low quality of high-fat chow (this points is outpoints).

The next 5th and 7th weeks (11th and 13th weeks of all experiment) the weight gain rate in HCD ZT11 continue loss to control values (by 72% and 57%, $p < 0.05$ compared with HCD), while in HCD ZT01 studied parameter did not significantly differ from HCD group.

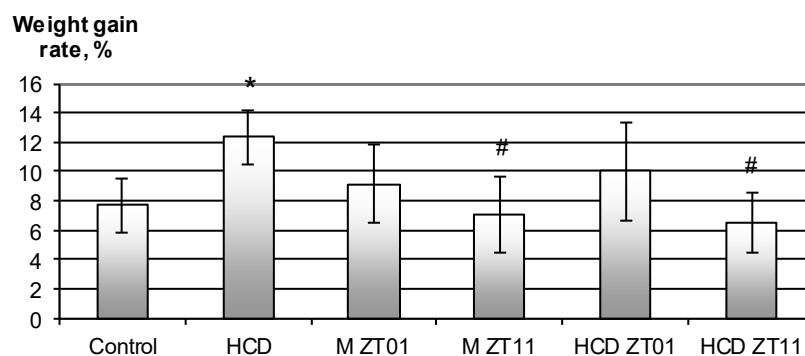


Fig. 4. Effect of melatonin on weight gain rate during last 6 weeks of study

* – $p < 0.05$ compared with control value, # $p < 0.05$ compared with HCD.

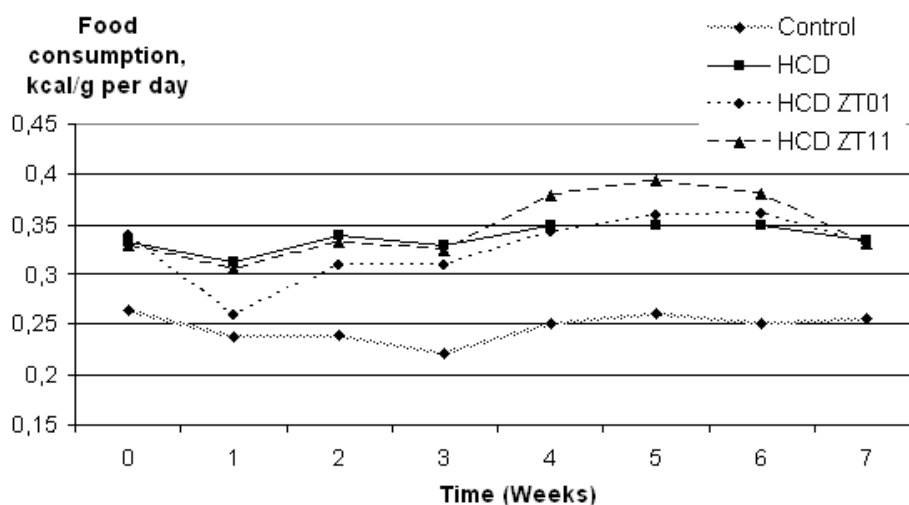


Fig. 5. Effect of melatonin treatment on relative daily food consumption

However, the average index of weight gain rate (Fig. 4) during last 6 weeks of experiment show decrease only in

HCD ZT11 by 48% ($p < 0.05$ compared with HCD), changes in HCD ZT01 was insignificant (also average index of

weight gain rate was in HCD elevated by 60% in compare with control ($p < 0.05$). These data may be suggest about more efficient influence on the body weight gain rate by melatonin evening dose.

The information about Lee index and visceral fat weight also provide that melatonin ameliorated body mass dynamic under obesity development (table 2). According to obtained results we have revealed an increase Lee index of HCD group by 7% ($p < 0.05$, 309 vs 288) compared with control rats. Study shown that Lee index in HCD ZT01 and HCD ZT11 decrease by 4% and by 4,5% respectively ($p < 0.05$) compared with HCD (297, 295 vs 309), and were similar to control level after 7 weeks of melatonin treatment. The values of relative visceral fat weight also indicate efficient action of melatonin application on body mass under high-calorie diet condition. The index of studied parameter in HCD attained values by 64% higher than controls. After melatonin use in HCD ZT01 and HCD ZT11 the relative visceral fat

weight have fall to control level, at the same time it was decrease by 38% and 46% as compared with HCD group.

Interestingly, the changes associated with body mass (weight gain, weight gain rate, BMI, Lee index, visceral fat) happend independly of food and water consumption (Fig. 5, 6). As shown the control group consumed an average of 0.247 ± 0.002 kcal/g of standard chow per day. The HCD rats ate an average of 0.337 ± 0.006 kcal/g of high-calorie food, which higher (strongly marked hyperphagia) by 37% ($p < 0.05$) than control rats. However, the rats in HCD ZT01 and HCD ZT11 ate an average of 0.327 ± 0.005 kcal/g and 0.347 ± 0.006 kcal/g of feed accordingly, which actually does not differ from the values of the HCD group, but elevated by 32% and 40% than control ($p < 0.05$). The relative daily food consumption in M ZT01 and M ZT11 were similar to control values and did not different statistically (0.258 ± 0.005 and 0.245 ± 0.003).

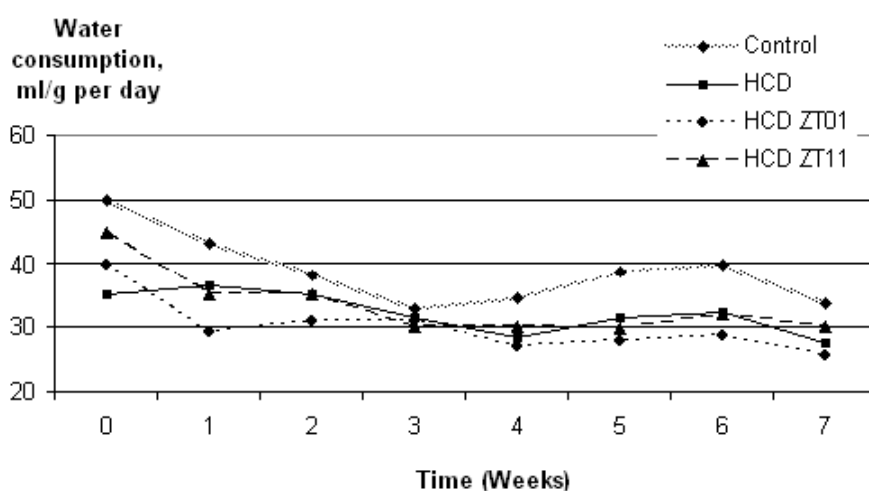


Fig. 6. Effect of melatonin treatment on relative daily water consumption

Studies have found that HCD rats consumed an average of 32.2 ± 0.4 ml/g of water per day, which is lower by 17% ($p < 0.05$), whereas control group drink 38.9 ± 0.8 ml/g. The relative daily water consumption in HCD ZT01 and HCD ZT11 were lower ($p < 0.05$) by 22% (30 ± 0.6 ml/g) and by 14% (33.4 ± 0.7 ml/g) than the control group and did not differ from HCD group values. Melatonin administration significantly did not affect water consumption in M ZT01 (39.3 ± 0.9 ml/g) and M ZT11 (39.3 ± 0.6 ml/g).

This data in agreement with other researches: after melatonin treatment (continuously in drinking water for 8 weeks in dose 100 mg/kg/day) was demonstrated significance decrease visceral fat weight in obese (ob/ob) mice, while weight gain have intermediate position compare to control and obese animals [36]. But, on the other hand, under condition of HCD the concomitant administration (continuously in drinking water) of melatonin significantly attenuated a body weight increase without affecting chow or water consumption [33, 11, 37]. These data indicate that melatonin have other mechanisms to influence on body weight – stimulates the appearance of beige adipocytes (mixed type) in white adipose tissue [38] (which are contribute to the loss of excess accumulated triacylglycerides due to heat production); normalizes circadian secretion of adipokins [39]; shows anti-inflammatory [40] and antioxidant properties [41]; involvement in the regulation of appetite and intake of food through the influence on the hypothalamus nucleus [42]. Except intermediate and lower level of weight gain after melatonin use, there are information about "no effect" – in this

studies was use reduce dose or period of administration [31, 29] (but also was shown visceral fat weight decreased), or another route of administration [43, 44].

A limitation of this study may be that no significative difference in HCD body weight gain was seen after 7 weeks of melatonin treatment; a longer duration of treatment may be needed to elicit such improvement or increased rats numbers in groups. Moreover, probably muscle weight gain would be interesting, since it have been shown raise in muscle Ferets diameters after melatonin use, which may also make contribution in body weight [45].

In the light of chronobiological question time of administration, our data suggest that evening melatonin administration improve visceral fat and body weight parameters more rapidly then morning. We hypothesized that morning dose may prolong night melatonin secretion peak to support its highest level for longer time, while evening dose was intended to raise endogenous night peak. However, weight gain, BMI, Lee index and visceral fat weight are lower and have more stronger expressed difference in HCD ZT11 then in HCD ZT01. Previous study shown the same results: melatonin effects on body weight in a model of overweight were possibly time dependent – the first melatonin administration (ZT 04) was less efficient then in ZT 11 (also reduces weight gain) [46]. Subcutaneous (or intraperitoneal) injection 2–3 h before lights-off decreased body weight and visceral fat too under influence middle dose of melatonin (1 or 4 mg/kg/day for 4 or 8 weeks) during developmental obesity [47, 48] and besides intra-

peritoneal injection in the morning at the same dose have no effect to body weight [31].

Conclusions. The application of melatonin by systemic administration led to reduction of developed obesity complication associated with body weight. If we take into consideration all studied parameters (body weight gain, weight gain rate, BMI, Lee index and related visceral fat weight), we make decision about more profitable use melatonin administration 1 h before lights-off then 1 h after lights-on. Moreover, the changes of these parameters did not connect with lower food consumption. This changes may be provide by stabilizing balance of anti- and proinflammation reaction, normalising circadian rhythm of adipokins secretion, appearing beige adipocytes, stimulating brown adipocyte differentiation, etc.

Список використаних джерел:

- Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 / M. Ng, T. Fleming, M. Robinson et al. // *The Lancet*. – 2014. – Vol. 384, № 9945. – P. 766–781.
- The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>
- Lumeng C. N. Inflammatory links between obesity and metabolic disease / C. N. Lumeng, A. R. Saltiel // *The Journal of clinical investigation*. – 2011. – Vol. 121, № 6. – P. 2111–2118.
- Visceral obesity / P. Mathieu, P. Poirier, P. Pibarot et al. // *Hypertension*. – 2009. – Vol. 53, № 4. – P. 577–584.
- McTiernan A. Obesity and cancer: the risks, science, and potential management strategies // *Oncology* (Williston Park, NY). – 2005. – Vol. 19, № 7. – P. 871–881.
- James W. P. The fundamental drivers of the obesity epidemic / W. P. James // *Obesity reviews*. – 2008. – Vol. 9, № s1. – P. 6–13.
- The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments / B. A. Swinburn, G. Sacks, K. D. Hall et al. // *The Lancet*. – 2011. – Vol. 378, № 9793. – P. 804–814.
- Reiter R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions // *Endocrine reviews*. – 1991. – Vol. 12, № 2. – P. 151–180.
- Li X. S. Seasonal adjustments in body mass and thermogenesis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*): the roles of short photoperiod and cold / X. S. Li, D. H. Wang // *Journal of Comparative Physiology B*. – 2005. – Vol. 175, № 8. – P. 593–600.
- Bartness J. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system / J. Bartness, G. E. Demas, C. K. Song // *Experimental Biology and Medicine*. – 2002. – Vol. 227, № 6. – P. 363–376.
- Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats / P. Cano Barquilla, E. S. Pagano, V. Jiménez-Ortega et al. // *Journal of pineal research*. – 2014. – Vol. 57, № 3. – P. 280–290.
- Cipolla-Neto J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review / J. Cipolla-Neto, F. G. Amaral, S. C. Afeche et al. // *Journal of pineal research*. – 2014. – Vol. 56, № 4. – P. 371–381.
- Szewczyk-Golec K. Interrelationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity / K. Szewczyk-Golec, A. Woźniak, R. J. Reiter // *Journal of pineal research*. – 2015. – Vol. 59, № 3. – P. 277–291.
- Baraldo M. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans / M. Baraldo // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. – 2008. – Vol. 4, № 2. – P. 175–192.
- Principles for circadian orchestration of metabolic pathways / K. Thurley, C. Herbst, F. Wesener et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114, № 7. – P. 1572–1577.
- Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review / N. G. Harpoe, L. P. Andersen, I. Gögenur et al. // *European journal of clinical pharmacology*. – 2015. – Vol. 71, № 8. – P. 901–909.
- Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults / N. S. Gooneratne, A. Y. Z. Edwards, C. Zhou et al. // *Journal of pineal research*. – 2012. – Vol. 52, № 4. – P. 437–445.
- Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening / P. Rubio-Sastre, F. A. Scheer, P. Gómez-Abellán et al. // *Sleep*. – 2014. – Vol. 37, № 10. – P. 1715–1719.
- The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt1 melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters / C. Schuster, F. Gauer, A. Malan et al. // *Neuroendocrinology*. – 2001. – Vol. 74, № 1. – P. 55–68.
- Masana M. I. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark / M. I. Masana, M. L. Dubocovich // *Sci. STKE*. – 2001. – Vol. 2001, № 107. – P. 39.
- Von Gall C. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction / C. Von Gall, J. H. Stehle, D. R. Weaver // *Cell and tissue research*. – 2002. – Vol. 309, № 1. – P. 151–162.
- Time-dependency for the bimodal effect of melatonin on calcium uptake in rat hypothalamus / R. E. Rosenstein, D. A. Golombek, B. Kanterewicz et al. // *Journal of neural transmission*. – 1991. – Vol. 85, № 3. – P. 243–247.
- Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms / P. A. Witt-Enderby, J. Bennett, M. J. Jarzynka et al. // *Life sciences*. – 2003. – Vol. 72, № 20. – P. 2183–2198.
- Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence / M. J. Jarzynka, D. K. Passey, D. A. Johnson et al. // *Journal of pineal research*. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 161–171.
- Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity / H. Shen, Q. Tang, J. Huang et al. // *Experimental biology and medicine*. – 2010. – Vol. 235, № 1. – P. 47–51.
- Bernardis L. L. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions / L. L. Bernardis, B. D. Patterson // *Journal of Endocrinology*. – 1968. – Vol. 40, № 4. – P. 527–528.
- Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat / T. Wolden-Hanson, D. R. Mitton, R. L. McCants et al. // *Endocrinology*. – 2000. – Vol. 141, № 2. – P. 487–497.
- Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats / M. J. Ríos-Lugo, P. Cano, V. Jiménez-Ortega et al. // *Journal of pineal research*. – 2010. – Vol. 49, № 4. – P. 342–348.
- Short-term melatonin consumption protects the heart of obese rats independent of body weight change and visceral adiposity / F. Nduhirabandi, B. Huisamen, H. Strijdom et al. // *Journal of pineal research*. – 2014. – Vol. 57, № 3. – P. 317–332.
- Baltaci A. Pinealectomy and melatonin administration in rats: their effects on plasma leptin levels and relationship with zinc / A. Baltaci, R. Mogulkoc // *Acta Biologica Hungarica*. – 2007. – Vol. 58, № 4. – P. 335–343.
- Kitagawa A. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats / A. Kitagawa, Y. Ohta, K. Ohashi // *Journal of pineal research*. – 2012. – Vol. 52, № 4. – P. 403–413.
- Blood pressure reducing effects of piromelatine and melatonin in spontaneously hypertensive rats / L. Huang, C. Zhang, Y. Hou et al. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2013. – Vol. 17, № 18. – P. 2449–2456.
- Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats / M. J. Ríos-Lugo, V. Jiménez-Ortega, P. Cano-Barquilla et al. // *Hormone molecular biology and clinical investigation*. – 2015. – Vol. 21, № 3. – P. 175–183.
- Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin / C. Agabiti-Rosei, C. De Ciuceis, C. Rossini et al. // *Journal of hypertension*. – 2014. – Vol. 32, № 6. – P. 1264–1274.
- Bartness J. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system / J. Bartness, G. E. Demas, C. K. Song // *Experimental Biology and Medicine*. – 2002. – Vol. 227, № 6. – P. 363–376.
- Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice / G. Favero, A. Stacchiotti, S. Castrezzati et al. // *Nutrition Research*. – 2015. – Vol. 35, № 10. – P. 891–900.
- Puchalski S. S. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age / S. S. Puchalski, J. N. Green, D. D. Rasmussen // *Endocrine*. – 2003. – Vol. 21, № 2. – P. 163–167.
- Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats / A. Jiménez-Ortega, G. Fernández-Vázquez, D. Campos et al. // *Journal of pineal research*. – 2013. – Vol. 55, № 4. – P. 416–423.
- Song Y. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice / Y. Song, M. Chen // *Acta Biologica Hungarica*. – 2009. – Vol. 60, № 4. – P. 399–407.
- A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives / J. L. Mauriz, P. S. Collado, C. Veneroso et al. // *Journal of pineal research*. – 2013. – Vol. 54, № 1. – P. 1–14.
- Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats / G. Tahan, R. Gramignoli, F. Marongiu et al. // *Digestive diseases and sciences*. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 715–720.
- Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio* / C. C. Piccinetti, B. Migliarini, I. Olivetto et al. // *Hormones and behavior*. – 2010. – Vol. 58, № 5. – P. 780–785.
- Zaitone S. Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease

/ S. Zaitone, N. Hassan, N. El-Orabi [et al.] // European journal of pharmacology. – 2011. – Vol. 662, № 1. – P. 70-77.

44. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice / G. Şener, J. Balkan, U. Çevikbaş et al. // Journal of pineal research. – 2004. – Vol. 36, № 3. – P. 212–216.

45. Kalmukova O. Melatonin improves skeletal muscles morphology and metabolism in high-calorie diet-induced obesity rat model / O. Kalmukova, O. Savchuk, M. Dzerzhinsky // Third Kyiv International Symposium "Smooth Muscles Physiology, Biophysics and Pharmacology". – Kyiv–Lutsk, Ukraine, 18–22 September 2017. – P. 70.

46. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity / B. Prunet-Marcassus, M. Desbazeille, A. Bros et al. // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144, № 12. – P. 5347–5352.

47. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model / M. R. Hussein, O. G. Ahmed, A. F. Hassan et al. // International journal of experimental pathology. – 2007. – Vol. 88, № 1. – P. 19–29.

48. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats / M. She, X. Deng, Z. Guo et al. // Pharmacological research. – 2009. – Vol. 59, № 4. – P. 248–253.

References:

1. Fleming T., Robinson M., Thomson B., Graetz N., Margono C., et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The lancet. 2014; 384(9945): 766-781.

2. The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>

3. Lumeng C., Saltiel A. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 2011; 121: 2111–2118.

4. Mathieu P., Poirier P., Pibarot P., Lemieux I., Després JP. Visceral obesity the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. Hypertension. 2009; 53(4): 577–584.

5. McTiernan A. Obesity and cancer: the risks, science, and potential management strategies. Oncology 2005; 19(7): 871–881.

6. James W. The fundamental drivers of the obesity epidemic. Obes Rev. 2008 Mar;9(s1) Suppl 1:6–13.

7. Swinburn Bio, Sacks G., Hall K., McPherson K., Finegood D., Moodie M, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet. 2011 Aug 27;378(9793):804–14.

8. Reiter R. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev. 1991; 12(2):151–180.

9. Wang D. Seasonal adjustments in body mass and thermogenesis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*): the roles of short photoperiod and cold. Journal of Comparative Physiology B. 2005; 175(8): 593-600.

10. Bartness T., Demas G., Song C. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. Experimental Biology and Medicine. 2002; 227(6): 363-376.

11. Cano Barquilla P., Pagano E., Jiménez-Ortega V., Fernández-Mateos P., Esquifino A., Cardinali D. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. Journal of pineal research. 2014; 57(3): 280-290.

12. Cipolla-Neto J., Amaral F., Afeche S., Tan D., Reiter R. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. Journal of pineal research. 2014; 56(4): 371-381.

13. Szewczyk-Golec K., Woźniak A., Reiter R. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity. Journal of pineal research. 2015; 59(3): 277-291.

14. Baraldo M. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2008; 4(2): 175-192.

15. Thurley K., Herbst C., Wesener F., Koller B., Wallach T., Maier B., et al. Principles for circadian orchestration of metabolic pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017; 114(7): 1572-1577.

16. Harpsøe N., Andersen L., Gögenur I., Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. European journal of clinical pharmacology. 2015; 71(8): 901-909.

17. Gooneratne N., Edwards A., Zhou C., Cuellar N., Grandner M., Barrett J. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. J. Pineal Res. 2012; 52(4): 437–445.

18. Rubio-Sastre P., Scheer F., Gómez-Abellán P., Madrid J., Garaulet M. Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening. Sleep. 2014; 37(10): 1715-1719.

19. Schuster C., Gauer F., Malan A. Recio J., Pevet P., Masson-Pevet M. The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. Neuroendocrinology. 2001; 74(1): 55–68.

20. Masana M., Dubocovich M. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. Sci. STKE 2001; 2001 (107):39.

21. Von Gall C., Stehle J., Weaver D. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. Cell and Tissue Research. 2002; 309(1): 151–62.

22. Rosenstein R., Golombek D., Kanterewicz B., Cardinali D. Time-dependency for the in vitro effect of melatonin on calcium uptake in rat hypothalamus. J. Neural Transm., Gen. Sect. 1991; 85(3): 243–247.

23. Witt-Enderby P., Bennett J., Jarzynka M., Firestone S., Melan M. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. Life sciences. 2003; 72(20): 2183-2198.

24. Jarzynka M., Passey D., Johnson D., Konduru N., Fitz N., Radio N., et al. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. Journal of pineal research. 2009; 46(2): 161-171.

25. Shen X., Tang Q., Huang J., Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. Experimental biology and medicine. 2010; 235(1): 47-51.

26. Bernardis L., Patterson B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. Journal of Endocrinology. 1968;40(4): 527-528.

27. Wolden-Hanson T., Mitton D., McCants R., Yellon S., Wilkinson C., Matsumoto A., et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. Endocrinology. 2000; 141(2): 487-497.

28. Ríos-Lugo M., Cano P., Jiménez-Ortega V., Fernández-Mateos M., Scacchi P., Cardinali D., et al. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. Journal of pineal research. 2010; 49(4): 342-348.

29. Nduhirabandi F., Huisamen B., Strijdom H., Blackhurst D., Lochner A. Short-term melatonin consumption protects the heart of obese rats independent of body weight change and visceral adiposity. Journal of pineal research. 2014; 57(3): 317-332.

30. Baltaci A., Mogulkoc R. Pinealectomy and melatonin administration in rats: their effects on plasma leptin levels and relationship with zinc. Acta Biologica Hungarica. 2007; 58(4): 335-343.

31. Kitagawa A., Ohta Y., Ohashi K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. Journal of pineal research. 2012; 52(4): 403-413.

32. Huang L., Zhang C., Hou Y., Laudon M., She M., Yang S. et al. Blood pressure reducing effects of piromelatonin and melatonin in spontaneously hypertensive rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013; 17(18): 2449-56.

33. Ríos-Lugo M., Jiménez-Ortega V., Cano-Barquilla P., Mateos P., Spinedi E., Cardinali D. et al. Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. Hormone molecular biology and clinical investigation. 2015; 21(3): 175-183.

34. Agabiti-Rosei C., De Ciuceis C., Rossini C., Porteri E., Rodella L. F., Withers S. B. et al. Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin. Journal of hypertension. 2014; 32(6): 1264-1274.

35. Bartness T., Demas G., Song C. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. Experimental Biology and Medicine. 2002; 227(6): 363-376.

36. Favero G., Stacchiotti A., Castrezzati S., Bonomini F., Albanese M., Rezzani R. et al. Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice. Nutrition Research. 2015; 35(10): 891-900.

37. Puchalski S., Green J., & Rasmussen D. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. Endocrine. 2003; 21(2): 163-167.

38. Jiménez-Aranda A., Fernández-Vázquez G., Campos D., Tassi M., VelascoPerez L., Tan D. et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. Journal of pineal research. 2013; 55(4): 416-423.

39. Song Y., Chen M. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice. Acta Biologica Hungarica. 2009; 60(4): 399-407.

40. Mauriz J., Collado P., Veneroso C., Reiter R., González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. Journal of pineal research. 2013; 54(1): 1-14.

41. Tahan G., Gramignoli R., Marongiu F., Aktolga S., Cetinkaya A., Tahan V., et al. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. Digestive diseases and sciences. 2011; 56(3): 715-720.

42. Piccinetti C., Migliarini B., Olivetto I., Coletti G., Amici A., Carnevali O. Appetite regulation: the central role of melatonin in Danio rerio. Hormones and behavior. 2010; 58(5): 780-785.

43. Zaitone S., Hassan N., El-Orabi N., El-Adawy E. Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease. European journal of pharmacology. 2011; 662(1): 70-77.

44. Şener G., Balkan J., Çevikbaş U., Keyer-Uysal M., Uysal M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. Journal of pineal research. 2004; 36(3): 212-216.

45. Kalmukova O., Savchuk O., Dzerzhinsky M. Melatonin improves skeletal muscles morphology and metabolism in high-calorie diet-induced obesity rat model / Third Kyiv International Symposium "Smooth Muscles Physiology, Biophysics and Pharmacology", Kyiv – Lutsk, Ukraine, 18-22 September 2017. – p. 70.

46. Prunet-Marcassus B., Desbazeille M., Bros A., Louche K., Delagrangre P., Renard P. et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003; 144(12): 5347-5352.

47. Hussein M., Ahmed O., Hassan A., Ahmed M. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *International journal of experimental pathology*. 2007; 88(1): 19-29.

48. She M., Deng X., Guo Z., Laudon M., Hu., Liao D. et al. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacological research*. 2009; 59(4): 248-253.

Надійшла до редколегії 03.10.17

О. Калмыкова, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук,

І. Варенюк, канд. біол. наук, М. Дзержинський, д-р біол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЭФФЕКТ РІЗНИХ РЕЖИМІВ УВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ НА РОЗВИТОК ОЖИРІННЯ У ЩУРІВ, ІНДУКОВАНОГО ВИСОКОКАЛОРИЙНОЮ ДІЄТОЮ

Останніми роками велика увага приділяється вивченню можливостей використання мелатоніну для покращення стану, викликаного ускладненнями при ожирінні. Мета нашого дослідження полягала у визначенні впливу різного часу введення мелатоніну на зміну ваги тіла у щурів з ожирінням, викликаним висококалорійною дієтою. Застосування мелатоніну в дозі 30 мг/кг протягом 7 тижнів приводило до зниження маси висцерального жиру, індексу ЛІ (як після ранкового, так і вечірнього введення) та швидкості приросту тіла (тільки після вечірньої дози).

Ключові слова: мелатонін, ожиріння, висококалорійна дієта, хронобіологія.

О. Калмыкова, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук,

І. Варенюк, канд. біол. наук, Н. Дзержинский, д-р биол. наук

УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЭФФЕКТ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА НА РАЗВИТИЕ ОЖИРЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО ВИСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ

В последние годы большое внимание уделяется изучению возможностей использования мелатонина для улучшения состояния, вызванного осложнениями при ожирении. Цель нашего исследования заключалась в определении влияния разного времени введения мелатонина на изменение веса тела у крыс с ожирением, вызванным высококалорийной диетой. Применение мелатонина в дозе 30 мг/кг в течение 7 недель приводило к снижению массы висцерального жира, индекса ЛИ (как после утреннего, так и вечернего введения) и скорости прироста тела (только после вечерней дозы).

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, высококалорийная диета, хронобиология.

УДК: 612.8

С. Гончаревський, асп., М. Макачук, д-р біол. наук, В. Мартинюк, д-р біол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ТЕМПЕРАТУРА РЕПРЕЗЕНТАТИВНИХ ЗОН ГРУДНОГО ВІДДІЛУ ВЕГЕТАТИВНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ, ЯК ПОКАЗНИК ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ

Досліджено температурні варіації репрезентативних зон грудного відділу вегетативної нервової системи шкіри людини після перенесеного інфаркту. Дослідження проводилось за допомогою вимірювання температури інфрачервоним термометром нового покоління Medisana FTO D-53340. У дослідженні брали участь 40 осіб, 20 з яких мали Q-інфаркт міокарда лівого шлуночка, а інші – ні.

Показано наявність різниці температурних коефіцієнтів у репрезентативних зонах ($p < 0,05$). Для лівої сторони хребта притаманна різниця у сегментах Th1–Th5, що підтверджує діагноз: Th1 – $0,93 \pm 1,12$ (контроль) та $-0,79 \pm 7,49$ (дослід), Th2 – $1,57 \pm 1,12$ та $-0,48 \pm 6,70$, Th3 – $1,58261 \pm 1,12325$ та $-0,66 \pm 3,36$, Th4 – $0,85913 \pm 0,92611$ та $-1,7 \pm 4,64$, Th5 – $0,92348 \pm 0,75469$ та $-1,61 \pm 5,73$ відповідно.

Для правої сторони – Th6 – $0,85 \pm 0,73$ (контроль) та $-0,79 \pm 7,49$ (дослід), Th7 – $-1,00 \pm 0,79$ та $-1,37 \pm 0,69$, Th8 – $-0,96 \pm 0,73$ та $-0,99 \pm 0,68$, Th9 – $-0,12 \pm 0,64$ та $-0,38 \pm 0,83$, Th10 – $-0,92 \pm 1,14$ та $-1,03 \pm 1,00$, Th11 – $-1,69 \pm 1,05$ та $-1,86 \pm 1,06$, Th12 – $-1,65 \pm 1,15$ та $-1,96 \pm 1,12$ відповідно.

Ключові слова: вегетативна нервова система, репрезентативні зони, температура, інфаркт.

Вступ. Нині розвиваються різні методи дослідження локальної температури тіла – інфрачервона термометрія, тепловачення, радіотермометрія та ін. І хоча ці методи мають безліч незаперечних переваг, вони не знайшли ще досить широкого застосування у клінічній практиці. Висока чутливість і абсолютна безпека локальної термометрії (немає жодного впливу на пацієнта) робить цей метод незамінним як перший етап профілактичних та діагностичних обстежень, як метод моніторингу та контролю ефективності лікування багатьох захворювань [1].

Для кращого розуміння можливостей термодіагностики та її місця в діагностичному і лікувальному процесі необхідне знання нормальних і патологічних причин зміни локальної температури тіла.

Багато патологічних процесів змінюють нормальний розподіл температури на поверхні тіла, причому, у багатьох випадках локальні зміни температури випереджають інші клінічні прояви, що дуже важливо для ранньої діагностики та своєчасного лікування [2, 3].

На відміну від більшості застосовуваних у сучасній медицині методів обстеження, інфрачервона термометрія і тепловачення задовольняють критерії діагностичних методів, які можуть застосовуватися для профілактичного обстеження [4].

Жоден з існуючих сьогодні діагностичних методів не має такої широти діагностичного діапазону. Це дає можливість застосовувати тепловізор та інфрачервоний термометр для обстеження будь-яких контингентів населення для цілей експрес-діагностики величезної кількості захворювань [5].

Враховуючи це, доцільно провести поглиблений порівняльний аналіз температури відповідних репрезентативних точок вегетативної нервової системи у хворих та умовно здорових обстежуваних.

Матеріали та методи досліджень. Аналіз стану вегетативних гангліїв грудного відділу хребта, які пов'язані з функціональною активністю окремих органів та систем організму людини, проводили згідно із [6] за температурними показниками:

- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th1, що функціонально пов'язаний із легеньми та трахеями;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th2, що функціонально пов'язаний із серцем та коронаріями;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th3, що функціонально пов'язаний із легеньми та бронхами;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th4, що функціонально пов'язаний із жовчним міхуром;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th5, що функціонально пов'язаний із печінкою;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th6, що функціонально пов'язаний зі шлунком;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th7, що функціонально пов'язаний із підшлунковою залозою та дванадцятипалою кишкою;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th8, що функціонально пов'язаний із селезінкою;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th9, що функціонально пов'язаний із наднирковими залозами;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th10, що функціонально пов'язаний із нирками;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th11, що функціонально пов'язаний із нирками та сечоводами;
- білатеральні температурні показники симпатичних гангліїв ВНС сегмента Th12, що функціонально пов'язаний із тонким та товстим кишківником;

Температуру в репрезентативних ділянках шкіри людини вимірювали інфрачервоним термометром фірми Medisana FTO D-53340, із похибкою приладу 0,1 °C. Прилад вимірює температуру на основі реест-

рації потоку інфрачервоного випромінювання, яке генерується у шкірі людини відповідно до температури тієї частини тіла, з якої реєструються температурні показники [7, 8].

Контрольною групою були студенти ННЦ "Інститут біології" віком 18–20 років (20 людей), а контрольною – люди віком 55–65 років із Q-інфарктом міокарда лівого шлуночка (20 людей).

Температура вегетативних гангліїв аналізувалась у програмному продукті Sofuso 3.1. і вираховувались коефіцієнти відхилення від норми. Коридори норми можна представити в такому вигляді:

1. Від –1 до 1 – норма.
2. Від –2 до –1 та від 1 до 2 – функціональне навантаження.
3. Від –3 та нижче та від 3 та вище – гіпо- або гіперфункція.

Статистичну обробку даних проводили у програмі Statistica 8.1, де визначали середні значення, похибки, а також створювали графічне відображення даних (рис. 1, 2, 3). Використовували критерій Шапіро-Вілکا при перевірці отриманих даних на відповідність закону нормального розподілу. Для оцінювання достовірності змін використовували непараметричні критерії Манна – Вітні та Вілкоксона [9].

Результати та їх обговорення. У здорових обстежуваних в усіх репрезентативних зонах температурні показники не підлягали нормальному закону розподілу, тоді як у хворих температурні показники в усіх точках грудного відділу підлягали нормальному закону розподілу. Це вказує на залучення у хворих додаткових компенсаторних механізмів, дія яких направлена на відновлення гомеостазу. Факт залучення додаткових систем може бути підтверджений теорією математичного аналізу даних [10] і є свідченням того, що варіабельність значень цієї температурної ознаки обумовлена дією багатьох причин або факторів, кожен з яких вносить мінімальний вклад. Іншими словами, такі температурні показники можуть бути пов'язані з діяльністю декількох систем організму.

Порівняльний аналіз температури хворих та здорових обстежуваних показав достовірно вище ($p < 0.05$) коефіцієнтне значення температури на лівій стороні хребта (Th1–Th5) у хворих, ніж у здорових. Th1 – $0,93 \pm 1,12$ (контроль) та $-0,79 \pm 7,49$ (дослід), Th2 – $1,57 \pm 1,12$ та $-0,48 \pm 6,70$, Th3 – $1,58261 \pm 1,12325$ та $-0,66 \pm 3,36$, Th4 – $0,85913 \pm 0,92611$ та $-1,7 \pm 4,64$, Th5 – $0,92348 \pm 0,75469$ та $-1,61 \pm 5,73$ відповідно. В інших зонах достовірної різниці відсутня (рис 1). Цей факт вказує на більш високу активність цієї зони, яка пов'язана з серцевою патологією у досліджуваної групи.

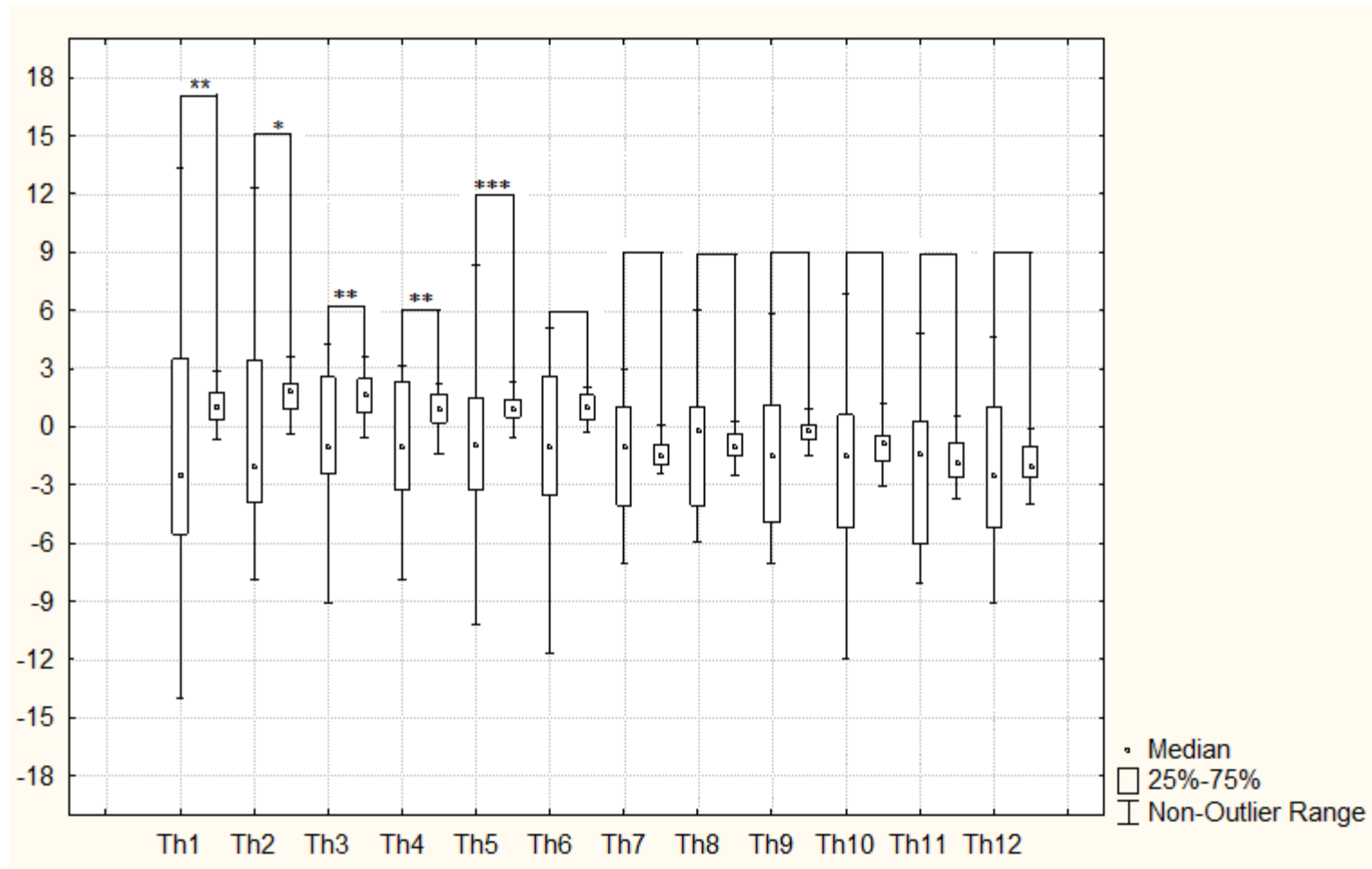


Рис. 1. Графічне зображення різниці отриманих результатів для симпатичних гангліїв із лівої сторони хребта у досліджуваної та контрольної груп

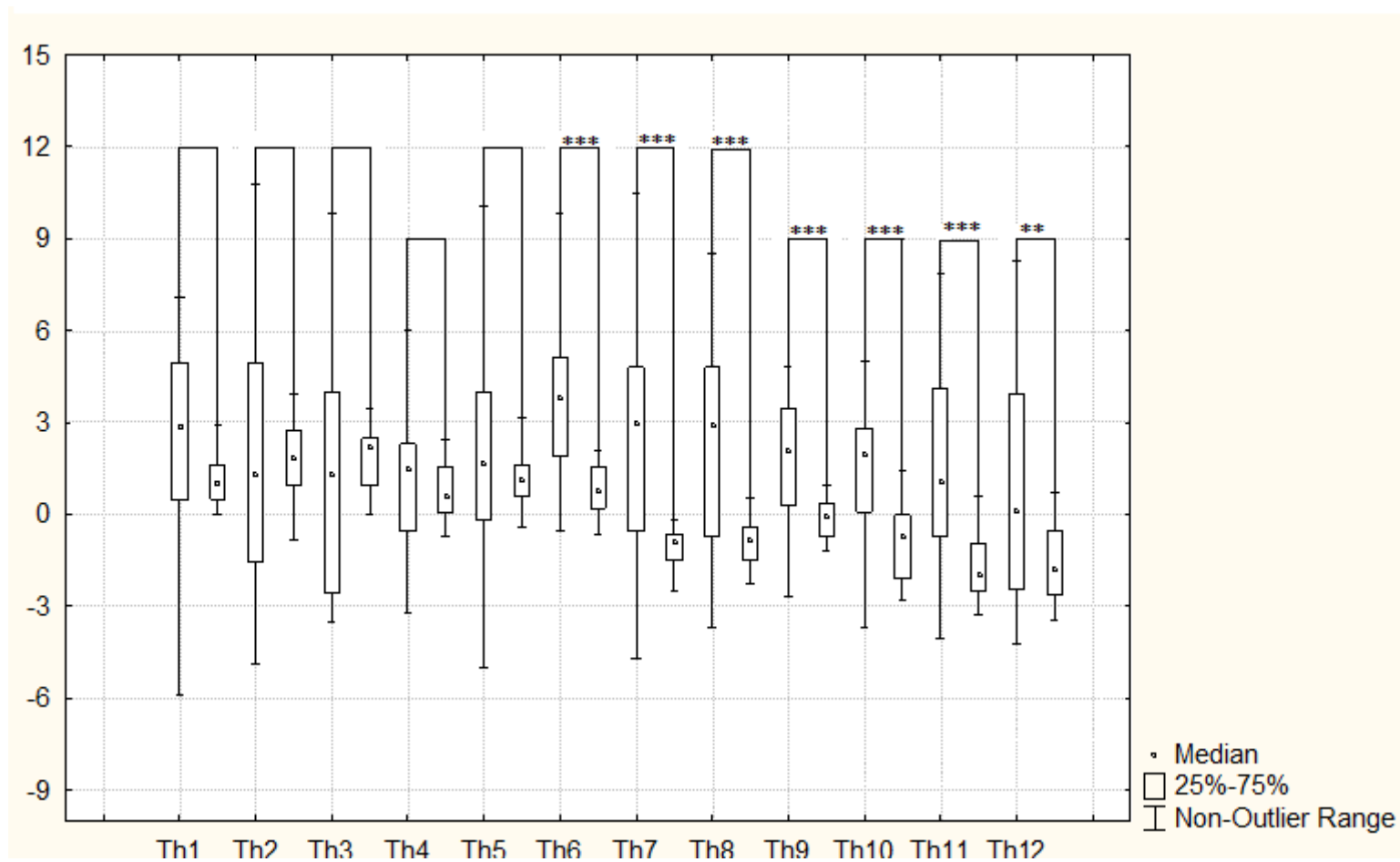


Рис. 2. Графічне зображення отриманих результатів для симпатичних гангліїв із правої сторони хребта для контрольної та досліджуваної груп

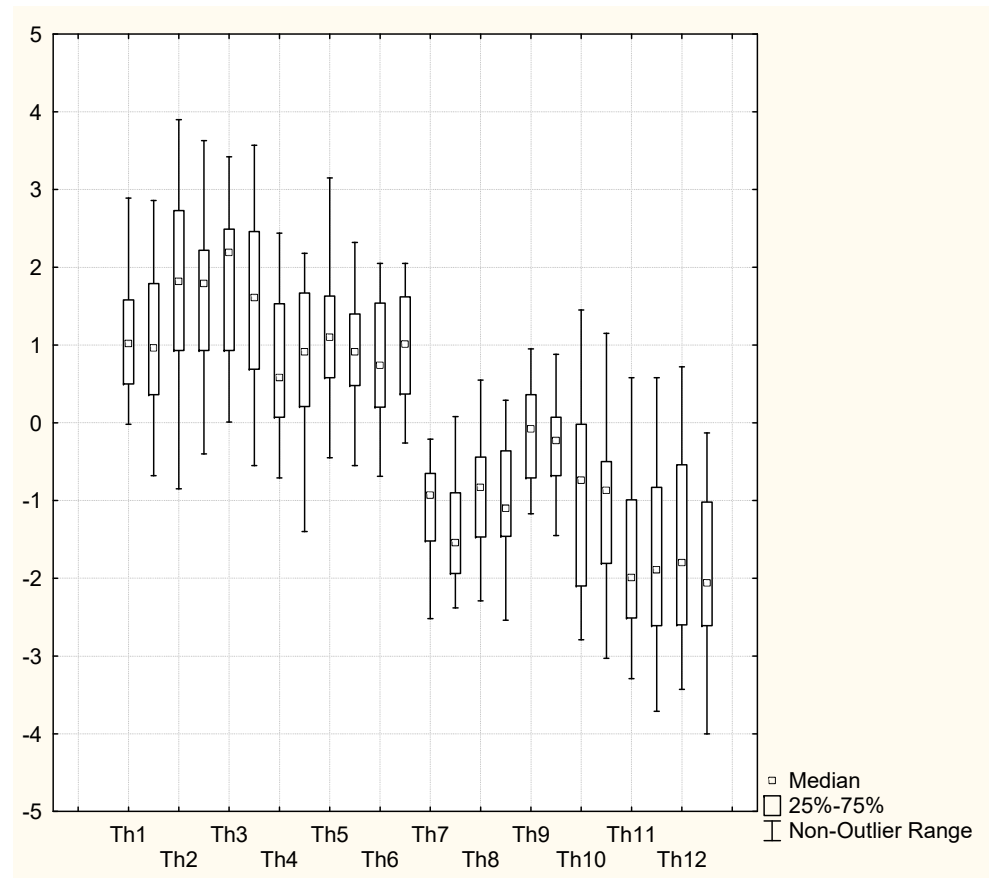
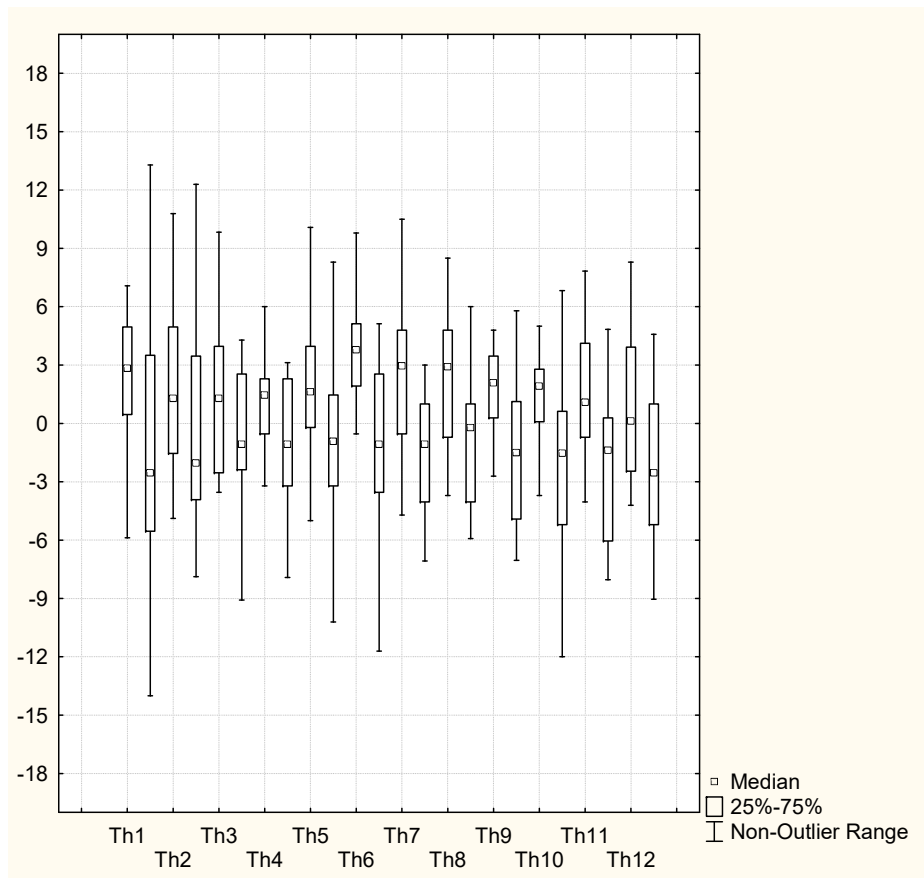


Рис. 3. Графічне зображення асиметрії у контрольної та досліджуваної груп (А – досліджувана, Б – контрольна)

Достовірна різниця ($p < 0.05$) температури на правій стороні хребта (рис. 2) також була представлена, але в інших сегментах (Th6–Th12). Th6 – $0,85 \pm 0,73$ (контроль) та $-0,79 \pm 7,49$ (дослід), Th7 – $-1,00 \pm 0,79$ та $-1,37 \pm 0,69$, Th8 – $-0,96 \pm 0,73$ та $-0,99 \pm 0,68$, Th9 – $-0,12 \pm 0,64$ та $-0,38 \pm 0,83$, Th10 – $-0,92 \pm 1,14$ та $-1,03 \pm 1,00$, Th11 – $-1,69 \pm 1,05$ та $-1,86 \pm 1,06$, Th12 – $-1,65 \pm 1,15$ та $-1,96 \pm 1,12$ відповідно. Наявність різниці у цих сегментах може свідчити про компенсаторні механізми, що проходять у досліджуваних під час реабілітації після отриманого інфаркту (розподіл навантаження на різні сегменти хребта, а не концентрація лише в одній зоні).

Для контрольної групи в цілому не притаманна температура асиметрія між правою та лівою сторонами хребта, що свідчить про нормальне функціонування грудного відділу хребта.

Зауважимо, що наявність температурної асиметрії у досліджуваної групи впродовж тривалого часу може призвести до загальної дисфункції грудного відділу хребта та організму в цілому.

Висновки. У досліджуваної групи спостерігається відхилення від норми температури в перших п'ятих сегментах грудного відділу хребта з лівої сторони, що підтверджує діагноз.

Із правої сторони хребта спостерігається відхилення в останніх сімох сегментах, що може свідчити про компенсаторні механізми регуляції функціонування досліджуваної системи. У зв'язку з таким розподілом відхилень виникає температурна асиметрія, наявність якої впродовж тривалого періоду може негативно вплинути на організм.

Загалом, це дає підставу сподіватись, що використовуючи значення температурних відхилень у репрезентативних зонах різних відділів вегетативної нервової системи, ми зможемо характеризувати енергетичні процеси в різних фізіологічних системах організму, таких як серцево-судинній, системі дихання, травлення та інших, що і стане подальшою темою наших наукових пошуків.

Список використаних джерел:

1. Место и роль дистанционной инфракрасной термографии среди современных диагностических методов / Ю. П. Дехтярев, В. И. Нечипорук, С. А. Мироненко и др. // Электроника и связь. Тематич. вып. "Электроника и нанотехнологии". – 2010. – № 2. – С. 192–196.
2. Gabella G. Structure of the autonomic nervous system / G. Gabella // London : Chapman and Hall. – 2006. – 312 p.
3. Knobel R. B. Thermoregulation and thermography in neonatal physiology and disease / R. B. Knobel, B. D. Guenther, H. E. Rice // Biological research for nursing. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – P. 274–282.

4. Janig W. C. The autonomic nervous system in health and disease: neurobiology and pathophysiology / W. C. Janig, C. M. Brooks // J. auton. Nerv. Syst. – 2003. – 415 p.

5. Иваницкий Т. П. Температурные показатели тепловой "машины" человека / Т. П. Иваницкий // IX Международная школа-конференция "Биология – наука XXI века." – Пушкино, 2005. – С. 9.

6. Седокова М. Л. Возрастная анатомия и физиология / М. Л. Седокова, Л. Ф. Казимова, Т. А. Томова ; под ред. С. В. Низкодубовой. – Томск : Изд-во ТГПУ. – 2009. – 331 с.

7. Факторний аналіз температури репрезентативних точок вегетативної нервової системи людини / Л. І. Остапченко, М. Ю. Макачук, О. С. Мартинчук, Л. А. Криворучко // Фізика живого. – 2007. – Т. 15. – С. 37–49.

8. Спосіб діагностики стану організму людини : деклараційний патент на корисну модель № 3932 (7 A61N39/00) / Л. І. Остапченко, М. Ю. Макачук, О. С. Мартинчук, Л. А. Криворучко. – Від 15.12.2004 р.

9. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до заasad науково обґрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь, Т. С. Михайлова // Медицина залізничного транспорту України. – 2004. – № 4. – С. 30–38.

10. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до заasad науково обґрунтованої медицини. Порівняння груп за кількісними показниками / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь // Медицина транспорту України. – 2005. – № 4. – С. 86–93.

References:

1. Dehtyarev Yu., Nepochoruk V., Mironenko S. i dr. Mesto i rol distantsionnoy infrakrasnoy termografii sredi sovremennykh diagnosticheskikh metodov // Elektronika i svyaz. Tematicheskiy vypusk "Elektronika i nanotekhnologii". – 2010. – # 2. – S. 192–196. In Russian.
2. Gabella G. Structure of the autonomic nervous system. London. Chapman and Hall. – 2006. – 312 p.
3. Knobel R., Guenther B., Rice H. Thermoregulation and thermography in neonatal physiology and disease. // Biological research for nursing. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – P. 274–282.
4. Janig W., Brooks C. The autonomic nervous system in health and disease: neurobiology and pathophysiology. J. auton. Nerv. Syst. – 2003. – 415 p.
5. Ivanitskiy T. Temperaturnye pokazateli teplovy "mashiny" cheloveka / IX Mezhdunarodnaya shkola-konferentsiya "Biologiya – nauka XXI veka."-Pushchino, 2005- S.9. In Russian.
6. Sedokova, M. Vozrastnaya anatomiya i fiziologiya / M. L. Sedokova, L. F. Kazionova, T. A. Tomova ; pod red. S. V. Nizkodubovoy. – Tomsk: Izdatelstvo TGPU. – 2009. – 331 s. In Russian.
7. Ostapchenko L., Makarchuk M., Martynchuk O., Kryvoruchko L. Faktornyy analiz temperatury reprezentativnykh tochkov vehetatyvnoyi nervovoyi systemy lyudyny // Fizyka zhyvoho – 2007. T.15. – S. 37. – 49. In Ukraine.
8. Ostapchenko L., Makarchuk M., Martynchuk O., Kryvoruchko L. "Sposib diahnostyky stanu orhanizmu lyudyny" Deklaratsiynny patent na korysnu model' #3932 (7 A61N39/00) vid 15.12.2004 r. In Ukraine.
9. Filimonova N., Fil I., Mikhailova T. (2004). Statistical analysis of data pursuant to the science-based medicine. Initial analysis of quantitative data, experimental results presentation. Medytyna zaliznychnoho transportu Ukrayiny (Medicine Railway Transport of Ukraine), 4, 30-38. In Ukraine.
10. Filimonova N., Fil I. (2005). Statistical analysis of data pursuant to the science-based medicine. Comparison groups in quantitative terms. Medytyna transportu Ukrayiny (Medicine Transport of Ukraine), 4, 86-93. In Ukraine.

Надійшла до редколегії 02.10.17

С. Гончаревский, асп., Н. Макачук, д-р биол. наук, В. Мартынюк, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ТЕМПЕРАТУРА РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫХ ЗОН ГРУДНОГО ОТДЕЛА ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Исследованы температурные вариации репрезентативных зон грудного отдела вегетативной нервной системы кожи человека после перенесенного инфаркта. Исследование проводилось с помощью измерения температуры инфракрасным термометром нового поколения Medisana FTO D-53340. В исследовании участвовали 40 человек, 20 из которых имели Q-инфаркт миокарда левого желудочка, а остальные – нет. Показано наличие разницы температурных коэффициентов в репрезентативных зонах ($p < 0,05$). Для левой стороны позвоночника присуща разница в сегментах Th1–Th5, что подтверждает диагноз: Th1 – $0,93 \pm 1,12$ (контроль) и $-0,79 \pm 7,49$ (эксперимент), Th2 – $-1,57 \pm 1,12$ и $-0,48 \pm 6,70$, Th3 – $-1,58 \pm 1,12$ и $-0,66 \pm 3,36$, Th4 – $-0,859 \pm 1,12$ и $-1,7 \pm 4,64$, Th5 – $-0,923 \pm 1,12$ и $-1,61 \pm 5,73$ соответственно. Для правой стороны грудного отдела позвоночника: Th6 – $0,85 \pm 0,73$ (контроль) и $-0,79 \pm 7,49$ (эксперимент), Th7 – $-1,00 \pm 0,79$ и $-1,37 \pm 0,69$, Th8 – $-0,96 \pm 0,73$ и $-0,99 \pm 0,68$, Th9 – $-0,12 \pm 0,64$ и $-0,38 \pm 0,83$, Th10 – $-0,92 \pm 1,14$ и $-1,03 \pm 1,00$, Th11 – $-1,69 \pm 1,05$ и $-1,86 \pm 1,06$, Th12 – $-1,65 \pm 1,15$ и $-1,96 \pm 1,12$ соответственно.

Ключевые слова: вегетативная нервная система, репрезентативные зоны, температура, инфаркт.

Goncharevskiy S., PhD stud., Makarchyk M., DSc, V. Martynyuk, DSc
ESC "Institute of biology and medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

TEMPERATURE OF REPRESENTATIVE AREAS OF THE BREAST DEPARTMENT OF THE VEGETATIVE NERVOUS SYSTEM, AS THE INDEX OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE HUMAN BIRTH ORGANISM

Almost all processes in the human body in one way or another connected with the autonomic nervous system. That's why it is real to evaluate the functional state of the person by temperature characteristics of representative points of the autonomic nervous system. Location and information of these points are confirmed by fundamental research. However, simply measuring the temperature at some points may not be sufficient to establish any systematic changes in the human body. The establishment of such changes requires systematic assessment of interdependent significant relationships between these parameters. The main aim of our research was to study effects of myocardial infarction in the thoracic region of the autonomic nervous system. The temperature of representative areas of the thoracic autonomic nervous system we measured by infrared thermometer (Medisana FTO D-53340, with an accuracy of 0.1 degree Celsius). Statistical analysis was conducted in the packet Statistics 10. The presence of a difference in the temperature coefficients of representative areas ($p < 0,05$). For the left side of the spine characterized by a difference in Th1–Th5 segments, which confirms their diagnosis: Th1 – $0,93 \pm 1,12$ (control) and $-0,79 \pm 7,49$ (experiment), Th2 – $1,57 \pm 1,12$ and $-0,48 \pm 6,70$, Th3 – $1,58261 \pm 1,12325$ and $-0,66 \pm 3,36$, Th4 – $0,85913 \pm 0,92611$ and $-1,7 \pm 4,64$, Th5 – $0,92348 \pm 0,75469$ and $-1,61 \pm 5,73$ respectively.

For the right side of the thoracic spines: Th6 – $0,85 \pm 0,73$ (control) and $-0,79 \pm 7,49$ (experiment), Th7 – $-1,00 \pm 0,79$ and $-1,37 \pm 0,69$, Th8 – $-0,96 \pm 0,73$ and $-0,99 \pm 0,68$, Th9 – $-0,12 \pm 0,64$ and $-0,38 \pm 0,83$, Th10 – $-0,92 \pm 1,14$ and $-1,03 \pm 1,00$, Th11 – $-1,69 \pm 1,05$ and $-1,86 \pm 1,06$, Th12 – $-1,65 \pm 1,15$ and $-1,96 \pm 1,12$ respectively. We found that myocardial infarction is manifested in the thoracic spine. In an experimental group there is significant difference of temperature in all segments. We can also notice asymmetry of temperature between the right and left side of the spine. In the test group there are a deviation from the normal temperature in the first five thoracic segments on the left side, which confirms their diagnosis. On the right side of the spine there are a deviation in the last seven segments, which may indicate the compensatory mechanisms of regulation of the system. We can observe the temperature asymmetry, which in long-term exposure can negatively affect to the body.

Key words: autonomic nervous system, representative areas, temperature, heart attack.

УДК 577.217.5

В. Засць, канд. біол. наук, О. Цуварєв, асп.,
О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Л. Коломієць, в. о. наук. співроб.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

БАКТЕРІАЛЬНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНОГО N-КІНЦЕВОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ *B. TAURUS*

Проведено клонування в експресуючий вектор pET23d(+) кДНК, кодуєщої N-кінцевий каталітичний модуль тирозил-тРНК синтетази (міні TyrRS) *Bos taurus*. Експресовано у клітинах *E. coli* BL21(DE3)pLysE та виділено високоочищений рекомбінантний білок міні TyrRS із використанням сконструйованого експресуючого вектора pET-23d(+)39YRS для фізико-хімічних досліджень. Досліджено каталітичну активність рекомбінантної міні TyrRS у реакції аміноацилювання гомологічної тРНК.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, міні TyrRS, клонування, бактеріальна експресія.

Вступ. Розробка та впровадження у клінічну практику нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків є пріоритетним напрямом сучасної біотехнології [1]. Нині для отримання рекомбінантних білків існує декілька гетерологічних експресійних систем, заснованих на використанні клітинних ліній ссавців, клітин дріжджів і бактерій, а також бакуловірусних систем на основі клітинних ліній комах [2]. Серед них найуживанішою є бактеріальна система *E. coli*. Експресія білків в *E. coli* є простим, швидким і недорогим методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у препаративних кількостях у нативному стані, що є необхідною умовою для їх упровадження в біотехнологічне виробництво [3–5].

Одним із перспективних об'єктів для використання як лікарських препаратів є тирозил-тРНК синтетаза ссавців. Аміноацил-тРНК синтетаза (TyrRS) є ключовим ферментом білоксинтезуючого апарату клітини. На дорібосомному етапі трансляції у високоспецифічній енергозалежній реакції синтетаза каталізує активацію спорідненої амінокислоти та приєднання її до гомологічної транспортної РНК, здійснюючи таким чином першу стадію декодування інформації про структуру білка, закладену в нуклеотидній послідовності ДНК та РНК [6].

Тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* (528 амінокислотних залишків (а. з.), 59,2 кДа) складається із двох структурних одиниць, N-кінцевого каталітичного (відповідає вкороченій формі ферменту міні TyrRS, 342 а. з., 39 кДа) та С-кінцевого цитокіноподібного (166 а. з., 20 кДа) модулів. У повнорозмірній TyrRS N-кінцевому модулю, який містить у своїй структурі згортку Россма-

на, притаманна повна каталітична функція зв'язування амінокислоти із тРНК, тоді як С-модуль коригує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі ферменту [7]. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні TyrRS та С-модуль, останній проявляє цитокінові властивості, стимулюючи активність тканинного фактора некрозу пухлини TNF α та міграцію поліморфноядерних нейтрофілів [8, 9].

У фізіологічних умовах тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* являє собою гомодимер α_2 -типу з молекулярною вагою $2 \times 59,2$ кДа, мономером якого є повнорозмірний фермент. При виділенні TyrRS із печінки бика було показано, що поряд з основною формою виділяється також і функціонально активна протеолітично модифікована форма тирозил-тРНК синтетази з молекулярною вагою 39 кДа, яка має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro*.

Тести на цитокінову активність NH₂-кінцевого каталітичного домену TyrRS неочікувано виявили, що міні TyrRS і сама є цитокіном [9–11]. Вона є хемотаксичним фактором для нейтрофілів, а також стимулює ангіогенез по концентраційно залежному шляху. Вважається, що цитокінова активність міні TyrRS опосередковується консервативним мотивом ELR у каталітичному домені у згортці Россмана, який є критичним в активації нейтрофілів для СХС-хемокінів.

Оскільки N-кінцевий каталітичний модуль синтетази являє собою інтерлейкін-подібний цитокін і проявляє проангіогенні властивості, цей білок є досить перспек-

тивним біотехнологічним продуктом. Водночас цитокінові властивості міні TyrRS практично не вивчені.

Метою нашої роботи було створення експресуючої плазмідної конструкції для напрацювання в *E. coli* каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* для вивчення каталітичних та цитокінових властивостей ферменту.

Матеріали і методи. Для відбору рекомбінантних клонів та експресії кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* використовували відповідно генно-інженерні штами *E. coli* DH5α та BL21(DE3)pLysE. Компетентні клітини *E. coli* отримували згідно з методом Нішімури і співавторів [12]. Усі процедури із клонування фрагменту повнорозмірної кДНК тирозин-тРНК синтетази, що кодує послідовність міні TyrRS, у плазмідному векторі – рестрикцію, лігування, полімеразну реакцію, трансформацію та виділення плазмідної ДНК, – проводили за допомогою ендонуклеаз рестрикції, полімерази фага T4 та лігази фірм "New England Biolabs" (США) та "ThermoScientific" (Литва) згідно з методиками [13] та інструкціями фірм. Плазмідні конструкції аналізували методом електрофорезу в 0,7–1%-му агарозному гелі. Для виділення необхідних фрагментів ДНК із гелю застосовували набір реагентів AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit фірми "Axygen Biosciences" (Німеччина). Для клонування використовували плазмідні вектори pBBYRS8 та pET23d(+) фірми "Novagen" (США).

Вирощування культури *E. coli* та індукцію експресії рекомбінантної міні ТирРС у бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертрані (LB) із 30 мкг/мл канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET23d-39KYRS компетентні клітини *E. coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37 °C до оптичної густини $A_{600}=0,7$ та індукували синтез цільового білка додаванням 1М ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозидом (IPTG) до 1 мМ концентрації з наступною інкубацією при 20 °C упродовж 18 годин. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспендували у 12 мл буфера для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗ-озвучуванням (6 циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв упродовж 30 хв при 4 °C. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин Ni-NTA агарозну колонку об'ємом 1 мл, промивали 10 мл буфера для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буфера для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфера, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Після електрофоретичного аналізу елюату в 12%-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах у буферній системі Леммлі [14] фракції, у яких було виявлено білок, об'єднували і діалізували проти 200 мл буфера для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер pH 8,0, 150 мМ NaCl) упродовж 20 годин при +4 °C. Реакцію аміноацилювання проводили в об'ємі 20–50 мкл у буфері 30 мМ HEPES-KOH, pH 7,6, 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ATP, pH 7,0, 2 мМ DTT, 10–20 мкМ [¹⁴C]тирозин (питома активність 1332 ПБк/моль), 0,1–1 мкМ тРНК дріжджів. Останнім у реакційну суміш вносили препарат міні TyrRS до кінцевої концентрації 0,1–0,5 мкМ і проводили інкубацію при 25 °C. Реакцію зупиняли додаванням 10 об'ємів охолодженого 7%-го розчину ТХУ, фільтрували через скловолокнисті фільтри GF-C та вимірювали

радіоактивність у толуольному сцинтиляторі на приладі "RACK-BETA" [15].

Результати та їх обговорення. У відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ була отримана, клонована та секвенована повна нуклеотидна послідовність кДНК гена тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* [16], а також створена експресуюча конструкція pET-30a(+)-39KYRS, що містила вставку, яка кодує каталітичний N-кінцевий модуль TyrRS (M1–P342). Вставка містила також послідовність нуклеотидів, яка кодує міжмодульний лінкер (D343–E359) і 17 а. з. С-модуля (P360–377) згідно з неопублікованими даними Дубровського О. Л.

Експресований даною плазмідною рекомбінантний білок у штамі *E. coli* BL21 (DE3) зберігав аміноацилюючу здатність, притаманну для нативної міні TyrRS, однак мав у своїй N-кінцевій частині послідовність із 43 амінокислот вектора, включаючи 6×His-Tag. Така локалізація амінокислотної послідовності вектора є близькою до активного центра ферменту, що могло впливати на його конформацію та біологічну активність.

У зв'язку з цим вирішено створити нову плазмідну конструкцію із клонованою послідовністю міні TyrRS на основі експресуючого вектора, який би містив 6×His-Tag послідовність на С-кінці білка, що значно далі від активного центра ферменту. Для клонування послідовності міні TyrRS вибрано бактеріальний експресуючий вектор pET23d(+). Даний вектор також має сильний промотор РНК полімерази фага T7 [17], як і у pET30a, але, на відміну від останнього, полігистидиновий таг для афінної хроматографії рекомбінантних білків у pET23d(+) розміщений на 3'-кінці поліклонального сайту безпосередньо перед stop-кодоном. Таким чином, експресовані в pET23d(+) рекомбінантні білки мають 6×His-Tag послідовність на своєму С-кінці. Для попередження включення в рекомбінантний білок міні TyrRS амінокислот, що кодуються поліклональним сайтом вектора, було вирішено клонувати фрагмент послідовності кДНК, що кодує синтетазу, у pET23d(+) за сайтами NcoI – XhoI.

Як донор нуклеотидної послідовності каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази нами взято рекомбінантну плазмиду pBBYRS8, яка кодує повнорозмірну тирозил-тРНК синтетазу *Bos taurus*, клоновану в неекспресуючому векторі pSK8(+) по рестриктивним сайтам EcoRI – XbaI.

Аналіз клонованої послідовності кДНК тирозил-тРНК синтетази у плазміді pBBYRS8 показав, що кодуєча послідовність N-кінцевого каталітичного модуля ферменту, за винятком послідовності останніх 20 амінокислот з COOH-кінця білка, міститься між сайтами рестрикції NcoI та BamHI. Рестриктивний сайт NcoI є унікальним у pBBYRS8. Але конструкція має в послідовності клонованої кДНК синтетази два сайти рестрикції ендонуклеазою BamHI. Тому у процесі експериментальної роботи із клонування нами спочатку видалено із pBBYRS8 не суттєвий для послідовності міні TyrRS фрагмент BamHI–BamHI, а потім виділено фрагмент NcoI–BamHI, що кодує каталітичний модуль синтетази, для подальшого клонування в pET23d(+). Оскільки липкий кінець рестриктного сайту ендонуклеази BamHI фрагмента відрізняється від липкого кінця сайту XhoI вектора, для збігання рамки зчитування кодуєчої послідовності міні TyrRS із гістидиновим тагом вектора, виступаючі кінці цих рестриктних сайтів фрагмента та вектора були затуплені у процесі клонування полімеразою фага T4. Таким чином, кодуєча послідовність N-кінцевого каталітичного модуля ферменту була клонована у векторі pET23d(+) по рестриктному сайту NcoI та тупих кінцях сайтів BamHI та

XhoI. У результаті була отримана конструкція pET-23d(+)-39YRS, де у векторі pET23d(+) був клонований фрагмент кДНК, що кодує міні TyrRS, починаючи з метіонінового кодону ATG у 1 положенні і закінчуючи кодоном аспарагінової кислоти GAT у 322 положенні нуклеотидної послідовності ферменту.

При експресії N-кінцевого каталітичного модуля синтети у створеній конструкції pET-23d(+)-39KYRS у NH₂-кінець рекомбінантного білка не вноситься жодна амінокислота, яка б кодувалась нуклеотидною послідовністю вектора. Синтез починається безпосередньо з кодону ATG, що кодує першу амінокислоту ферменту. Із COOH-кінця до білка приєднані лише 8 додаткових амі-

нокислотних залишків, які кодуються вектором, включаючи послідовність із 6 гістидинів. Отже, мінімізується вплив вектора на властивості рекомбінантного білка, оскільки в його структуру вноситься лише кілька додаткових амінокислотних залишків, а послідовність 6×His tag міститься значно далі від каталітичного центра порівняно з конструкцією pET30a-39KYRS. Делеція останніх 20 амінокислотних залишків із COOH-кінця клонованої міні TyrRS не може впливати на її каталітичні властивості, оскільки ці залишки не входять до каталітичного домену ферменту. Структурна організація клонованого N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS показана на рис. 1.

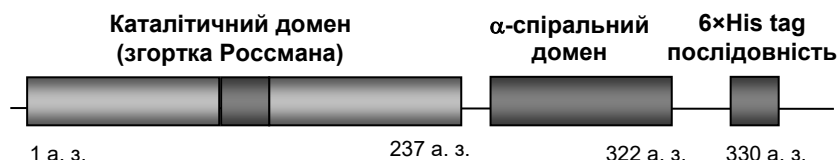


Рис. 1. Доменна організація каталітичного модуля тирозил-тРНК синтети у плазмідній конструкції pET-23d(+)-39KYRS

Тест на експресію клонованої послідовності міні TyrRS отриманою плазмідною конструкцією pET-23d(+)-39KYRS у бактеріальній культурі штаму *E. coli* BL21(DE3)pLysE показав ефективний синтез рекомбінантного білка, що збігається за молекулярною вагою з N-кінцевим каталітичним доменом тирозил-тРНК синтети. В аналітичних експериментах встановлено, що плазміда забезпечує синтез у середовищі Лурія-

Бертрані до 10–12 мг/л рекомбінантної міні TyrRS, чистота якої після виділення на Ni-NTA агарозі досягає 95 % (рис. 2). Максимальна експресія білка спостерігалася при концентрації індуктора синтезу білка ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (IPTG) 1 мМ у культуральному середовищі й культивуванні *E. coli* при температурі 20 °C після додавання індуктора.

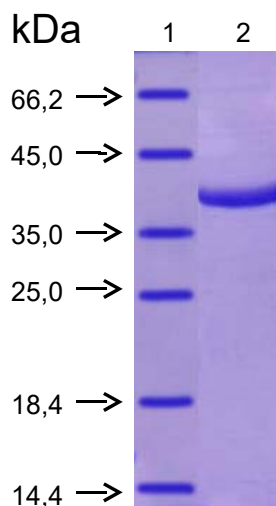


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз молекулярної ваги та чистоти виділеного на Ni-NTA агарозі рекомбінантного білка міні TyrRS у 12%-му поліакриламідному гелі в буферній системі Леммлі:

1 – білковий маркер(Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 ("Fermentas")
2 – рекомбінантний білок міні TyrRS після афінного виділення на Ni-NTA агарозі

Для дослідження каталітичних властивостей отриманої рекомбінантної міні TyrRS було проведено реакцію аміноацилювання очищеним ферментом специфі-

чною до нього гомологічною тРНК в сумарній тРНК, виділеній із дріжджів (рис. 3).

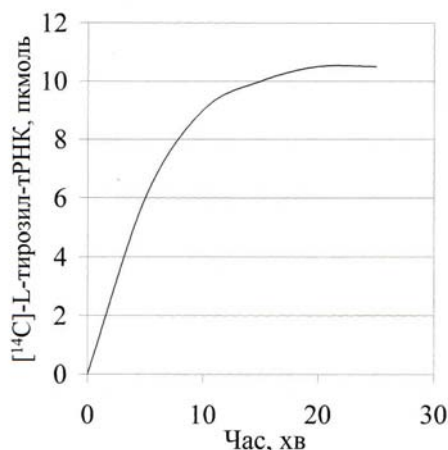


Рис. 3. Кінетика реакції аміноацилювання сумарної тРНК рекомбінантною міні тирозил-тРНК синтетазою

Унаслідок проведеної реакції отримано класичну кінетичну криву включення [¹⁴C] тирозину в тРНК. Це свідчить про експресію із клонованої послідовності міні TyrRS у векторі pET-23d(+) функціонально активного рекомбінантного білка, якому притаманні каталітичні властивості.

Висновки. У результаті проведеної роботи створено експресуючу плазмідну конструкцію pET-23d(+)-39KYRS, в якій клоновано послідовність N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus*. Створена конструкція забезпечує експресію каталітично-активного ферменту.

Список використаних джерел:

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир. – 2002. – 589 с.
2. Demain A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 297–306.
3. Adrio J. L. Recombinant organisms for production of industrial products / J. L. Adrio, A. L. Demain // Bioeng. Bugs. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 116–131.
4. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
5. Rosano G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
6. Schimmel S. P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs / P. Schimmel // Ann. Rev. Biochem. – 1987. – Vol. 56. – P. 125–158.
7. Корнелюк А. И. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / А. И. Корнелюк, И. В. Курочкин, Г. Х. Мацука // Молекулярная биология. – 1988. – Т. 22, № 1. – С. 176–186.
8. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. Dubrovsky, C. J. Murray // Biopolymers and Cell. – 1999. – Vol. 15, № 2. – P. 168–72.
9. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, P. Schimmel // Science. – 1999. – Vol. 284, № 5411. – P. 147–151.
10. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 23. – P. 20124–20126.
11. Guo M. Essential nontranslational function of tRNA synthetases / M. Guo, P. Schimmel // Nature Chemical Biology. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 145–153.
12. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells / A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura, Y. Sugino // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18, № 20. – P. 6169.
13. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. / J. Sambrook, T. Fritsch, T. Maniatis. – 2nd ed. – N. York: Cold Spring Harbor. – 1989.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.

15. Сайт-направленный мутагенез остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена (свертки Россмана) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка / В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука // Биополимеры и клетка. – 2000. – Т. 16, № 4. – С. 275–280.

16. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / О. В. Леванец, В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска и др. // Биополимеры и клетка. – 1996. – Т. 12, № 5. – С. 66–70.

17. Studier F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffatt // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189. – № 1. – P. 113–130.

References:

1. GliK B., Pasternak J. [Molecular Biotechnology. Principles and application]. M.: World; 2002. 589 p. In Russian.
2. Demain A., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009; 27(3): 297–306.
3. Adrio J., Demain A. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng Bugs. 2010;1(2):116–31.
4. Sahdev S., Khattar S., Saini K. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008;307(2):249–64.
5. Rosano G., Cessarelli E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers Microbiology. 2014;5:1–17.
6. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs. Ann Rev Biochem. 1987;56:125–158.
7. Kornelyuk A., Kurochkin I., Matsuka G. [Tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver. [Purification and physico-chemical properties]. Mol Biol. 1988;22(1):176–86. In Russian.
8. Kornelyuk A., Tas M., Dubrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolymers and Cell. 1999;15(2):168–72.
9. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. Science. 1999;284(5411):147–51.
10. Wakasugi K., Slike B., Hood J., Ewalt K., Cheresh D., Schimmel P. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2002;277(23):20124–6.
11. Guo M., Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. Nat Chem Biol. 2013;9(3):145–3.
12. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl Acids Res. 1990;18(20):6169.
13. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. N.York: Cold Spring Harbor; 1989.
14. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–5.
15. Naidenov V., Vudmaska M., Kornelyuk A. [Site-directed mutagenesis of lysine residues located in the connection peptide of the nucleotide-binding domain (Rossmann fold) of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver]. Biopolymers and Cell. 2000;16(4):275–80. In Russian.
16. Levaneets O., Naidenov V., Vudmaska M., Matsuka G., Kornelyuk A. [PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleoside binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase]. Biopolymers and Cell. 1996;12(5): 66– 70. In Russian.
17. Studier F., Moffatt B. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986; 189(1):113–30.

В. Заец, канд. биол. наук, А. Цуварев, асп.,
А. Корнелюк, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Л. Коломиец, и.о. научн. сотр.
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОГО N-КОНЦЕВОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ *B. TAURUS*

Проведено клонирование в экспрессирующий вектор pET23d(+) κДНК, кодирующую N-концевой каталитический модуль тирозил-тРНК синтетазы (мини TyrRS) *Bos taurus*. Экспрессировано в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysE и выделено высокоочищенный рекомбинантный белок мини TyrRS с использованием сконструированного экспрессирующего вектора pET-23d(+)39YRS для физико-химических исследований. Исследована каталитическая активность рекомбинантной мини TyrRS в реакции аминоацилирования гомологичной тРНК.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, мини TyrRS, клонирование, бактериальная экспрессия.

V. Zayets, PhD, O. Tsuvariev, PhD stud.,
A. Kornelyuk, DSc., Prof., Corresponding Member of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Kolomiyets, research assistant
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Kyiv, Ukraine

BACTERIAL EXPRESSION OF THE RECOMBINANT FUNCTIONALLY ACTIVE N-TERMINAL MODULE OF THE TYROSYL-tRNA SYNTHETASE *B. TAURUS*

The nucleotide sequence coding N-terminal module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase (mini TyrRS) was cloned into the bacterial expression vector pET23d(+). Bacterial expression of the recombinant protein mini TyrRS was performed in *E. coli* BL21 (DE3)pLysE cells with the use of the constructed vector pET-23d(+)39YRS for subsequent physical and chemical protein studies. The catalytic activity of the recombinant mini TyrRS has been studied in the aminoacylation reaction of homologous tRNA^{Tyr}.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, mini TyrRS, cloning, bacterial expression.

УДК 616.379-008.64.8-085.2/3

Н. Нікітіна, асп., С. Береговий, канд. біол. наук,
Л. Степанова, канд. біол. наук, О. Кабанов, пров. інженер
ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ СХЕМИ ВВЕДЕННЯ КОКАРНІТУ ЩУРАМ ІЗ ДІАБЕТИЧНОЮ ПОЛІНЕЙРОПАТІЄЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕНЗОАЛГОМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ

Досліджено зміну больового порога у щурів із діабетичною полінейропатією та ефективність Кокарніту при лікуванні цього ускладнення діабету та визначено оптимальну схему введення препарату. Установлено, що щоденне введення препарату протягом 9 та 12 днів позитивно впливає на нервову провідність та повертає до норми реакцію на больовий стимул.

Ключові слова: поріг больової чутливості, діабетична полінейропатія, Кокарніт.

Вступ. Велика соціальна значущість цукрового діабету полягає в тому, що він призводить до ранньої інвалідизації й летальності, обумовлених ускладненнями діабету: мікроангіопатії, макроангіопатії, нейропатії. Діабетична периферична полінейропатія є найпоширенішим ускладненням цукрового діабету [23] і причиною низької якості життя, порушення працездатності у великої кількості хворих [16]. Приблизно 10 % пацієнтів мають нейропатію в той час, коли діабет діагностується вперше, і більше, ніж у половини людей із цукровим діабетом розвивається полінейропатія через 25 років [17]. Ознаками розвитку полінейропатії є оніміння, аллодінія, м'язова слабкість, парестезії. Також порушується температура, тактильна і больова чутливість.

Механізм розвитку діабетичної полінейропатії описується різними теоріями, серед яких набряк і дегенерація нервових волокон [1]; посилення активності поліолового циклу і, як наслідок, накопичення сорбітолу [2], недостатність міоїнозитола [13]; порушення ліпідного обміну, посилення перекисного окиснення ліпідів [12]; неферментативне глікозильовання білків; метаболічний стрес, унаслідок якого відбувається підвищене утворення вільних радикалів [10]. Вважається, що гіперглікемія є основним фактором патогенезу діабетичних ускладнень і зумовлює метаболічні та структурні зміни в центральній і периферичній нервових системах.

Основну перевагу в терапії діабетичної полінейропатії надають засобам патогенетичної спрямованості. Патогенетична терапія полягає у призначенні антиок-

сидантів і метаболічних засобів [18, 1]. Показано деяку ефективність вітамінів групи В у лікуванні діабетичної полінейропатії як при введенні одного вітаміну [25, 26], так і при використанні комплексу вітамінів В [22]. Однак, правильна комбінація вітамінів В, доза, тривалість лікування не є повністю зрозумілими [11]. Серед ряду препаратів нашу увагу привернув новий препарат Кокарніт (World Medicine), який, за даними літератури, позитивно впливає на метаболічні, репаративні процеси, поліпшує трофіку нервової тканини, має знеболювальний, судинорозширювальний ефект [8, 4] та містить не лише вітаміни групи В, а й метаболічні речовини, що покращують нервову провідність. Препарат має широкий спектр дії, використовується для лікування різних патологічних станів нервової системи [6, 3, 9]. До складу препарату входить 20 мг нікотинамід, 50 мг кокарбоксілази, 500 мкг ціанкобаламіну, 10 мг динатрію аденозинтрифосфату тригідрату (АТФ).

Нікотинамід (вітамін В₃) бере участь в окисно-відновних процесах у клітині, тканинному диханні, гліколізі, поліпшує метаболізм жирів, протеїнів, амінокислот, пуринів. Кокарбоксілаза (кофермент вітаміну В₁) каталізує карбоксилювання й декарбоксилювання α-кетокислот, відіграє важливу роль у вуглеводному обміні, сприяє засвоєнню глюкози. Ціанкобаламін (вітамін В₁₂) потрібний для нормального функціонування кровотворних органів, підвищує здатність тканин до регенерації, синтезу й накопичення білка в організмі, активізує обмін вуглеводів і ліпідів. Функція АТФ поля-

гає у забезпеченні енергією численних біохімічних реакцій, покращенні передачі нервових імпульсів у синапсах, сприянні підвищенню функціональної активності м'язів, стимуляції метаболічних процесів.

Метою роботи було визначити ефективність препарату Кокарніт при лікуванні діабетичної полінейропатії у щурів та визначити оптимальну схему введення препарату.

Об'єкт та методи досліджень. Моделювання діабетичної нейропатії проводили на 80 білих лабораторних щурах самцях масою 200 ± 20 г, яких поділили на 8 груп. У щурів викликали експериментальний цукровий діабет 1 типу шляхом введення одноразової ін'єкції стрептозоцину (Streptozocin, "Sigma", США) у дозі 65 mg/kg (в/о) [20]. Для визначення концентрації глюкози використовували глюкометр Free Style Optium XE MV036-P0270 і тест-смужки Free Style Optium H. Кров відбирали із хвостової вени за допомогою внутрішньовенного катетера. Хвіст попередньо вимивали, витирали насухо, першу краплю крові витирали, а другу краплю наносили на тест-смужку.

Для підтвердження наявності діабету у щурів на 30-й день проводили глюкозотолерантний тест, який визначали натще. Тварин поміщали у спеціальні патрони, при цьому хвіст лишався зовні. Після вимірювання базального рівня глюкози, щурам інтрагастрально вводили розчин глюкози в дозі 3 г/кг . Через 30, 60, 90 і 120 хв. після введення глюкози визначали її концентрацію у крові. За результатами тесту будували гіперглікемічну криву, яка показує, наскільки швидко організм засвоює глюкозу і як швидко нормалізується її вміст у крові.

Наступного дня щурам вводили Кокарніт (1 mg/kg , в/м) за такою схемою: 1-й групі Кокарніт вводили щоденно протягом 3 діб; 2-й групі – щоденно протягом 6 діб; 3-й групі – щоденно протягом 9 діб; 4-й групі – 6 діб 2 рази на день; 5-й групі – протягом 9 діб (1 раз через день); 6-й групі – щоденно протягом 12 діб. Група 7 складалась з інтактних щурів (негативний контроль), а щури зі стрептозоцин-індукованою діабетичною нейропатією без лікування складали групу 8 (позитивний контроль).

Для оцінювання ефективності препарату Кокарніт використовували тензоалгометричний метод [24]. Наявність полінейропатії реєстрували за допомогою ана-

гезиметра. Показником больового порога був тиск, зафіксований у момент вираженої больової реакції тварини (писк або відсмикування лапи). Поріг больової чутливості (ПБЧ) визначався за формулою

$$P_{\text{бп}} = \frac{F_{\text{с.н.}}}{S_{\text{н.}}},$$

де $P_{\text{бп}}$ – тиск (больовий поріг), $F_{\text{с.н.}}$ – сила надавлювання в момент відсмикування, $S_{\text{н.}}$ – площа вимірювальної насадки.

Визначали ПБЧ надавлюванням на задню лапку. Так, при визначенні ПБЧ задньої лапки у щурів тримісячного віку використовували металеву циліндричну насадку площею $0,5 \text{ cm}^2$. Під час надавлювання на лапку тиск сприймався тензочутливим елементом, перетворювався на електричний сигнал, потім оброблявся і відображався у графічному і цифровому вигляді на моніторі комп'ютера. ПБЧ визначали перед моделюванням цукрового діабету, на 14-й та 30-й дні після введення стрептозоцину та після введення Кокарніту.

Статистичний аналіз результатів проводили методами варіаційної статистики у програмі Statistica 8.0. Для перевірки на нормальність використовували W-тест Шапіро-Вілکا. Оскільки наші вибірки мали нормальний розподіл, для оцінювання значущих відмінностей використовувався t -критерій Стюдента, результати представлено у вигляді $M \pm m$ (де M – середнє арифметичне; m – помилка середнього значення). Відмінності між групами вважалися вірогідними при рівні значущості $p < 0,05$ [7].

Результати та обговорення. На 7-й, 14-й, 21-й та 28-й дні після введення стрептозоцину вимірювали концентрацію глюкози у крові щурів усіх груп. Перед ін'єкцією стрептозоцину (0-й день), рівень глюкози у крові щурів через 2 години після прийому їжі складав $6,14 \pm 0,2 \text{ ммоль/л}$ (рис. 1). Після введення стрептозоцину у всі наступні дні вимірювання спостерігалась стійка гіперглікемія. Так, на 7-й день концентрація глюкози у крові щурів зростала до $23,89 \pm 0,9 \text{ ммоль/л}$ ($p < 0,001$), 14-й день – до $24,17 \pm 0,8 \text{ ммоль/л}$ ($p < 0,001$), 21-й день – до $25,5 \pm 0,7 \text{ ммоль/л}$ ($p < 0,001$) порівняно з 0-м днем. Найвища концентрація глюкози у крові спостерігалась на 28-й день моделювання діабетичної нейропатії і дорівнювала $26,2 \pm 0,8 \text{ ммоль/л}$ ($p < 0,001$).

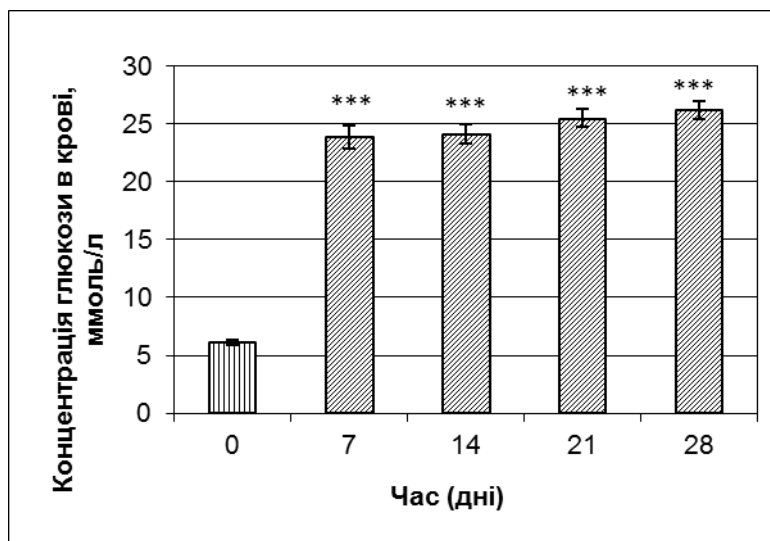


Рис. 1. Концентрація глюкози у крові щурів перед моделюванням патології (0-й день), на 7-й, 14-й, 21 та 28-й дні експерименту ($M \pm m$, $n=70$)

Примітки. *** – $p < 0,001$ порівняно з нульовим днем (до введення стрептозоцину). У всіх групах щурів вимірювання концентрації глюкози проводили через 2 години після прийому їжі.

Наступним етапом було проведення глюкозотолерантного тесту. У здорових тварин без цукрового діабету початкова концентрація глюкози натще складала $3,2 \pm 0,8$ ммоль/л (рис. 2). Через 2 години, після введен-

ня глюкози показник дорівнював $5,8 \pm 0,7$ ммоль/л. Це свідчить про нормальне засвоєння глюкози і швидку нормалізацію концентрації цукру у крові.

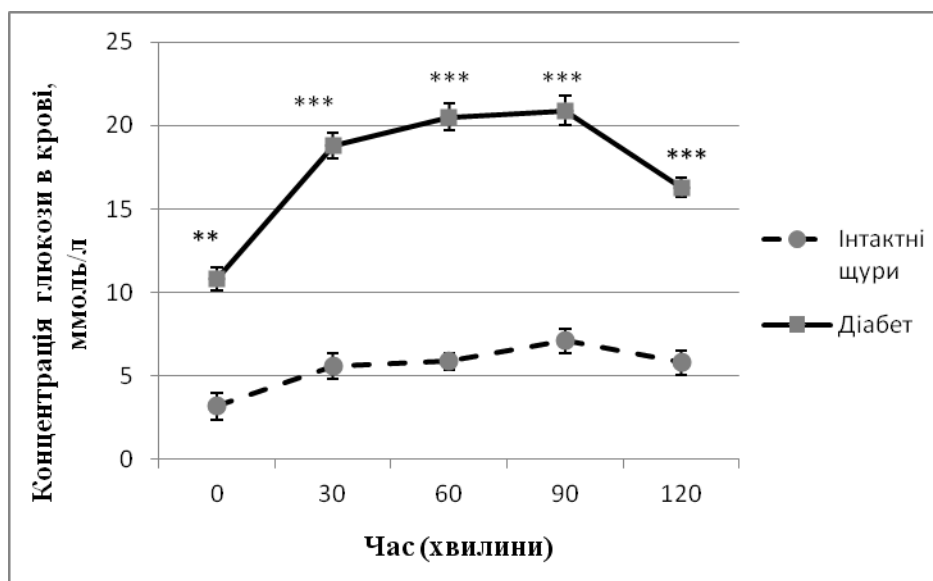


Рис. 2. Концентрація глюкози у крові щурів за результатами глюкозотолерантного тесту ($M \pm m$, $n=10$)

Примітки. ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно із групою інтактних щурів.

За даними літератури, якщо концентрація глюкози натще ≥ 7 ммоль/л, а через 2 години після введення глюкози ≥ 11 ммоль/л, то діагностують цукровий діабет [28]. У щурів експериментальних груп концентрація глюкози в крові після 24-годинного голодування була $10,8 \pm 0,7$ ммоль/л. Через 30 хв, 60 хв та 90 хв після інтрагастрального введення глюкози її концентрація складала $18,8 \pm 0,6$ ммоль/л, $20,5 \pm 0,6$ ммоль/л, $20,9 \pm 0,9$ ммоль/л, відповідно (рис. 2). Через 2 години глюкоза не опустилась нижче $16,3 \pm 0,6$ ммоль/л. Такі результати свідчать, що у щурів розвинувся цукровий діабет.

Середнє значення ПБЧ, визначене перед початком моделювання патології, приймали за 100 %. У результаті проведених досліджень встановлено, що в інтактних щурів початковий ПБЧ складав $100 \pm 3,4$ %. На 14-й та всі інші дні вимірювання ПБЧ незначно коливався в межах початкового рівня, що є свідченням нормального функціонування нервово-м'язового комплексу у щурів. У контрольної групи щурів із діабетом ПБЧ значно зростає у всі дні вимірювання порівняно з початковим значенням. Такий результат є свідченням не лише наявності у щурів діабетичної нейропатії, а й прогресування захворювання (табл.).

При визначенні оптимальної схеми введення Кокарніту спочатку щурам вводили препарат протягом 3 днів після моделювання діабетичної нейропатії. У щурів даної групи ПБЧ на 14-й, 30-й дні експерименту та після 3 днів введення Кокарніту статистично достовірно не відрізнявся від ПБЧ у щурів контрольної групи у відповідні дні спостереження. Тобто, 3-денне введення Кокарніту було неефективним щодо впливу на ПБЧ у щурів із діабетичною нейропатією.

У четвертій групі щурів, яким вводили препарат упродовж 6 діб, початковий рівень ПБЧ був $100 \pm 14,1$ %. На 14-й і 30-й день після введення стрептозоцину досліджувані показники зростають на $57,2 \pm 3,3$ % ($p < 0,05$) та $97,5 \pm 9$ % ($p < 0,01$), відповідно, порівняно з нульовим днем. Через день після 6 днів введення Кокарніту ПБЧ був вище початкового рівня (до моделювання діабету)

на $24,1 \pm 2,3$ % ($p < 0,05$), однак зменшився на $84,1$ % ($p < 0,05$) порівняно зі щурами контрольної групи у відповідний день дослідження та був на $73,4$ % ($p < 0,05$) меншим відносно ПБЧ у щурів даної групи на 30-й день розвитку діабету. Отже, за умов 6-денного введення Кокарніту спостерігалася його позитивна дія, хоча ПБЧ повністю не відновлювався.

Початковий рівень ПБЧ у групі щурів, яким препарат вводили протягом 6 діб двічі на день складав $100 \pm 17,2$ %. На 14-й та 30-й дні експерименту ПБЧ збільшувався на $57,3 \pm 4,1$ % ($p < 0,05$) та $123,3 \pm 8,4$ % ($p < 0,01$) порівняно з нульовим днем. На 37-й день експерименту (через добу після останнього введення Кокарніту) ПБЧ статистично достовірно не відрізнявся від показника ПБЧ на 30-й день і був більшим на $70,5 \pm 5,9$ % ($p < 0,01$) відносно початкового рівня. При цьому ПБЧ у щурів, яким Кокарніт вводили впродовж 6 діб двічі на день, був на $37,7$ % ($p < 0,05$) меншим за аналогічний показник у щурів контрольної групи на 37-й день експерименту. За умов указаної схеми введення Кокарніту спостерігалися ознаки його позитивної дії, проте його ефективність була меншою, ніж при введенні Кокарніту впродовж 6 діб один раз на день.

У щурів наступної групи, яким вводили Кокарніт протягом 9 діб один раз на 2 дні, ПБЧ на нульовий день становив $100 \pm 6,1$ %. На 14-й і 30-й дні він збільшувався на $135,8 \pm 3,4$ % ($p < 0,05$) і $123,5 \pm 7,1$ % ($p < 0,001$). Через день після останнього введення Кокарніту ПБЧ був на $96,7 \pm 2,4$ % ($p < 0,01$) вищим, ніж на нульовий день, і статистично достовірно не відрізнявся від ПБЧ у щурів даної групи на 30-й день та від ПБЧ у щурів контрольної групи у відповідний день експерименту (40-й день). Таким чином, ця схема застосування Кокарніту була неефективною при лікуванні діабетичної нейропатії у щурів.

У щурів, яким Кокарніт вводили щоденно впродовж 9 діб, ПБЧ на нульовий день дорівнював $100 \pm 8,7$ %. На 14-й та 30-й дні розвитку діабету ПБЧ був на $22,4 \pm 1,5$ % ($p < 0,05$) і $100,9 \pm 7,6$ % ($p < 0,001$) більше початкового

рівня. Після 9-денного введення Кокарніту ПБЧ був на 95,4 % ($p < 0,01$) менше, ніж на 30-й день і статистично не відрізнявся від початкового рівня та зменшувався на 115,5% ($p < 0,01$) порівняно зі щурами контрольної групи на 40-й день дослідження і досягав рівня ПБЧ у інтактних щурів у відповідний день.

Одержані дані підтверджуються нашими попередніми електрофізіологічними дослідженнями швидкості проведення нервового імпульсу по еферентних мотонейронних нервах і швидко-силових параметрах м'язового скорочення, в яких показано, що серед усіх ви-

користаних схем найефективнішим було 9-денне введення Кокарніту [5]. Оскільки відновлення нервової провідності склало 95 %, ми вирішили дослідити вплив Кокарніту при його введенні протягом 12 діб.

При збільшенні тривалості введення Кокарніту до 12 діб його ефект на ПБЧ був таким самим, як і при введенні препарату впродовж 9 діб.

Зроблено висновок, що найбільш ефективною схемою застосування Кокарніту при діабетичній нейропатії є введення препарату протягом 9 днів один раз на добу.

Таблиця. Поріг больової чутливості (%) у щурів при визначенні оптимальної схеми введення препарату Кокарніт, $M \pm m$, $n=10$

Дні	0	14	30	34	37	40	43
Інтактні щури	100 $\pm$ 3,4	102,2 $\pm$ 1,6	105,8 $\pm$ 1,3	95,36 $\pm$ 2,4	100,3 $\pm$ 3,3	101,8 $\pm$ 2,1	104,6 $\pm$ 3,1
Контрольна група	100 $\pm$ 8,3	121 $\pm$ 4,4 *	194,1 $\pm$ 8,3 **	200,6 $\pm$ 9,8 ***	208,2 $\pm$ 5,3 ***	221 $\pm$ 10,3 ***	220,8 $\pm$ 9,8 ***
3 дні (1 р/день)	100 $\pm$ 10,9	126,4 $\pm$ 5,5 *	195,8 $\pm$ 24,4 **	179 $\pm$ 10,6 **			
6 днів (1 р/день)	100 $\pm$ 14,1	157,2 $\pm$ 9,2 *	197,5 $\pm$ 20,2 **		124,1 $\pm$ 11,8 */#/\$		
6 днів (2 р/день)	100 $\pm$ 17,2	157,3 $\pm$ 11,2 *	223,3 $\pm$ 15,3 **		170,5 $\pm$ 14,5 **		
9 днів (5 ін'єкцій через день)	100 $\pm$ 6,1	135,8 $\pm$ 13,2 *	223,6 $\pm$ 13,1 ***			196,7 $\pm$ 4,8 *	
9 днів (1 р/день)	100 $\pm$ 8,7	122,4 $\pm$ 8,4 *	200,9 $\pm$ 15,3 ***			105,5 $\pm$ 2,16 ##	
12 днів (1 р/день)	100 $\pm$ 11,7	187 $\pm$ 12,5 **	226,4 $\pm$ 8,1 ***				108,9 $\pm$ 3,1 ###

Примітки. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з нульовим днем (до введення стрептозоцину);

\$ – порівняно зі щурами на 30-й день експерименту в межах досліджуваної групи;

– $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ порівняно зі щурами контрольної групи у відповідний день дослідження.

Поряд із цим, у різні терміни після введення Кокарніту проводили моніторинг концентрації глюкози у крові щурів (рис. 3). Через добу після 3-, 6-, 9- та 12-денного введення Кокарніту мінімальне значення концентрації глюкози було 24,6 $\pm$ 0,7 ммоль/л, а максималь-

не 26,1 $\pm$ 0,7 ммоль/л у щурів із діабетом. Отже, позитивний вплив Кокарніту на больову чутливість у щурів із діабетичною нейропатією не пов'язаний із концентрацією глюкози у крові.

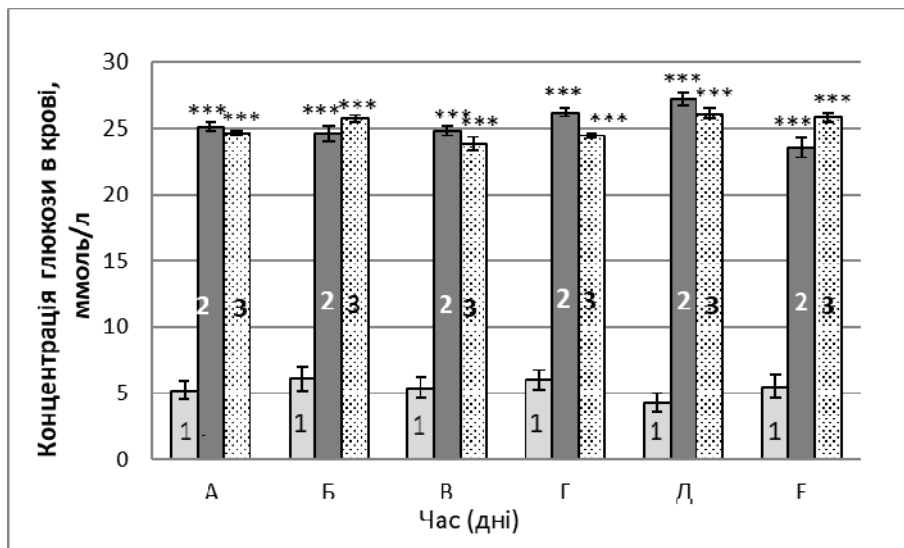


Рис. 3. Концентрація глюкози у крові щурів через добу після введення Кокарніту протягом різних термінів ($M \pm m$, $n=10$)

Примітки. 1. *** – $p < 0,001$ порівняно з інтактною групою.

2. Тут А – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 3-денного введення Кокарніту; Б – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 6-денного введення Кокарніту; В – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 9-денного (2 р/день) введення Кокарніту; Г – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 9-денного (5 ін'єкцій через день) введення Кокарніту; Д – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 9-денного введення Кокарніту; Е – концентрація глюкози у крові щурів через добу після 12-денного введення Кокарніту;

1 – група інтактних щурів;

2 – група щурів із діабетом;

3 – група щурів із діабетом, після введення Кокарніту.

3. У всіх групах щурів вимірювання концентрації глюкози проводили після прийому їжі.

При лікуванні діабетичної полінейропатії перш за все намагаються домогтися стійкої компенсації цукрового діабету, тобто утримання концентрації глюкози крові в нормі [15]. Однак, нами показано, що Кокарніт відновлює больову чутливість у щурів до рівня, який був визначений перед моделюванням діабету. При цьому препарат не змінював концентрацію глюкози в крові, адже вона не відривалася від показників, які були визначені у щурів із діабетом без лікування. Це свідчить про те, що окрім наслідків гіперглікемії, є ще інші не менш важливі фактори, які призводять до розвитку діабетичної нейропатії.

У багатьох дослідженнях показано, що дефіцит вітамінів групи В виявляється у хворих із периферичною нейропатією [19, 21]. Авторів вважають, що дефіцит вітамінів групи В у таких хворих є наслідком неповноцінного харчування або порушенням всмоктування вітамінів. Також недостатність вітамінів групи В може виникнути при застосуванні протидіабетичних засобів [27]. Очевидно, Кокарніт відновлює нормальний рівень вітамінів групи В у щурів із діабетичною нейропатією. У результаті ми спостерігаємо покращення метаболічного обміну та трофіки нервів завдяки відновленню енергетичного балансу в пошкоджених периферичних нервових волокнах та нейротропній дії компонентів Кокарніту.

Висновок. Щоденне введення препарату Кокарніт протягом 9 та 12 днів позитивно впливає на нервову провідність та повертає до норми реакцію на больовий стимул.

Список використаних джерел:

1. Балаболкин М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Кремская // М.: Медицина. – 2005. – 512 с.
2. Сахарный диабет: ангиопатии и окислительный стресс: пособие для врачей / И. И. Дедов, М. И. Балаболкин, Г. Г. Мамаева и др. – М.: 2003. – 85 с.
3. Применение препарата Кокарнит у пациентов после эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов / Н. А. Корж, В. А. Филиппенко, Ф. С. Леонтьева и др. // Травма. – 2012. – Т. 13, № 4. – С. 26–30.
4. Курята А. В. Эффективность кокарнита в комплексной терапии у пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани с поражением миокарда и проявлениями сердечной недостаточности / А. В. Курята, Т. К. Лысунец, О. Ю. Нода // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 44–49.
5. Швидкісні показники в динаміці м'язового скорочення у щурів із цукровим діабетом та після введення препарату Кокарніт / Н. С. Нікітіна, С. М. Береговий, Д. М. Ноздренко та ін. // Міжнар. наук.-практ. конф. "Актуальні питання медицини та біології". – 2017. – С. 32–33.
6. Полов С. В. Препарат високої метаболічної активності Кокарніт у лікуванні діабетичної автономної нейропатії серця / С. В. Попов, О. К. Мелеховець, Н. В. Деміяхова, Л. Б. Винниченко // Лікарська справа. – 2012. – № 3–4 (1113). – С. 75–81.
7. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва // М.: Медиа Сфера – 2002. – 312 с.
8. Трисветова Е. Л. Кокарнит – новый комплекс метаболитических веществ / Е. Л. Трисветова, А. Е. Лихачева // Медицинские новости. – 2008. – № 10. – С. 55–56.
9. Якименко С. А. Новый комплекс метаболитических веществ и витаминов в лечении ожогов глаз и их последствий / С. А. Якименко, П. А. Костенко // Офтальмология. Восточная Европа. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 247–254.
10. Питання патогенезу діабетичної нейропатії / С. О. Яковчук, А. Г. Іфтодій, О. Б. Колотило, О. П. Москалюк // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (63), ч. 1. – С. 142–145.
11. Vitamin B for treating peripheral neuropathy / C. D. Ang, M. J. Alviar, A. L. Dans et al. // Cochrane Database Syst. Rev. – 2008. – Issue 3. – 39 p. doi: 10.1002/14651858.CD004573.pub3.
12. Baynes J. W. The role of oxidative stress in diabetic complications / J. W. Baynes, S. R. Thorpe // Diabetes. – 1999. – Vol. 48. – P. 1–9.
13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // Nature. – 2001. – № 414. – P. 813–820.
14. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism / M. Brownlee // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 1615–1625.
15. Effect of intensive diabetes treatment on nerve conduction in the Diabetes Control and Complications Trial / Ann Neural. – 1995. – Vol. 38 (6). P. 869–880.

16. England J. D. Peripheral neuropathy / J. D. England, A. K. Asbury // Lancet. – 2004. – Vol. 363, № 9427. – P. 2151–2161.
17. New insights into the pathogenesis of diabetic neuropathy / E. L. Feldman, J. W. Russell, K. A. Sullivan, D. Golovoy // Curr Opin Neurol. – 1999. – Vol. 12, № 5. – P. 553–563.
18. Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic polyneuropathy of human / C. Giannini, P. J. Dyck // Diabetic neuropathy J Neuropathol Exp Neurol. – 1996. – Vol. 55, № 12. – P. 1181–1193.
19. Head K. A. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies / K. A. Head // Altern Med Rev. – 2006. – Vol. 11. – P. 294–329.
20. Islam M. S. Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study / M. S. Islam, H. Choi // Pharmacology. – 2007. – Vol. 79, № 4. – P. 243–249.
21. Jayabalan B. Vitamin B supplementation for diabetic peripheral neuropathy / B. Jayabalan, L. L. Low // Singapore Med J. – 2016. – Vol. 57. – P. 55–59.
22. B vitamins alleviate indices of neuropathic pain in diabetic rats / C. G. Jolivald, L. M. Mizisin, A. Nelson et al. // Eur J Pharmacol. – 2009. – Vol. 612. – P. 41–47.
23. Martyn C. Epidemiology of peripheral neuropathy / C. Martyn, R. Hughes // J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 1997. – Vol. 62, № 4. – P. 310–318.
24. Randall L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. J. Selitto // Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie. – 1957. – Vol. 111. – P. 409–419.
25. Sun Y. Effectiveness of vitamin B12 on diabetic neuropathy: systematic review of clinical controlled trial / Y. Sun, M. S. Lai, C. J. Lu // Acta Neurol. Taiwan. – 2005. – Vol. 14. – P. 48–54.
26. Thornalley P. J. The potential role of thiamine (vitamin B(1)) in diabetic complications / P. J. Thornalley // Curr. Diabetes Rev. – 2005. – Vol. 1. – P. 287–298.
27. Ting R. Z. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin / R. Z. Ting, C. C. Szeto, M. H. Chan et al. // Arch Intern Med. – 2006. – Vol. 166. – P. 1975–1979.
28. Validation of the diabetes screening tools proposed by the American Diabetes Association in an aging Chinese population / Y. C. Woo, C. H. Lee, C. H. Y. Fong et al. // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – 9 p.

References:

1. Balabolkin M., Klebanova E., Kremenskaia V. [Treatment of diabetes mellitus and complications] M.: "Medicine". 2005:512. In Russian.
2. Dedov I., Balabolkin M., Mamaeva E., Klebanova E., Kremenskaia V. [Diabetes mellitus: angiopathy and oxidative stress]. Posobie dlia vracheiy. 2003: 85 p. In Russian.
3. Korzh N., Filipenko V., Leonteva F., Tulyakov V., Bondarenko S. Application of preparation of Cocarnit for patients after endoprosthesis of hip and knee joints. Travma. 2012; 13(4): 26-30. In Russian.
4. Kuryata A., Lysunec T., Noda O. Efficiency of Cocarnit in complex therapy of patients with system diseases of connecting fabric with defeat myocardium and displays of cardiac insufficiency. Medzhdunarodnyy medicinskiy zhurnal. 2012; 2: 44-9. In Russian.
5. Nikitina N., Beregovyi S., Nozdrenko D., Beregovaya T., Stepanova L., Mustafayeva D. Indikator of rates in the dynamics of muscular contraction in rats with diabetes mellitus and after the administration of the drug "Cocarnit". In: International scientific and practical conference "Topical questions of medicine and biology"; 2017. p. 32-3.
6. Popov S., Melekhovets O., Demikhova N., Vynnychenko L. Drug with a high metabolic activity, cocarnit, in the treatment of diabetic cardiac autonomic. Lik Sprava. 2012;3-4(1113):75-81. In Ukrainian.
7. Rebrova O. [Statistical analysis of medical data. Application package application STATISTICA]. M.: Media sfera. 2002: 312 p. In Russian.
8. Trisvetova E., Lihacheva AE. [Cocarnit – a new complex of metabolic substances]. Medicinskie novosti. 2008; 10: 55-6. In Russian.
9. Iakumenco S., Kostenco P. [A new complex of metabolic substances and vitamins in the treatment of eye burns and their consequences]. Oftalmologia. Vostochnaia Evropa. 2017; 7(2): 247-54. In Russian.
10. Iakobchuk S., Ifodiya A., Kolotulo O., Moskaluk O. [The question of the pathogenesis of diabetic neuropathy] Bykovinskiy meduchnyi visnik. 2012; 16 (3): 142-5. In Russian.
11. Ang C., Alviar M., Dans A., Bautista-Velez G., Villaruz-Sulit M., Tan J., Co H., Bautista M., Roxas A. Vitamin B for treating peripheral neuropathy. Cochrane Database Syst. Rev. 2008; 3: 39. doi: 10.1002/14651858.CD004573.pub3.
12. Baynes J., Thorpe S. The role of oxidative stress in diabetic complications. Diabetes. 1999; Vol. 48: 1-9.
13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001; 414: 813-20.
14. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. Diabetes. 2005; 54: 1615-25.
15. Effect of intensive diabetes treatment on nerve conduction in the Diabetes Control and Complications Trial / Ann Neural. 1995; 38(6):869-80.
16. England J., Asbury A. Peripheral neuropathy. Lancet. 2004; Vol. 363 (9427): 2151-61.
17. Feldman E., Russell J., Sullivan K., Golovoy D. New insights into the pathogenesis of diabetic neuropathy. Curr Opin Neurol. 1999; Vol. 12 (5): 553-63.
18. Giannini C., Dyck P. Pathologic alterations in the diabetic polyneuropathy of human. Diabetic neuropathy J Neuropathol Exp Neurol. 1996; 55(12): 1181-93.

19. Head K. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Altern Med Rev*. 2006; 11: 294-329.
20. Islam M., Choi H. Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study. *Pharmacology*. 2007; 79 (4): 243-49.
21. Jayabalan B., Low L. Vitamin B supplementation for diabetic peripheral neuropathy. *Singapore Med J*. 2016; 57: 55-9.
22. Jolival C., Mizisin L., Nelson A., Cunha J., Ramos K., Bonke D., Calcutt N. B vitamins alleviate indices of neuropathic pain in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 612: 41-47.
23. Martyn C., Hughes R. Epidemiology of peripheral neuropathy. *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997; Vol. 62(40): 310-18.9
24. Randall L., Selitto J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie*. 1957; 111: 409-19.

25. Sun Y., Lai M., Lu C. Effectiveness of vitamin B12 on diabetic neuropathy: systematic review of clinical controlled trial. *Acta Neurol. Taiwan*. 2005; 14(2):48-54.
26. Thornalley P. The potential role of thiamine (vitamin B(1)) in diabetic complications. *Curr. Diabetes Rev*. 2005; 1: 287-98.
27. Ting R., Szeto C., Chan M., Ma K., Chow K. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 1975-79.
28. Woo Y., Lee C., Fong C., Tso A., Cheung B., Lam K. Validation of the diabetes screening tools proposed by the American Diabetes Association in an aging Chinese population. *PLoS One*. 2017; 12: 9.

Надійшла до редколегії 23.10.17

Н. Никитина, асп., С. Береговой, канд. биол. наук, Л. Степанова, канд. биол. наук, О. Кабанов, вед. инженер
УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ СХЕМЫ ВВЕДЕНИЯ КОКАРНИТА КРЫСАМ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИЕЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕНЗОАЛГОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Исследовано изменение болевого порога у крыс с диабетической полинейропатией и эффективность Кокарнита в лечении данного осложнения диабета, определена оптимальная схема введения препарата. Установлено, что ежедневное введение препарата на протяжении 9 и 12 дней оказывает положительное влияние на нервную проводимость и возвращает к норме реакцию на болевой стимул.

Ключевые слова: порог болевой чувствительности, диабетическая полинейропатия, Кокарнит.

N. Nikitina, PhD stud., S. Beregovy, PhD, Stepanova L., PhD, O. Kabanov, sen. Engineer
ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DEFINITION OF OPTIMUM SCHEME OF COCARNIT INJECTION FOR RATS WITH POLYNEUROPATHY INDUCED BY DIABETIC BY TENZOALOGOMETRIC METHOD

The change of pain threshold in rats with diabetic polyneuropathy and the efficacy of Cocarnit in the treatment of this complication has been studied, and the optimal scheme of drug administration has been determined. It is established that daily administration of the drug for 9 and 12 days has a positive effect on the nerve conduction and returns to normal response to the pain stimulus.

Key words: threshold of pain sensitivity, diabetic polyneuropathy, Cocarnit.

УДК 581.143.01.07

М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф, акад. НААН України,
Н. Таран, д-р біол. наук, проф., В. Стороженко, канд. біол. наук,
Л. Бацманова, канд. біол. наук, Н. Грудіна, інж. 1 категорії, Н. Светлова, канд. біол. наук, О. Серга, канд. біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ФЕНОТИПУВАННЯ ЗА БІОХІМІЧНИМИ МАРКЕРАМИ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ВІДПОВІДІ РОСЛИН ДЛЯ СКРИНІНГУ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Проведено польовий скринінг та фенотипування за біохімічними параметрами сортів озимої пшениці степового екотипу за екзогенної обробки рослин пероксидом водню. Кількість ТБК-активних продуктів, фотосинтетичних пігментів і сульфохіновоксилацетилглицеролу суттєво відрізнялася в листках досліджуваних сортів за нормальних умов. Після першої позакореневої обробки рослин пероксидом водню спостерігали підвищення вмісту ТБК-активних продуктів і гідропероксидів, а після другої – їх суттєве зниження в листках сорту Шестопалівка. Екзогенна обробка пероксидом водню позитивно впливала на формування продуктивного стеблестоя та морфометричні параметри дослідних рослин.

Ключові слова: озима пшениця, пероксид водню, ТБК-активні продукти, гідропероксиди, адаптація.

Вступ. В умовах трансформованого середовища гостро постає проблема пошуку оптимальних шляхів розкриття адаптивного потенціалу культурних рослин в агросистемах і малозатратних способів покращення агропродукції в цілому. Кліматичні умови в масштабах геологічного часу змінюються швидше, ніж можуть виникати філогенетичні адаптації, і у зв'язку з цим в багатьох випадках адаптаційні можливості рослин не досягають біологічного оптимуму [1,2]. Практичне втілення способів інтенсифікації адаптивних стратегій залежить як від вдосконалення методів кількісного аналізу фізіологічного стану рослин, так і від ефективності оперування їх інтегральними показниками для оцінки взаємодії генотип-середовище.

Методи аналізу фенотипу дозволяють вивчати процеси онтогенезу рослин з огляду на формування адаптаційних реакцій у відповідь на вплив різноманітних факторів довкілля і визначати характеристики конкретних видів та сортів рослин за певних умов. Об'єктивне визначення фенотипу може здійснюватися на

основі фенотипування рослин (Plant phenotyping), або фенотайпінгу [2, 3, 4].

Фенотайпінг – методологія нового напрямку рослинної феноміки, яка оригінально доповнює класичну фізіологію рослин, дозволяє поєднати різноманітні фізіологічно-біохімічні процеси для розуміння молекулярно-генетичних основ багатифункціонального процесу загального адаптаційного синдрому рослин [3].

Ця методологія являє собою багаторівневе дослідження комплексу рослинних ознак, які пов'язані з процесами росту і розвитку рослин, морфогенезу, фізіологічними реакціями толерантності та резистентності, екологічною пластичністю та, в кінцевому рахунку, біологічною продуктивністю. Вона передбачає як вимірювання окремих кількісних показників, які формують більш складні комплексні ознаки, так і з'ясування фізіологічних реакцій організму, які сприяють формуванню адаптації до майбутнього погіршення умов місцезростання, тобто індукують передадаційні процеси [3]. Останні дають можливість рослинам "немов би, підготуватися" до дії

несприятливих факторів у майбутньому, і, в кінцевому рахунку знизити ступінь ушкодження рослин [5].

За нашим припущенням, в якості такого індуктора передаптивного стану у рослин може виступати пероксид водню. Питання специфічної ролі пероксиду водню в реалізації довготривалих клітинних реакцій у рослинних і тваринних організмів постійно обговорюється в науковій літературі [6,7]. Водночас, окремий внесок у формування цього припущення зробили і результати наших попередніх робіт, які підтверджували участь пероксиду водню у формуванні неспецифічної резистентності рослин озимої пшениці [8].

Згідно з наявними даними літератури, скринінг адаптивного потенціалу сортів пшениці за умов регуляторної дії пероксиду водню є недостатньо висвітленим, водночас залишається відкритим питання можливості застосування методів фенотайпінгу у його здійсненні.

Тому метою нашої роботи було проведення фенотипування за біохімічними параметрами та скринінг рослин сортів пшениці степового екотипу в умовах польового дослідження за екзогенної обробки рослин пероксидом водню.

Матеріали та методи досліджень. В роботі використовували сорти пшениці озимої степового екотипу: Авангард, Шестопапівка, Тітона, Одеська 267, Тронка, Скала, які були створені Приватним сільськогосподарським дослідно-селекційним підприємством "Бор". Всі сорти були висіяні на дослідних ділянках ННЦ "Інститут землеробства" НААН України (сміт Чабани), характеризувались високою посухо- та жаростійкістю та мали комплексну стійкість до хвороб. Агротехніка вирощування загальноприйнята. Для досліджень використовували верхній гарно розвинутий листок рослин головного стебла злаків, оскільки, саме на нього припадає більша частина фотосинтетично активної радіації та, на останніх етапах органогенезу 80% фотоасимілятів надходить до колосу саме з листка верхнього ярусу (прапорцевого листка) [9,10].

Для проведення фенотайпінгу використовували наступні показники: вміст фотосинтетичних пігментів (хлорофілів та каротиноїдів), ТБК-активних продуктів, сульфохіновозилдіацилгліцеролу. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів здійснювали у диметилсульфоксиді за загальноприйнятою методикою [11].

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за кількістю ТБК-активних продуктів на основі реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою [12].

Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за кольоровою реакцією з сульфосаліциловою кислотою [13]. Кількісне визначення сульфоліпідів проводили за Кіном [14]. Активність супероксиддисмутази визначали за Гіанополітсом та Райзом [15].

З метою вивчення біохімічних основ мобілізації пероксидом водню природних захисних механізмів, надземну частину рослин обприскували розчином пероксиду водню в концентрації 1мМ у фазі трубкування. За 72 години проводили другу обробку рослин. Біохімічні дослідження рослин проводили через 24 години після їх двократної обробки.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програм "Microsoft Excel" і "STATISTICA" за Доспеховим [16].

Результати та обговорення. Результати польового скринінгу продемонстрували, що досліджувані сорти рослин характеризуються суттєвими відмінностями в розвитку процесів ПОЛ. Порівнюючи сумарний вміст ТБК-активних продуктів, слід зазначити, що його рівень у листках був високим за значенням у сортів Тронка, Шестопапівка та Скала та низьким у сортів Авангард, Одеська 267 і Тітона (табл. 2). Кількість ТБК-активних продуктів змінювалась від 2,27 до 4,98 мкМ/г сухої речовини, що свідчить про різну чутливість фотосинтетичного апарату рослин окремих сортів до впливу факторів навколишнього середовища.

Фітофізіологи розглядають сульфохіновозилдіацилгліцерол (СХДГ) в якості специфічного структурно-функціонального маркера адаптаційних реакцій рослин. Доведено, що серед ліпідних компонентів, які захищають пігментний комплекс від температурної інактивації, СХДГ є найбільш ефективним [17]. Проведені нами дослідження виявили сортові відмінності за вмістом СХДГ. Серед досліджуваних сортів найбільшу його кількість в листках накопичували рослини сортів Шестопапівка, Тітона і Тронка (табл. 2).

Загальновідомим є факт того, що адаптаційні можливості рослин значною мірою залежать від функціонування їх фотосинтетичного апарату [18]. Типовим показником стану фотосинтетичного апарату рослин є вміст хлорофілів та каротиноїдів як головних фотосенсибілізаторів. Серед обраних для дослідження сортів за вмістом хлорофілів та каротиноїдів у фотосинтезуючих тканинах листків в (мг/г сух. реч.) вирізняються сорти Тітона, Тронка, і Скала (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст ТБК-активних продуктів, сульфохіновозилдіацилгліцеролу, фотосинтетичних пігментів і сухої речовини у сортів степового екотипу

Сорт	ТБК-активні продукти	сульфохіновозилдіацил гліцерол	маса сухої речовини в 1 г сирої речовини	сума хлорофілів	Сума каротиноїдів
	мкМ/г сухої речовини			мг/г сухої речовини	
Авангард	3,69 ± 0,10	35,3 ± 0,4	0,227±0,02	11,0 ± 0,1	2,5 ± 0,0
Шестопапівка	4,25 ± 0,17	41,1 ± 0,7	0,188±0,02	9,2 ± 0,2	1,9± 0,1
Тітона	2,27 ± 0,10	36,4 ± 0,9	0,188±0,01	12,7 ± 0,1	3,3 ± 0,0
Одеська 267	2,89 ± 0,21	29,0 ± 0,9	0,209±0,01	10,1 ± 0,1	2,7 ± 0,0
Тронка	4,98 ± 0,19	35,5 ± 0,1	0,215±0,01	11,8 ± 0,2	3,3 ± 0,2
Скала	3,86 ± 0,10	16,7 ± 0,1	0,203±0,02	11,7 ± 0,4	3,0 ± 0,1

Порівняльний аналіз генотипів за зерновою продуктивністю продемонстрував, що найбільшу врожайність

мали сорти Тітона, Тронка та Скала, що узгоджується з даними, обраними для фенотайпінгу (рис. 1).

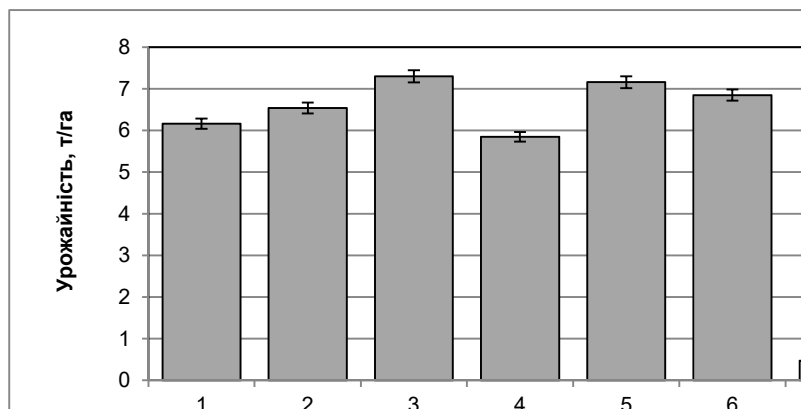


Рис. 1. Урожайність рослин озимої пшениці сортів Авангард (1), Шестопалівка (2), Тітона (3), Одеська 267 (4), Тронка (5) та Скала (6)

Водночас, згідно з результатами наших досліджень, дія H_2O_2 в концентрації 1 мМ призводила до розвитку окиснювального стресу у рослин пшениці сорту Шестопалівка, який характеризувався накопиченням продуктів ПОЛ. Так, загальний вміст гідропероксидів на 24 годину після першої обробки рослин перексидом водню збільшився на 42 %, ТБК-активних продуктів на 14 %, тоді як

на 24 годину після другої обробки загальний вміст гідропероксидів та ТБК-активних продуктів знижувався відносно контролю на 20,9 та 24,7 % відповідно (рис. 2).

Отже, на нашу думку, екзогенна обробка рослин призвела до швидкої адаптації у рослин пшениці, оскільки згідно з концепцією Сельє для такого стану характерне зниження рівня оксидативного окиснення.

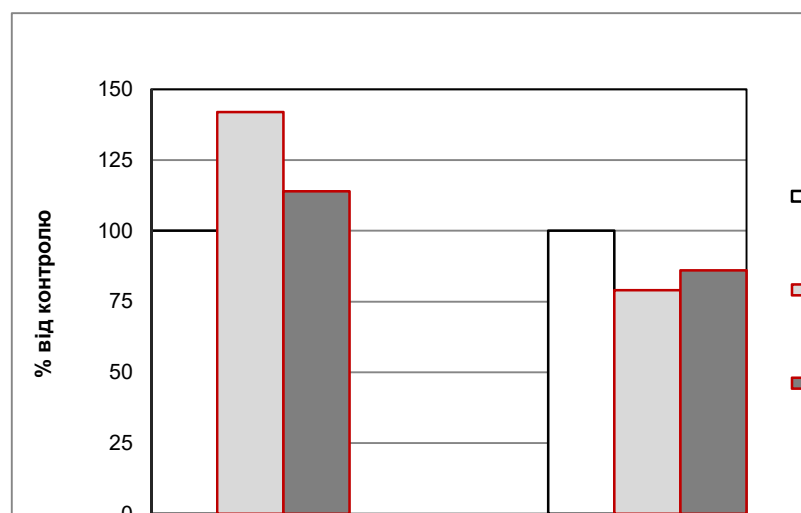


Рис. 2. Вміст гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів у листках пшениці озимої сорту Шестопалівка за дії H_2O_2 (1×10^{-3} М)

Ефективність реалізації адаптаційних стратегій рослин проявляється у здатності до випередження наслідків появи несприятливих умов для їх існування. Водночас, виникнення адаптаційних змін пов'язують з переадаптацією – специфічними та неспецифічними реакціями організму, які сприяють формуванню адаптації до майбутнього погіршення умов місцезростання [2]. Ряд дослідників вважає, що рослини набувають переадаптивного стану за умови підвищення активності ферментативних та неферментативних захисних механізмів [5]. Беручи до уваги той факт, що перексид водню як сигнальна молекула активує (або репресує) роботу генів значної кількості ферментів, сигнальних білків, а також білків, які регулюють окиснювальний гомеостаз клітини, тобто ті процеси, які в сукупності визначають адаптаційні перебудови, захист та розвиток клітин, нами було здійснено позакореневу обробку рослин пшениці 1мМ

H_2O_2 для з'ясування регуляторної функції перексиду водню у переадаптаційних процесах.

Багатьма дослідженнями доведений тісний зв'язок між стійкістю рослин до екстремальних факторів середовища і підвищеним рівнем активності цитозольної супероксиддисмутази. За результатами наших досліджень за однократної обробки рослин H_2O_2 у фотосинтезуючих тканинах листків пшениці розвивались окиснювальні процеси, які, водночас, не зменшували активність СОД (рис. 3).

Досліджувані рослини за першої обробки відповідають на завдане стресове навантаження підвищеним рівнем активності цього ферменту (на 7,6 %), тоді як дворазова обробка викликала збільшення активності СОД щодо контрольних зразків на 46 %. Збільшення активності СОД на перших етапах розвитку стресової відповіді свідчить про активацію захисних систем рослини.

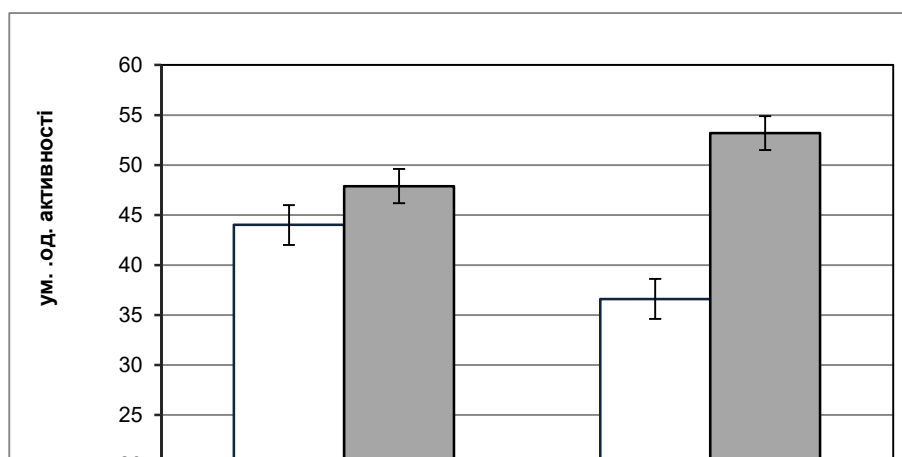


Рис. 3. Активність СОД у листках рослин пшениці озимої сорту Шестопа́лівка за дії H_2O_2 1×10^{-3} М

Останніми роками з'явилися наукові результати, які засвідчують високі антиоксидантні властивості поліфенолів та їхніх похідних, що виступають в якості донора електронів в пероксидазних реакціях [19].

Ряд закордонних дослідників висловлюють припущення, що модуляція внутрішньоклітинного рівня АФК з екзогенного H_2O_2 через активацію каталази може змі-

нювати синтез вторинних метаболітів [20, 21]. Як засвідчили результати наших досліджень окисдаційний стрес активізує фенілпропаноїдний метаболізм у рослин пшениці. Так, вміст загальних фенолів збільшився з 3,77 до 4,78 мг/г сухої речовини в листках сорту Шестопа́лівка (табл. 2).

Таблиця 2. Загальний вміст речовин фенольної природи (мг/г сухої речовини) за дії H_2O_2 10^{-3} М у листках сорту Шестопа́лівка

Варіант		Різниця з контролем	
Контроль	Дослід	мг/г	%
3,77	4,78	1,01	27
НІР _{0,05}		0,67	7

Отже, ми встановили, що двократна обробка пероксидом водню в концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ М активувала захисні механізми у рослин пшениці, що проявилось в зростанні активності СОД на 46 % та збільшенні синтезу речовин фенольної природи на 27 %.

Екзогенна обробка пероксидом водню впливала на формування продуктивного стеблестю та морфометричні параметри дослідних рослин (табл. 3). Відмічено переважувало формування продуктивних стебел при застосуванні у фазу виходу в трубку екзогенного H_2O_2 . Проведені дослідження показали, що екзогенний пероксид водню впливав на формування продуктивного стеблестю у дослідних рослин, загальну кількість сте-

бел та довжину соломини: загальна кількість стебел зростала на 16%, продуктивних на 25%, довжина соломини на 3-8% порівняно з контрольними рослинами.

Факт збільшення кількості стебел дозволяє припустити, що обробка екзогенним пероксидом водню у фазі трубкування спрямовує (переорієнтовує) апікальне домінування головного стебла на користь бічних.

Показано [22], що продукти ліпопероксидації виступають інгібіторами клітинного поділу та росту, а зниження рівня продуктів ліпопероксидації знімає інгібування клітинного поділу та росту тканин, що на нашу думку могло проявитись у збільшенні висоти дослідних рослин.

Таблиця 3. Морфометричні показники сортів озимої пшениці за умов екзогенної обробки рослин H_2O_2 у концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ М

Сорт	Варіант	Кількість продуктивних стебел на м погонний	Висота рослин	Довжина Колоса
		шт.		см
Авангард	К	85 ± 2,7	83,9 ± 1,3	8,0 ± 0,4
	Д	106 ± 2,3	85,0 ± 1,2	8,0 ± 0,3
Шестопа́лівка	К	125 ± 4,1	87,7 ± 1,2	8,2 ± 0,4
	Д	156 ± 3,7	93,7 ± 0,9	8,2 ± 0,3
Тітона	К	132 ± 2,2	80,8 ± 3,0	7,1 ± 0,1
	Д	163 ± 2,4	86,0 ± 3,1	7,5 ± 0,2
Одеська 267	К	128 ± 3,2	93,1 ± 1,5	7,4 ± 0,1
	Д	148 ± 4,6	95,1 ± 1,9	7,6 ± 0,3
Тронка	К	125 ± 2,9	85,5 ± 1,9	9,5 ± 0,3
	Д	148 ± 2,4	91,2 ± 2,5	9,0 ± 0,4
Скала	К	125 ± 4,1	87,7 ± 1,2	8,2 ± 0,4
	Д	140 ± 3,7	88,9 ± 0,9	8,2 ± 0,3

Отже, екзогенна обробка рослин пероксидом водню викликала позитивні морфологічні зміни нових сортів озимої пшениці степового еко типу.

Враховуючи результати нашої роботи, можна констатувати, що фенотипування рослин нових сортів озимої пшениці може сприяти покращенню селекційної роботи та вдосконаленню способів скринінгу висхідного

генетичного матеріалу для її подальшого проведення. Водночас, результати фенотипування підтверджують, що регуляторна дія екзогенного перексиду водню проявляється у покращенні біохімічних та морфологічних параметрів рослин.

Висновки. Фенотипування являє собою інтегральну оцінку фізіологічного стану рослин, яка дозволяє визначити межі адаптивної мінливості та ступінь стійкості генотипу. Проведене шляхом скринінгу фенотипування сортів озимої пшениці в умовах польового досліду за регуляторної дії перексиду водню у концентрації 1×10^{-3} М дозволило нам вибрати селекційний матеріал сортів, біологічні властивості яких найкращим чином адаптовані до умов Лісостепу України. Отримані результати фенотипування узгоджуються з оцінкою біологічної продуктивності рослин та дозволили нам виділити найбільш адаптовані до кліматичних умов лісостепової зони сорти Тітона, Тронка, Шестопалівка.

Обробка рослин перексидом водню у концентрації 1×10^{-3} М сприяє зниженню окиснювальних процесів, активує захисні механізми у рослин пшениці, що проявилось в зростанні активності антиоксидантного ферменту СОД на 46 % та збільшенні синтезу речовин фенольної природи на 27 % та позитивно впливає на формування продуктивного стеблестоя та морфометричні параметри дослідних рослин.

Список використаних джерел:

1. Волкова Н. Є. Добір за допомогою маркерів та геномна селекція в рослинництві: теоретичні аспекти / Н. Є. Волкова // Матеріали міжнар. конф. "Теоретичні основи оптимізації селекційного процесу основних видів сільськогосподарських рослин" – Плейда, 2015. – С. 44–47.
2. Гродзинский Д. М. Адаптивная стратегия физиологических процессов растений / Д. М. Гродзинский. – К.: Наук. думка, 2013. – 301 с.
3. Kumar J. Phenomics in Crop Plants: Trend, options and limitations / J. Kumar, A. Pratap, S. Kumar. – New Delhi: Springer, 2015.
4. Walter A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis / A. Walter, F. Liebisch, A. Hund // Plant Methods 2015; 11:14. DOI 10.1186/s13007-015-0056-8.
5. Грудина Н.С., Бацманова Л.М., Стороженко В.О. Преадаптация как элемент эволюции та фактор формирования неспецифической стойкости растений // Вісник Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій – 2010. – № 13 – С. 35–37.
6. Spasojević I. Hydrogen Peroxide in Adaptation / I. Spasojević, D. R. Jones, M. E. Andrades // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. DOI:10.1155/2012/596019.
7. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network / L.-J. Quan, B. Zhang, W.-W. Shi, H.-Y. Li // Journal of Integrative Plant Biology. – 2008. – 50, № 1. – P. 2–18.
8. Адаптивні реакції рослин озимої пшениці різних екотипів за дії перексиду водню / Л. М. Бацманова, В. О. Стороженко, Н. С. Грудина та ін. // Физиология и биохим. культ. раст. – 2010. – 42, № 2. – С. 163–168.
9. Прядкина Г. О. Физиологические основы повышения продуктивности растений озимой пшеницы / Г. О. Прядкина. – К.: Интерсервис, 2014. – 210 с.
10. Кудоярова Г. Р. Реакция устьиц на изменение температуры и влажности воздуха у растений разных сортов пшеницы, районированных в контрастных климатических условиях / Г. Р. Кудоярова // Физиология растений. – 2011. – 54, № 1. – С. 54–58.
11. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A. R. Wellburn // J. Plant Physiol. – 1994. – 144, № 3. – P. 307–313.
12. Hodges D.M., Delong J.M., Forney C.F. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay forestimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // Planta. – 2009. – 207. – P. 604–611.
13. Физиология растений: практикум / О.В. Войцехівська, А.В. Капустян, О.І. Косик та ін.; за заг. ред. Т. В. Паршиковой. – Луцьк: Терен, 2010. – 420 с.
14. Kean E. A. A rapid sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides / E. A. Kean // J. Lipid Res. – 1968. – 9, № 3. – P. 319–329.
15. Giannopolitis C. N. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries // Plant Physiol. – 1977. – 59, № 2. – P. 309–314.
16. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
17. Таран Н. Ю. Біохімія рослинних ліпідів: навч. посіб. / Н. Ю. Таран, О. А. Оканенко, В. О. Стороженко – К.: Авега. – 2013. – 261 с.
18. Связь между величиной хлорофильного фотосинтетического потенциала и урожайностью озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при повышенных температурах / Г. А. Прядкина, О. О. Стасик, Л. М. Михальская, В. В. Швартау // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 5. – С. 88–95.
19. Олениченко Н. А. Влияние экзогенных фенольных соединений на перекисное окисление липидов у растений пшеницы / Н. А. Олениченко, Е. С. Гордкова, Н. В. Загоскина // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – 52, № 3. – С. 58–61.
20. Veljovic-Jovanovic S. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate / S. Veljovic-Jovanovic, G. Noctor, C. H. Foyer // Plant Physiol Biochem. – 2012, № 40. – P. 501–507.
21. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extract / G. Queval, J. Hager, B. Gakiere, G. Noctor // Journal of Experimental Botany. – 2012. – 59, № 2. – P. 135–146.
22. Феofilова Е. П. Значение реакций свободнорадикального окисления в регуляции роста и липидообразования эукариотных и прокариотных организмов / Е. П. Феofilова, Е. Б. Буракова, Л. С. Кузнецова // Прикл. биох. и микробиол. – 1987. – 20, № 1. – С. 3–7.

References:

1. Volkova N. Dobir za dopomogoyu markeriv ta genomna selektsiya v roslinnitsvi: teoretichni aspekti / N.E. Volkova //Materialu mlzhnar. konf. "Teoretichni osnovu optimizatsiya selektsynogo protsesu osnovnuh vudiv silskogospodarskih roslin" – Pleyada, 2015. – S. 44-47.
2. Grodzinskiy D. Adaptivnaya strategiya fiziologicheskikh protsessov rasteniy – K.: Naukova dumka, 2013. – 301 s.
3. Kumar J., Pratap A., Kumar S. Phenomics in Crop Plants: Trend, options and limitations – New Delhi: Springer, 2015.
4. Walter A., Liebisch F., Hund A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. Plant Methods 2015; 11:14 DOI 10.1186/s13007-015-0056-8.
5. Grudina N., Batsmanova L., Storozhenko V. Preadaptatsiya yak element evolyutsiy ta faktor formuvannya nespetsifichnoy stiykostil roslun // Visnik Kuyivskogo natsionalnogo universitetu imeni Tarasa Shevchenka. Problemi regulyatslii fiziologichnuh funktsiy – 2010. – №13 – S. 35-37.
6. Spasojević I., Jones D., Andrades M. Hydrogen Peroxide in Adaptation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2012. doi:10.1155/2012/596019.
7. Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network// Journal of Integrative Plant Biology. – 2008. – 50, №1. – P. 2–18.
8. Batsmanova L., Storozhenko V., Grudina N., Taran N., Musienko M. Adaptuvni reakcii roslun ozimoyi pshenutci riznuh ekotuplv za dii peroksidu vodnyu // Fiziologiya i biokhim. kult. rost. – 2010. – 42, # 2. – S. 163–168.
9. Pryadkina G. Fiziologichni osnovi pidvischennya produktivnosti roslin ozimoyi pshenitsi – K.: Interservis, 2014. – 210 s.
10. Kudoyarova G. Reaktsiya ustits na izmenenie temperatury i vlazhnosti vozduha u rasteniy raznykh sortov pshenitsyi, rayonirovannykh v kontrastnykh klimaticheskikh usloviyakh / G.R. Kudoyarova // Fiziologiya rasteniy. – 2011. – 54, №1. – C. 54–58.
11. Wellburn A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution/ A.R. Wellburn // J. Plant Physiol. – 1994. – 144, № 3. – P. 307–313.
12. Hodges D., Delong J., Forney C. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay forestimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // Planta. – 2009. – 207. – P. 604–611.
13. Fiziologiya roslun: praktikum / O.V. Voytsehlvska, A.V. Kapustyan, O.I. Kosik ta in. Za zag.red. T.V. ParshikovoYi – Lutsk: Teren, 2010. – 420 s.
14. Kean E. A rapid sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides / E. A. Kean // J. Lipid Pesearch. – 1968. – 9, № 3. – P. 319–329.
15. Giannopolitis C., Ries S. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. – 1977. – 59, № 2. – P. 309–314.
16. Dospehov B. Metodika polevogo opyta – M.: Agropromizdat, 1985. – 351 s.
17. Taran N., Okanenko O., Storozhenko V. Blohlmlya roslinnih lpldlv: navchlniy poslbnik – K: Avega. – 2013. – 261 s.
18. Pryadkina G., Stasik O., Mihalskaya L., Shvartau V. Svyaz mezhdv velichiny hlrofllnogo fotosinteticheskogo potentsiala i urozhaynostyu ozimoy pshenitsyi (Triticum aestivum L.) pri povyshennykh temperaturah // Selskohozyaystvennaya biologiya. – 2014. – # 5. – S. 88–95.
19. Olenichenko N. Vliyane ekzogenykh fenolnykh soedineniy na perekisnoe okislenie lipidov u rasteniy pshenitsyi / N.A. Olenichenko, E.S. Gorodkova, N. V. Zagoskina // Selskohozyaystvennaya biologiya. – 2011. – 52, # 3. – S. 58–61.
20. Veljovic-Jovanovic S., Noctor G., Foyer C. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate // Plant Physiol Biochem. – 2012, № 40. – P. 501–507.
21. Queval G. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extract / G. Queval, J. Hager, B. Gakiere, G. Noctor // Journal of Experimental Botany. – 2012. – 59, № 2. – P. 135–146.
22. Feofilova E., Burlakova E., Kuznetsova L. Znachenie reaktsiy svobodnoradikalnogo okisleniya v regulyatsii rosta i lipidobrazovaniya eukariotnykh i prokariotnykh organizmov // Prikl. biokh. i mikrobiol. – 1987. – 20, № 1. – S. 3–7.

Н. Мусиенко, д-р биол. наук, проф., акад. НААН України, Н. Таран, д-р биол. наук, проф., В. Стороженко, канд. биол. наук, Л. Бацманова, канд. биол. наук, Н. Грудина, инж. 1 категории, Н. Светлова, канд. биол. наук, Л. Серга, канд. биол. наук УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ ПО БИОХИМИЧЕСКИМ МАРКЕРАМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ ДЛЯ СКРИНИНГА СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Проведен полевой скрининг и фенотипирование по биохимическим параметрам сортов озимой пшеницы степного экотипа при экзогенной обработке растений пероксидом водорода. Количество ТБК-активных продуктов, фотосинтетических пигментов и сульфохиновозилдиацилглицерола существенно отличалось в листьях исследуемых сортов при нормальных условиях. После первой внекорневой обработки растений пероксидом водорода наблюдалось повышение содержания ТБК-активных продуктов и гидропероксидов, а после второй – их существенное снижение в листьях сорта Шестопаловка. Экзогенная обработка пероксидом водорода положительно влияла на формирование продуктивного стеблестоя и морфометрические параметры исследуемых растений.

Ключевые слова: озимая пшеница, пероксид водорода, ТБК-активные продукты, гидропероксиды, адаптация.

M. Musienko, DSc, Prof., Acad. of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, N. Taran, DSc, Prof., V. Storozhenko, PhD, L. Batsmanova, PhD, N. Grudina, engin., N. Svetlova, PhD, O. Serga, PhD ESC Institute of biology and medicine, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PHENOTYPING WITH BIOCHEMICAL MARKERS OF PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF PLANTS TO SCREENING OF WINTER WHEAT VARIETIES

Field screening and phenotyping with biochemical parameters of winter wheat plants of steppe ecotype treated with exogenous hydrogen peroxide was carried out. The content of TBARS, photosynthetic pigments and sulfoxinosyl diglyceride significantly different in leaves of all varieties under normal conditions. The increase in content of TBARS and hydroperoxides was observed after the first foliar treatment of plants by hydrogen peroxide. After the second treatment we observed significant reduction of them in leaves of Shestopalivka variety. Exogenous treatment with hydrogen peroxide induced positive influence on the formation of planting and morphometric parameters of investigated plants.

Key words: winter wheat, hydrogen peroxide, TBARS, hydroperoxides, adaptation.

УДК: 636:599:528.6:633.34

Р. Федорук, д-р вет. наук, проф., М. Храбко, асп., М. Цап, канд. с.-г. наук, Г. Денис, канд. с.-г. наук
Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна,
У. Тесарівська, канд. вет. наук

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів, Україна

РЕГУЛЯТОРНИЙ ВПЛИВ НАНОГЕРМАНІЮ ЦИТРАТУ НА ВМІСТ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У ТКАНИНАХ ВАГІТНИХ САМИЦЬ ЩУРІВ F₁

Встановлено вірогідні міжгрупові зміни вмісту макро- та мікроелементів у крові, внутрішніх органах та стегновому м'язі вагітних самиць щурів F₁ за тривалої дії різних доз наногерманію цитрату, отриманого методом нанотехнології. Виявлено інгібуючий вплив цитрату Ge на вміст Ca у крові тварин усіх дослідних груп, проте концентрація Р вірогідно зростала за впливу тільки низьких доз цитрату Ge. Характерно, що за дії 10 і 20 мкг Ge відзначено вірогідно нижчий вміст Cu, Co, Fe і Zn у печінці, проте високий вміст Mn у печінці, нирках та стегновому м'язі. Застосування високої дози HGeCl₃ в кількості 200 мкг Ge/кг маси тіла, зумовлює збільшення вмісту Fe і Zn у печінці та Co у м'язі, але зменшення Mn у легенях. Неоднаковий вплив різних доз цитрату Ge на вміст окремих елементів у тканинах вагітних самиць щурів F₁ підтверджується аналогічними змінами абсолютного вмісту мікроелементів у внутрішніх органах за перерахунку на їх масу.

Ключові слова: тканини, цитрат германію, щури, макро- та мікроелементи.

Вступ. Органічні сполуки Ge активно досліджуються в біології, медицині та ветеринарії, оскільки мають високу біологічну активність порівняно з його оксидами та солями мінеральних кислот. В Україні методом нанотехнології одержано екологічно безпечний цитрат Ge, що володіє низкою переваг порівняно з його мінеральними та хімічно синтезованими органічними сполуками [1–3]. Висока метаболічна спроможність наногерманію цитрату (HGeCl₃) зумовлює різноманітні фізіологічно виражені ефекти, у тому числі виявляє різнонаправлені зв'язки з іншими макро- і мікроелементами, впливає на їх кумуляцію у тканинах і органах [2–4]. У зв'язку з цим у біологічній науці приділяється значна увага особливостям взаємодії Ge з окремими макро- та мікроелементами в організмі, як важливий медико-біологічний і соціальний проблеми [2, 5]. Значна кількість робіт присвячена дослідженню взаємозв'язку есенційних елементів, у тому числі їх цитратів, у фізіолого-біохімічних процесах організму [5, 6]. Зокрема відзначено, що Ge, Cu, Zn, Se, Mo беруть участь у процесах клітинного дихання, репродукції ДНК і РНК, дезактивації вільних радикалів, а перекисне окиснення ліпідів у гепатоцитах щурів інгібується введенням Cr, Mn і Zn [3, 5]. Одержано дані про важливу роль Ge у процесах мінералізації кісток. Зокрема, відзначено позитивний вплив карбоксиметилгермесквіок-

сану на терапевтичний перебіг експериментальної моделі остеопорозу [7]. Доведено, що застосування сполук Ge з органічними кислотами впливає на обмін Ca і P в організмі та депонування їх у кістковій тканині. Такі сполуки виявляють карієс-профілактичну дію і сприяють покращенню процесів мінералізації кісток [2, 3, 7].

На даний час вивчено умови регуляторного впливу середовища на засвоєння макро- і мікроелементів в організмі [5, 8]. Відзначено, що вміст Ge у лікарських рослинах (женьшень, деревій, кульбаба) виявляє регуляторний прямо пропорційний зв'язок із рівнем Fe, Cu, Zn, Mn [9]. Установлено, що на біодоступність та депонування мінеральних елементів в організмі впливає їх взаємодія як у травному каналі, так і у процесах метаболізму [3, 10]. Експериментальне вивчення HGeCl₃, що започатковане в Інституті біології тварин НААН, також указує на його високу фізіологічну активність у різних дозах і метаболічний зв'язок з іншими мікроелементами [4, 6]. Однак, вікові, статеві та органо-тканинні особливості дії різних доз HGeCl₃, синергічні та антагоністичні зв'язки Ge з іншими мікроелементами не з'ясовані.

Матеріали і методи. Дослідження проведено у віварії Інституту біології тварин НААН на білих лабораторних щурах-самцях, поділених на 4 групи за принци-

пом аналогів, по 4–5 тварин у кожній. Контрольна (К) група отримувала збалансований стандартний раціон (СР) зі згодовуванням гранульованого комбікорму впродовж усього періоду досліджень і споживанням води без обмеження. Тваринам дослідних (Д1, Д2, Д3) груп згодовували корми СР і застосовували з водою наногерманію цитрат, виготовлений нанотехнологічним методом [1], у таких кількостях (мкг Ge/кг маси тіла): Д1 – 10; Д2 – 20; Д3 – 200. Водний розчин наногерманію цитрату у концентрації 1,2 г/дм³, рН 1,30 отримано від ТОВ "Нанотехнології та наноматеріали", м. Київ. Надходження HGeЦ в організм щурів F₁ дослідних груп тривало впродовж лактації самиць F₀ (із материнським молоком) і спожитою водою після виходу із гнізда, у період фізіологічного і статевих дозрівання та запліднення і завершувалося на 19–20 добу вагітності. Природне парування проводили у віці 4–4,5 місяці з розрахунку 1 самець на 2–3 самиці. На 19–20 доби вагітності відповідно до міжнародних [11] і національних [12] вимог від самиць після наркозу, знерухомлення та розтину черевної і грудної порожнин, відбирали кардіальну кров, печінку, нирки, легені та м'язи стегна. Досліджували концентрацію Ca і P у сироватці крові на біохімічному аналізаторі "Humalyzer" 2000 (Німеччина), масу органів, а після сухої мінералізації зразків – вміст мікроелементів у тканинах за допомогою атомно-адсорбційного спектрофотометра СФ-115 ПК згідно з методикою, що описана в довіднику [13]. Отриманий цифровий матеріал опрацьовано методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента. Роз-

раховували середні арифметичні величини (M) та похибки середніх арифметичних величин ($\pm m$) маси внутрішніх органів, вміст Ca і P у крові, а Cu, Co, Mn, Fe і Zn – у печінці, нирках, легенях і стегновому м'язі, а також абсолютного вмісту вказаних елементів з урахуванням маси цих органів. Зміни вважали вірогідними за $p \leq 0,05$. Для розрахунків використано комп'ютерну програму Excel.

Результати та обговорення. Установлено вірогідно нижчий вміст Ca у крові самиць щурів дослідних груп, яким відповідно вводили 10, 20 і 200 мкг наногерманію цитрату (рисунк). Це може вказувати на посилення використання Ca крові у метаболічних процесах організму вагітних самиць, у тому числі на забезпечення і розвиток плодів за дії цитрату Ge. Крім того, можливо цитрат Ge виступає антагоністом надходження іонів Ca через кишковий епітелій самиць щурів за дії як низьких (10 і 20 мкг), так і високої (200 мкг) доз. Концентрація загального P у крові самиць щурів Д1 і Д2 груп була вищою ($p < 0,01$; $p < 0,05$), ніж у тварин контрольної групи і вірогідно не відрізнялась у самиць Д3 групи за дії вищої (200 мкг) дози Ge. Аналогічні зміни щодо вмісту Ca у крові отримано нами у самиць щурів F₀ [11], за дії цих доз Ge. Однак, концентрація P у самиць F₁, на відміну від F₀ виявляла протилежне спрямування змін у тварин дослідних груп, що може зумовлюватися відмінностями фізіологічного стану самиць F₀ у період виведення з досліду (2 місяці після народження щуренят) і F₁ – 20-та доба вагітності у період етаназії.

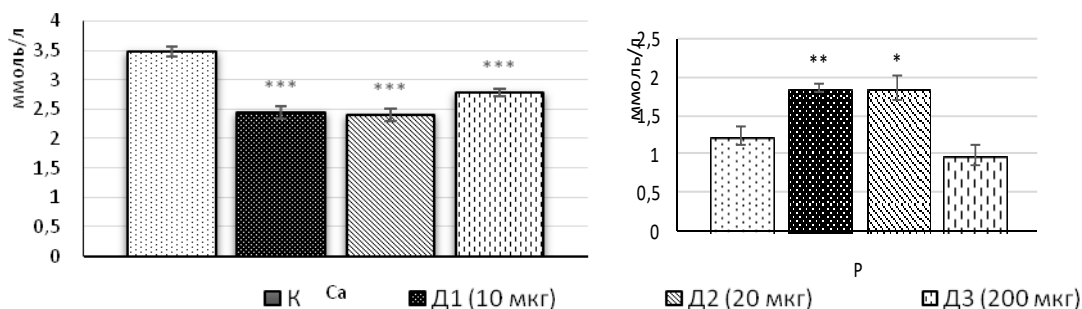


Рисунок. Вміст кальцію та фосфору у крові вагітних самиць щурів F₁ (n=4, 5)

Примітка. У цьому рисунку та наступних таблицях різниця статистично вірогідна порівняно з контрольною (I) групою; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$.

Аналіз результатів дослідження вмісту мікроелементів у тканинах внутрішніх органів і стегнового м'яза самиць щурів вказує на вірогідно вищий рівень Mn у печінці, нирках і м'язі тварин Д1 і Д2 груп (табл. 1). У м'язах щурів Д3 групи, які отримували 200 мкг Ge, встановлено вищий ($p < 0,05$), а у Д2 – нижчий ($p < 0,001$)

вміст Co, що вказує на протилежний вплив високої і низьких доз Ge на його рівень у м'язах. Характерно, що за дії високої дози цитрату Ge вірогідно збільшується вміст Fe і Zn ($p < 0,05$; $p < 0,01$) у печінці вагітних самиць F₁, тоді як у легенях – зменшується вміст Mn ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою.

Таблиця 1. Вміст мікроелементів у тканинах вагітних самиць щурів F₁, мг/кг (n=3–5)

Тканини	Елементи	Група			
		К	Д1	Д2	Д3
Печінка	Cu	4,5±0,22	2,5±0,18***	2,2±0,16***	5,0±0,26
	Co	1,3±0,09	0,5±0,05***	0,7±0,02***	1,1±0,06
	Mn	2,5±0,16	8,6±0,23***	5,0±0,17***	2,6±0,21
	Fe	27,0±1,34	12,4±0,66***	19,2±0,90**	32,6±1,60*
	Zn	41,5±2,15	22,5±2,44***	30,0±2,76*	53,1±2,42**
Нирки	Cu	7,7±0,45	6,6±0,39	3,99±0,13***	8,1±0,39
	Co	1,15±0,24	1,00±0,26	1,13±0,19	1,49±0,07
	Mn	1,96±0,17	3,46±0,14***	3,88±0,14***	2,23±0,16
	Fe	40,3±4,30	25,0±1,91**	33,4±1,24	39,2±2,66
	Zn	74,1±5,96	56,6±3,80*	76,4±4,60	71,0±4,37

Завершення табл. 1

Тканини	Елементи	Група			
		К	Д1	Д2	Д3
Легені	Cu	5,6±0,48	5,6±0,45	4,01±0,38*	5,3±0,30
	Co	1,2±0,05	0,8±0,04***	1,0±0,03*	1,4±0,07
	Mn	2,07±0,13	1,86±0,07	2,16±0,14	1,55±0,11*
	Fe	38,3±2,91	33,8±3,09	40,6±0,59	45,4±1,79
	Zn	53,6±3,94	41,1±1,00*	48,9±2,20	56,2±2,85
М'язи	Cu	2,2±0,07	1,8±0,10**	2,3±0,06	2,2±0,19
	Co	0,64±0,02	0,69±0,06	0,47±0,01***	0,76±0,04*
	Mn	0,46±0,04	0,99±0,06***	0,93±0,08***	0,49±0,04
	Fe	10,0±0,96	8,9±0,75	9,7±0,45	7,9±0,50
	Zn	27,4±1,94	23,6±1,52	24,0±1,82	23,0±1,95

У тканинах нирок відзначено зниження вмісту Fe і Zn ($p < 0,01$; $p < 0,05$) у Д1 і Cu ($p < 0,001$) – у Д2 групах. Зменшувався ($p < 0,05$; $p < 0,001$) також у тканинах легень тварин Д1 групи вміст Co і Zn, а у Д2 – Cu і Co порівняно з контрольною, що може вказувати на органотканинні відмінності впливу HGeЦ на метаболізм цих елементів у досліджених органах. Це підтверджується менше вираженими відмінностями вмісту вказаних елементів у тканинах м'язів. Зокрема, вміст Fe і Zn у стегновому м'язі щурів усіх дослідних груп порівняно з контролем вірогідно не відрізнявся, але був нижчим для Cu ($p < 0,01$; Д1 група) та Co ($p < 0,001$; Д2 група).

У науковій літературі нам не вдалося знайти прямих даних щодо взаємозв'язку вмісту Ge у тканинах щурів із дослідженими елементами. За даними А. В. Скального, І. А. Рудакова [3] синергісти та антагоністи Ge не відомі. У раніше проведених нами дослідженнях встановлено

аналогічно нижчий вміст Cu (за дії 20 мкг Ge), Co (за дії 20 і 200 мкг Ge), а також Zn (20 мкг Ge) у тканинах печінки і нирок самиць щурів F₀ [4]. Однак, прямих залежностей для інших елементів нами не встановлено, що може зумовлюватися відмінностями фізіологічного стану самиць F₀ і F₁ поколінь у період їх виведення з дослідів.

Визначення абсолютного вмісту мікроелементів з урахуванням маси органів самиць щурів F₁ за дії різних доз HGeЦ свідчить про збільшення вмісту Mn у печінці та нирках ($p < 0,001$) самиць Д1 і Д2 груп і менше виражене – у Д3 групі, а також спостерігається зменшення Cu (Д1–Д3 групи), Co, Fe і Zn (Д1 і Д2 групи) – у печінці та Cu і Fe (Д2 група) – у нирках (табл. 2). У легенях вірогідно зменшується вміст Cu (Д2) на 43 %, Co (Д1 і Д2) – 42,3 і 34,3 %, Mn (Д1 і Д3) – 18,2 і 24,3 % та Zn (Д1 і Д2 групи) – 30,3 і 27,8 % відповідно порівняно з контрольною групою.

Таблиця 2. Абсолютний вміст мікроелементів у внутрішніх органах вагітних самиць щурів F₁, мг (n=3–5)

Орган та його маса, елементи	Група			
	К	Д1	Д2	Д3
Печінка, г	8,2±0,64	6,8±0,34	6,5±0,27*	10,6±0,63*
Cu	37,2±1,78	17,1±1,21***	14,5±1,02***	52,8±2,76**
Co	10,89±0,75	3,54±0,34***	4,70±0,11***	11,53±0,68
Mn	20,6±1,29	58,8±1,60***	32,5±1,08***	25,4±2,59
Fe	221,2±10,96	84,3±4,46***	124,6±5,86***	276,6±70,38
Zn	535,6±77,68	152,8±16,61**	195,2±17,95**	563,3±25,66
Нирки, г	1,15±0,11	1,39±0,09	1,22±0,03	1,33±0,07
Cu	8,9±0,52	9,1±0,54	4,9±0,16***	10,7±0,52*
Co	1,32±0,27	1,39±0,36	1,38±0,23	1,98±0,09*
Mn	2,26±0,19	4,82±0,19***	4,73±0,17***	2,97±0,22*
Fe	46,303,16	34,8±2,66*	40,7±1,52	52,2±3,53
Zn	85,2±6,86	78,7±5,28	93,2±5,61	94,4±5,81
Легені, г	1,43±0,06	1,30±0,06	1,13±0,11*	1,45±0,08
Cu	7,96±0,69	7,34±0,59	4,54±0,43**	7,70±0,43
Co	1,75±0,08	1,01±0,05***	1,15±0,03***	1,96±0,16
Mn	2,96±0,18	2,42±0,10*	2,44±1,6	2,24±0,16*
Fe	54,7±4,16	43,9±4,01	45,8±0,67	65,8±2,60
Zn	76,6±5,63	53,4±1,30**	55,3±2,49*	81,5±4,13

Зазначимо, що за високої дози (200 мкг) HGeЦ вірогідно зростала концентрація Cu у печінці – на 41,9 % та нирках – Cu, Co і Mn відповідно на 20,2; 50 і 31,4 %. Тоді як вміст Mn у легенях вірогідно зменшувався на 24,3 % порівняно з контрольною групою.

Висновки. 1. Додавання різних кількостей HGeЦ до питної води самицям щурів F₁ характеризувалось низьким вмістом Ca у крові всіх досліджуваних тварин, тоді як концентрація P – зростала за дії 10 і 20 мкг Ge.

2. Тривале додавання самицям щурів F₁ низьких доз HGeЦ зумовлювало зниження у тканинах печінки щурів вмісту Cu, Co, Fe і Zn, нирок – Fe, Zn і Cu, легень – Cu, Co і Zn та м'язів – Cu і Co за дії 10 і 20 мкг Ge, однак такі низькі кількості цитрату Ge викликали збільшення вмісту Mn у печінці, нирках та м'язі.

3. Застосування високої (200 мкг) дози HGeЦ стимулювало збільшення вмісту Fe і Zn у печінці та Co – у

м'язі, проте зменшення Mn – у легенях і не викликало вірогідних змін досліджених елементів у тканинах нирок.

Список використаних джерел:

1. Ukraine patent for utility model number 38391. IPC (2006): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/126 (2008.01), C07C 53/10 (2008.01), A23L 1/00, B82B 3/00. Method metal carboxylates "Nano technology receiving metal carboxylates" // M. V. Kosinov, V. G. Kaplunenko. – Publish. 12.01.2009, Bull. № 1. In Ukrainian.
2. Pharmacological effects germanium compounds / I. Y. Seyfullina, O. D. Nemyatyn, V. D. Lukyanchuk, E. V. Tkachenko / Odessa Medical Journal. – 2003. – № 6. – P. 111–114. In Ukrainian.
3. Skalny A. V. Bioelements in medicine / A. V. Skalny, I. A. Rudakov // "Onyx 21" Publishing House, World. – 2004. – 272 p. In Ukrainian.
4. Microelements content in tissues of female rats F₀ and males F₁ at the water in nano and chemically synthesized germanium citrate / M. I. Khrabko, R. S. Fedoruk, M. I. Khrabko et al. // The Animal biology. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 125–134. In Ukrainian.
5. Interaction micronutrients, biological, medical and social aspects / I. M. Trachtenberg, I. S. Chekman, V. O. Linnik, V. G. Kaplunenko // Bulletin of the National Academy of Sciences. – 2013. – Vol. 6. – P. 11–20.

6. Khrabko M. Physiological and biochemical processes in the organism of F₀ female and F₁ males rats under watering the nano germanium citrate and germanium citrate obtained by chemical synthesis / M. Khrabko, R. Fedoruk, O. Dolaychuk // Visnyk of the Lviv University. Series: Biology. – 2016. – Issue 73. – P. 226–234. In Ukrainian.
7. Fujii A. Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats / A. Fujii, N. Kudoyama, J. Yamane // Gen. Pharmacol. – 1993. – Vol. 24, № 6. – P. 1527–1532.
8. Melnychuk S. D. Integrated provision of human micronutrients – problems and solutions / S. D. Melnychuk, L. I. Moklyachuk, M. V. Draha // Agroecological journal. – 2012. – № 2. – P. 24–27.
9. Komarov B. A. About an element of germanium and its role in bioprocesses [Electronresource] / B. A. Komarov, A. B. Komarov, K. B. Komarova // Phytotherapy. – 2014. The mode of access to the resource: http://www.treskunov.ru/fitohtodezi/komarov_o_germanii.html.
10. Telyatnikov A. V. Use of nano particles of Mg, Fe, Co, Cu, Zn, Ag at fractures of bones and the complications in dogs : Author's abstract Dis For obtaining sciences. Degree doc. Vet Sciences: special 16.00.05 "Veterinary surgery" / Telyatnikov A. V. – BilaTserkva, 2017. – 36 p. In Ukrainian.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. And others scientific purposes. – Coun. Of Europe, Strasbourg. – 1986. – P. 53.
12. Law of Ukraine № 3447-IV "On protection of animals from cruelty" / Supreme Council of Ukraine. – Official. kind. – 2006. – № 27. – S. 990, P. 230. – (Library official publications).
13. Kovalenko L. Evaluation nano akvahal at germanium stimulating action on the natural resistance of animals / L. Kovalenko // Scientific Herald NUBIP Ukraine, 2012. – № 172 (1). – P. 203–209.
14. Vlizlo V. V. Laboratory methods of investigation in biology, stockbreed in gand veterinary / V. V. Vlizlo, R. S. Fedoruk, I. B. Ratychetal // Reference book; edited by V. V. Vlizlo. – Lviv : SPOLOM. – 2012. – 764 p. In Ukrainian.

References:

1. Kosinov M., Kaplunenkov V. 2009. Method metal carboxylates "Nanotechnology receiving metal carboxylates". Ukraine. Pat. 38391. [Ukrainian].
2. Seyfullina I., Nemyatyh O., Lukyanchuk V., Tkachenko E. Pharmacological effects germanium compounds. Odessa Medical Journal, 2003, 6: 111–114. [Ukrainian]

3. Skalny A., Rudakov I. Bioelements in medicine. "Onyx 21" PublishingHouse, World, 2004: 272 p. [Ukrainian]
4. Khrabko M., Fedoruk R., Khrabko M., Martsinko E., Denys H. Microelements content in tissues of female rats F₀ and males F₁ at the watering nano and chemically synthesized germaniumcitrate. The Animal biology, 2017, 19, (1): 125–134. [Ukrainian]
5. Trachtenberg I., Chekman I., Linnik V., Kaplunenkov V. Interaction micronutrients, biological, medical and social aspects. Bulletin of the National Academy of Sciences, 2013, 6: 11–20. [Ukrainian]
6. Khrabko M., Fedoruk R., Dolaychuk O. Physiological and biochemical processes in the organism of F₀ female and F₁ males rats under watering them nanogermanium citrate and germanium citrate obtained by chemical synthesis. Visnyk of the Lviv University. Series: Biology, 2016, 73: 226–234. [Ukrainian]
7. Fujii A., Kudoyama N., Yamane J. Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats. Gen. Pharmacol, 1993, 24(6): 1527–1532.
8. Melnychuk S., Moklyachuk L., Draha M. Integrated provision of human micronutrients – problems and solutions. Agro ecological journal, 2012, 2: 24–27.
9. Komarov B., Komarov A., Komarova K. About an element of germanium and its role in bioprocesses [Electronresource]. Phytotherapy, 2014. The mode of access to the resource: http://www.treskunov.ru/fitohtodezi/komarov_o_germanii.html.
10. Telyatnikov A. Use of nanoparticles of Mg, Fe, Co, Cu, Zn, Ag at fractures of bones and their complication sindogs. Bila Tserkva, 2017: 36 p. [Ukrainian]
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. And others scientific purposes. Coun. Of Europe, Strasbourg, 1986: 53.
12. Law of Ukraine № 3447-IV "On protection of animals from cruelty". Supreme Council of Ukraine. Official. kind. 2006, 27, 990: 230. (Library official publications). Kovalenko L. Evaluation nanoakvahalat germanium stimulating action on the natural resistance of animals. Scientific Herald NUBIP Ukraine, 2012, 172 (1): 203–209.
13. Vlizlo V., Fedoruk R., Ratych I. Laboratory methods of investigation in biology, stockbreeding and veterinary. Reference book. Lviv. Spolom. 2012: 764. [Ukrainian]

Надійшла до редколегії 07.11.17

Р. Федорук, д-р вет. наук, М. Храбко, асп., М. Цап, канд. с.-х. наук, Г. Денис, канд. с.-х. наук

Институт биологии животных НААН, Львов, Украина,

У. Тесаривска, канд. вет. наук

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, Львов, Украина

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ НАНОГЕРМАНИЯ ЦИТРАТА НА СОДЕРЖАНИЕ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ТКАНЯХ БЕРЕМЕННЫХ САМОК КРЫС F₁

Установлены достоверные межгрупповые изменения содержания макро- и микроэлементов в крови, внутренних органах и бедренной мышце беременных самок крыс при длительном выпаивании различных доз наногермания цитрата, полученного методом нанотехнологии. Выявлено ингибирующее влияние цитрата Ge на содержание Са в крови животных всех опытных групп, однако концентрация Р достоверно возросла при выпаивании низких доз цитрата Ge. Характерно, что при действии 10 и 20 мкг Ge отмечено достоверно более низкое содержание Си, Со, Fe и Zn в печени, однако высокое содержание Mn в печени, почках и бедренной мышце. Выпаивание высокой дозы HGeЦ в количестве 200 мкг Ge приводит к увеличению содержания Fe и Zn в печени и Со – в мышце, но к уменьшению Mn в легких. Неодинаковое влияние различных доз цитрата Ge на содержание отдельных элементов в тканях беременных самок крыс F₁ подтверждается аналогичными изменениями абсолютного содержания микроэлементов в пересчете на массу исследуемых органов.

Ключевые слова: ткани, цитрат германия, крысы, макро-, микроэлементы.

R. Fedoruk, DSc., M. Khrabko, PhD stud., M. Tsap, PhD, H. Denys, PhD

Institute of animal biology Acad. of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Lviv, Ukraine,

U. Tesarivska, PhD

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

REGULATORY IMPACT NANOGERMANIUM CITRATE CONTENT OF MACRO AND MICROELEMENTS IN THE TISSUES OF PREGNANT FEMALE RATS F₁

The probable intergroup changes in the content of macro- and microelements in the blood, internal organs and femur of pregnant females have been established for the prolonged release of various doses of nanogermanium citrate obtained by the method of nanotechnology. The inhibitory effect of citrate Ge on Ca content in the blood of animals in all experimental groups was detected, but the concentration of P was significantly increased with the release of low doses of citrate Ge. Characteristically, the effects of 10 and 20 mkg Ge indicated a significantly lower content of Cu, Co, Fe and Zn in the liver, but high content of Mn in the liver, kidneys and femur muscle. The injection of a high dose of HGeCit, in the amount of 200 mkg of Ge, results in an increase in Fe and Zn in the liver and Cu in the muscle, but a decrease in the Mn in the lungs. The unequal effects of various doses of Ge citrate on the content of individual elements in the tissues of pregnant female F₁ rats is confirmed by analogous changes in the absolute content of microelements in terms of the mass of investigated organs.

Key words: tissues, germanium citrate, rats, macro-, microelements.

УДК 612.821:612 82/83

Т. Халявка, канд. хім. наук, О. Колосова, мол. наук. співроб.,
С. Федорчук, канд. біол. наук
Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ, Україна

ЕФЕКТИВНІСТЬ ПСИХІЧНОЇ САМОРЕГУЛЯЦІЇ, ЕМОЦІЙНА СТІЙКІСТЬ І СТРЕС-УРАЗЛИВІСТЬ СПОРТСМЕНІВ-ТЕНІСІСТІВ ЗА МЕТОДИКОЮ ВИБОРУ КОЛЬОРІВ У ЗВ'ЯЗКУ З ФУНКЦІОНАЛЬНИМ СТАНОМ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО АПАРАТУ

Виявлено взаємозв'язок електронейроміографічних та психологічних характеристик у спортсменів-тенісистів: вищий швидкості проведення нервового імпульсу відповідали нижчий рівень стресу, більш високий рівень ефективності психічної саморегуляції й адаптивності, вищий рівень емоційної стійкості. Установлена статистично значуща позитивна кореляція між коефіцієнтом вегетативного балансу за тестом М. Люшера та швидкістю проведення нервового імпульсу по моторних волокнах середнього нерва верхньої кінцівки, що може бути обумовлено функціональним станом серцево-судинної системи. Отримані результати можна використати для корекції тренувального процесу молодих спортсменів-тенісистів.

Ключові слова: електронейроміографія, швидкість проведення нервового імпульсу, рівень стресу, психічна саморегуляція, адаптивність, емоційна стійкість, спортсмени, теніс.

Вступ. Емоції, як відомо, виконують важливу регулюючу роль у формуванні функціонального стану та цілеспрямованої поведінки людини, як позитивну, так і негативну, що спонукає до глибшого вивчення психоемоційної сфери. Проблема діагностики різних аспектів психічного стану недостатньо розроблена і є досить актуальною. Це важливо, перш за все, для забезпечення ефективної адаптації молодих кваліфікованих спортсменів до постійних змін умов тренувального і змагального процесів.

Психоемоційне напруження, стрес (як загальний адаптаційний синдром) – це невід'ємна частина повсякденного життя особистості кваліфікованого спортсмена, що вимагає відповідної психологічної готовності до успішної спортивної діяльності, що у свою чергу і є предметом відповідних міждисциплінарних досліджень у руслі збереження й підвищення результативності змагальної діяльності, фізичного і психічного здоров'я, профілактики розвитку емоційного вигорання [8, 20, 21, 25]. Вельми важливим є його стимулюючий ефект, коли стресові впливи не перевищують пристосувальні можливості спортсмена [6]. В умовах психоемоційного напруження відбувається мобілізація внутрішніх адаптаційних резервів, захисних сил, розкриваються додаткові можливості, активізуються психічні процеси [17, 23]. За рахунок цього (до певної межі) у більшості спортсменів підвищується ефективність діяльності [23]. Динаміка стресу обумовлена як властивостями нервової системи, так і особистісними індивідуально-типологічними характеристиками спортсмена [3, 5, 21].

Спортивна діяльність вимагає високого рівня психічної готовності, що доведено фахівцями з різних видів спорту [5, 7, 19, 25]. Відомо, що спортсмени з більш високою майстерністю піддаються впливу негативних факторів меншою мірою [2, 21]. Зазначимо, що факторами, які зменшують стресогенність середовища і її негативний вплив на організм людини, є передбачуваність зовнішніх подій, можливість заздалегідь підготуватися до них, контроль над подіями. Значну роль у подоланні негативного впливу стрес-факторів грають вольові якості особистості, а також особливості темпераменту і характеру, функціональної асиметрії півкуль головного мозку, співвідношення першої і другої сигнальних систем [8, 20, 21]. Важливим напрямком оптимізації психічної саморегуляції може бути підвищення впевненості в собі, формування навичок самодіагностики і контролю поведінки в стресових ситуаціях, оволодіння певними антистресовими технологіями [17, 23, 24].

Проблема адаптації до напружених фізичних навантажень із різним характером енергозабезпечення зале-

жно від індивідуальних особливостей спортсменів, як відомо, є однією з найактуальніших проблем біології і медицини, психології і фізіології спорту [3, 7, 19, 25]. Формування довготермінової адаптації організму спортсмена до фізичних навантажень різної спрямованості веде до підвищення ефективності спортивної діяльності. Для досягнення специфічної фізіологічної адаптації, характерної для різних типів тренувальних навантажень у різних видах спорту, тренувальна програма повинна забезпечити навантаження саме тих фізіологічних систем, які мають вирішальне значення для досягнення оптимальних спортивних результатів [19]. Для оцінювання функціонального стану нервово-м'язового апарату спортсменів перспективним є застосування електронейроміографічного (ЕНМГ) дослідження з визначенням параметрів Н-рефлексу, що представляє собою моносинаптичну рефлекторну відповідь, яка відводиться від м'яза в умовах електричної стимуляції її низькопорогових чутливих волокон, що входять до складу зм'ятого нерва [1, 10, 11]. Одним із методів прогнозування надійності та успішності спортивної діяльності є моніторинг психофізіологічного та психоемоційного станів спортсменів у взаємозв'язку з їх індивідуально-типологічними характеристиками [5, 7, 18, 22, 25]. Можна зробити цілком логічне припущення, що психофізіологічні характеристики, загальний психічний стан, психічні властивості особистості можуть позначатися на зміні функціонального стану нервово-м'язового апарату кваліфікованих спортсменів за умов психоемоційного напруження.

Мета роботи полягала в тому, щоб визначити – чи взаємопов'язаний функціональний стан нервово-м'язового апарату кваліфікованих спортсменів-тенісистів (за ЕНМГ-показниками) із психологічними характеристиками за методикою вибору кольорів М. Люшера, які визначають актуальний стан спортсменів на момент обстеження.

Об'єкт і методи досліджень. У проведеному дослідженні брали участь 31 кваліфікований спортсмен-тенісист у віці 11-17 років обох статей. Електронейроміографічні дослідження проводили на нейродіагностичному комплексі "Nicolet Viking Select". Використовували методику визначення швидкості проведення нервового імпульсу (ШПІ) по рухових волокнах різних нервів верхніх та нижніх кінцівок [1, 10, 11].

При дослідженні верхніх кінцівок тестований спортсмен перебував в положенні сидіння, руки вільно розташовувалися на кушетці. Проводили електричну стимуляцію середнього нерва (п. medianus) в області зап'ястя і ліктьового суглоба з реєстрацією М-відповіді

(прямої відповіді м'яза на роздратування моторних волокон нерва) від м'яза, що приводить до руху великий палець (m. abductor pollicis brevis).

При дослідженні нижніх кінцівок спортсмен перебував у положенні лежачи на животі, стопи вільно звисали з кушетки. При визначенні швидкості проведення нервового імпульсу по моторних волокнах великогомілкового нерва (n. tibialis) проводили його стимуляцію в підколінній ямці і області позаду від медіального надвиростка та реєстрували М-відповіді від м'яза короткого згинача пальців (m. flexor hallucis brevis). Для реєстрації електроміографічних сигналів використовували пару стандартних поверхневих електродів із міжелектродною відстанню 20 мм.

Аналізували такі ЕНМГ-параметри: значення швидкостей проведення імпульсу (ШПІ) по моторних волокнах великогомілкового і серединного нервів. Аналізували показники для правої і лівої кінцівок.

Для оцінювання наявного психічного стану спортсменів (а саме – рівня існуючого стресу), емоційної стійкості та ефективності психічної саморегуляції й адаптивності застосовано тест вибору кольорів М. Люшера [16, 26]. Показник рівня існуючого стресу (РС) в межах 0–4 бали характеризував низький РС, 5–8 балів – середній і 9–12 балів – високий рівень стресу. Інтегративний показник емоційної стійкості по тесту також обчислювався в балах: 3 бали присвоювалися спортсмену, якщо він емоційно стійкий, 2 бали – у разі недостатності емоційної стійкості та 1 бал – при появі тривоги, ознак емоційної нестійкості. Методика крім того дозволяє діагностувати рівень гармонійності і внутрішньої оптимальності нервово-психічного стану спортсменів за коефіцієнтом Вальнефера (КВ). За значеннями КВ контингент обстежуваних розділено на осіб із високим рівнем саморегуляції та адаптивності (КВ дорівнює 1–10 у.о.), із середнім рівнем саморегуляції та адаптивності (КВ дорівнює 11–20 у.о.), із ознаками перевтоми і зниженням рівня саморегуляції та адаптивності (КВ більше 20 у.о.).

Тест Люшера також дозволив побічно судити про симпатичне або парасимпатичне домінування активності у вегетативній нервовій системі обстежуваних. Для цієї мети використано коефіцієнт вегетативного балансу Шипоша (КШ). Відомо, що значення КШ >1 відповідає ерготропному домінуванню (симпатотонія), КШ <1 – трофотропному домінуванню (ваготонія), а КШ =1 трактується як вегетативна рівновага [16, 17].

При комплексних біологічних дослідженнях за участю спортсменів відповідно до принципів біоетики дотримувалися розробленої в лабораторії теорії і методики спортивної підготовки і резервних можливостей спортсменів НДІ НУФВСУ "Програми комплексного біологічного дослідження особливостей функціональних можливостей спортсменів", а також законодавства України про охорону здоров'я та Гельсінської декларації 2000 р., директиви Європейського товариства 86/609 щодо участі людей у медико-біологічних дослідженнях [18].

Робота виконана відповідно до держбюджетної науково-дослідної теми "Технологія прогнозування емоційного стресу в умовах напруженої діяльності" (№ держреєстрації 0117U002385) Міністерства освіти й науки України.

Статистична обробка даних проводилася з використанням методів непараметричної математичної статистики за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0. Тест Спірмена застосовували для дослідження кореляційних зв'язків.

Результати та їх обговорення. Кореляційний аналіз показав наявність статистично значущої позитивної кореляції між коефіцієнтом вегетативного балансу (за тестом М. Люшера) і швидкістю проведення нервового імпульсу по рухових волокнах великогомілкового (n. tibialis) нерва правої нижньої кінцівки і серединного (n. medianus) нерва правої верхньої кінцівки (таблиця). Тобто симпатичне домінування у функціонуванні вегетативної нервової системи (за тестом М. Люшера) пов'язано з більшою швидкістю проведення нервового імпульсу.

Таблиця. Кореляційні зв'язки психологічних характеристик спортсменів, коефіцієнта вегетативного балансу за тестом М. Люшера з електронейроміографічними показниками, r_s

Кореляційні зв'язки, r_s	Коефіцієнт вегетативного балансу Шипоша	Показник рівня стресу	Коефіцієнт Вальнефера	Показник емоційної стійкості
Швидкість проведення нервового імпульсу по великогомілковому нерву (права сторона)	0,26*	-0,57*	-0,49**	–
Швидкість проведення нервового імпульсу по великогомілковому нерву (ліва сторона)	–	-0,42*	-0,43*	0,43**
Швидкість проведення нервового імпульсу по серединному нерву (права сторона)	0,30*	–	–	–

Примітки. * – статистична значущість коефіцієнта кореляції $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Отримані результати підтверджують відомі літературні дані, отримані з використанням методики вибору кольорів М. Люшера [4, 27]. Як відомо, особам із переважним збудженням симпатичної нервової системи властива активація діяльності, спрямованість на витрачання сил і енерговитрати [4]. Для осіб із переважним збудженням парасимпатичної нервової системи є характерним формування стану підвищеного енергодефіциту, необхідність відновлення, накопичення енергетичних запасів, збільшення потреби у відпочинку [4]. Крім того, за даними літератури ваготоніки при емоційному стресі більш схильні до депресії. Превалювання парасимпатичної регуляції може погіршувати адаптивні можливості організму [5, 9], що підтверджується і результатами аналізу особливостей варіабельності серцевого ритму [12].

У свою чергу ШПІ залежить від температури в зоні нервового стовбура, стану периферичного кровообігу в кінцівці, а також від кислотно-лужної рівноваги та електrolітного обміну у тканинах, що оточують нерв [1]. Можна припустити, що взаємозв'язок вегетативного балансу (за тестом М. Люшера) і швидкості проведення нервового імпульсу обумовлена певним функціональним станом серцево-судинної системи (зокрема, кровопостачанням тканин кінцівки, що оточують нерв), який є індивідуальним для кожного спортсмена в певний період спортивної підготовки.

Крім того, виявлено статистично значущі негативні кореляції між психологічними показниками за тестом М. Люшера (а саме: показником рівня стресу, а також коефіцієнтом Вальнефера) і значеннями швидкостей

проведення нервового імпульсу по великогомілковому нерву з обох сторін тіла. Виявлена також позитивна кореляція між швидкостями проведення нервового імпульсу по великогомілковому нерву з лівої сторони тіла і показником емоційної стійкості за тестом М. Люшера. Отже, вищий швидкості проведення нервового імпульсу відповідали: нижчий рівень стресу, більш високий рівень ефективності психічної саморегуляції і адаптивності, вищий рівень емоційної стійкості. Зазначимо, що отримані дані дещо відрізняються від результатів попереднього дослідження групи спортсменів більш старшого віку (15–30 років), які спеціалізувалися в іншому виді спорту – стрибках у воду, з урахуванням швидкості проведення нервового імпульсу по рухових волокнах ліктьового нерва (n. ulnaris) [22], що можливо пов'язано з віковими особливостями розвитку спортсменів, із різним рівнем адаптації до довготривалих фізичних навантажень, або ж саме з типом фізичного навантаження.

У літературних даних представлено нормальні величини ШПІ по різних нервах кінцівок у груп людей різного віку [1, 13]. Як відомо, значення швидкостей проведення нервового імпульсу, з одного боку, обумовлені генетично, а з іншого, можуть збільшуватися у процесі успішної адаптації до тривалого фізичного навантаження. З іншого боку, за результатами наших попередніх досліджень, швидкості проведення нервового імпульсу по моторних волокнах великогомілкового і серединного нервів (n. tibialis і n. medianus) можуть змінюватися у процесі адаптації до тривалого фізичного навантаження певного типу [11, 12].

Таким чином, аналіз отриманих результатів дає можливість підсумовувати таке: швидкість проведення нервового імпульсу взаємопов'язана із психологічними характеристиками обстежених спортсменів за тестом М. Люшера, а саме: із показниками рівня існуючого стресу, емоційної стійкості та ефективності психічної саморегуляції й адаптивності. Отже, можна зробити припущення, що вказані вище показники можуть служити специфічними психологічними маркерами змін функціонального стану нервово-м'язового апарату молодих кваліфікованих спортсменів-тенісистів. Виявлена позитивна кореляція між коефіцієнтом вегетативного балансу, що визначався за допомогою тесту М. Люшера, і швидкістю проведення нервового імпульсу по рухових волокнах великогомілкового (n. tibialis) і серединного (n. medianus) нервів, що може бути пов'язано з функціональним станом серцево-судинної системи спортсменів у певний період спортивної підготовки. Безумовно, останнє припущення потребує подальших досліджень із використанням фізіологічних методів аналізу функціонального стану за вегетативними показниками (зокрема, методів варіаційної пульсометрії, ЕКГ, біохімічних та інших, які мають широке застосування у спортивній медицині).

Висновки. Виявлено взаємозв'язок електронейроміографічних та психологічних характеристик у спортсменів-тенісистів: вищий швидкості проведення нервового імпульсу відповідали нижчий рівень стресу, вищий рівень ефективності психічної саморегуляції й адаптивності, вищий рівень емоційної стійкості (за тестом М. Люшера). Виявлена позитивна кореляція між коефіцієнтом вегетативного балансу, що визначався за допомогою тесту М. Люшера, і швидкістю проведення нервового імпульсу по рухових волокнах великогомілкового (n. tibialis) і серединного (n. medianus) нервів, що може бути пов'язано з функціональним станом серцево-судинної системи спортсменів у певний період спортивної підготовки. Симпатичне домінування у функціонуванні вегетативної нервової системи (за тестом

М. Люшера) пов'язано з більшою швидкістю проведення нервового імпульсу. Виявлені взаємозв'язки показників вегетативного балансу (за тестом М. Люшера) та психічного стану (за тестом М. Люшера) із параметрами функціонального стану нервово-м'язового апарату (за електронейроміографічними показниками) можуть використовуватися для професійного відбору і корекції тренувального процесу юних спортсменів.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку. Цікавим є подальше дослідження із проведенням порівняльного аналізу психологічних і електронейроміографічних показників у спортсменів, що спеціалізуються в різних видах спорту, нервово-м'язовий апарат яких у процесі професійної діяльності відчуває навантаження різних типів.

Список використаних джерел:

1. Бадалян Л. О. Клиническая электромиография / Л. О. Бадалян, И. А. Скворцов. – М.: Медицина, 1986.
2. Бейгул І. О. Вплив екстремальних умов діяльності дзюдоїстів на розвиток стресу / І. О. Бейгул // Фізичне виховання, спорт і культура здоров'я у сучасному суспільстві. – 2014. – Вип.3. – С. 109–112.
3. Вейнберг Р. С. Психологія спорту / Р. С. Вейнберг, Д. Гоулд. – К.: Олімп. л-ра, 2014.
4. Воронова В. Психологическое обеспечение подготовки спортсменов в футболе / В. Воронова // Наука в олимпийском спорте. – 2013. – Вип. 4. – С. 32–39. Режим доступу: <http://bmsi.ru/doc/c3d773b6-8039-4ed1-8038-7704b0ffc7fd>
5. Воронова В. І. Психологія спорту: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. / В. Воронова. – К.: Олімп. л-ра, 2007.
6. Грановская Р. М. Элементы практической психологии / Р. М. Грановская. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1984.
7. Ильин Е. П. Дифференциальная психофизиология / Е. П. Ильин. – СПб.: Питер, 2001.
8. Ісичук О. Стрес як загальний адаптаційний синдром та навчальна діяльність студентів / О. Ісичук, В. Романюк // Актуальні питання психологічної науки: альманах студентського наукового товариства. – 2016. – Вип. 10. – С. 36–39.
9. Китаев-Смык Л. А. Психология стресса. Психологическая антропология стресса / Л. А. Китаев-Смык. – М.: Академический проект, 2009.
10. Колосова Е. В. Сравнение электронейромиографических показателей у спортсменов, специализирующихся в прыжках в воду и велоспорте / Е. В. Колосова, Т. А. Халаяк, З. А. Горенко // Фізична культура, спорт та здоров'я нації. – 2017. – Вип. 3(22). Режим доступу: <https://scholar.google.com.ua/citations?user=Ug1Z49wAAAAJ&hl=ru>
11. Колосова Е. В. Электронейромиографическая характеристика спортсменов-теннисистов различных возрастных групп / Е. В. Колосова, Т. А. Халаяк // Актуальні проблеми медико-біологічного забезпечення фізичної культури, спорту та фізичної реабілітації: II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., Україна (Харків), 2016. – Х., 2016.
12. Колосова Е. В. Взаимосвязь профессиональной деятельности спортсменов и скорости проведения нервного импульса: биатлон и пулевая стрельба / Е. В. Колосова, Т. А. Халаяк // Олимпийский спорт и спорт для всех: сб. материалов XXVIII Междунар. науч. конгресса, Казахстан (Алматы), 2014. – Алматы, 2014.
13. Команцев В. Н. Методические основы клинической электронейромиографии. Руководство для врачей / В. Н. Команцев. – СПб., 2006.
14. Лисенко О. М. Фізична працездатність кваліфікованих спортсменів та особливості вегетативної регуляції серцевого ритму / О. М. Лисенко // Міжнар. медико-філософський журн. "Інтегративна антропологія" Одеського нац. мед. ун-ту. – 2014. – № 2 (24). – С. 48–54. Режим доступу: <http://www.irbis-nbuv.gov.ua>
15. Лисенко О. М. Оцінка функціонального стану нервово-м'язової системи за допомогою методу стимуляційної електроміографії / О. М. Лисенко, О. В. Колосова, Т. О. Халаяк // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 3 (додаток). – С. 169–170. Режим доступу: <http://repo.knmu.edu.ua/>
16. Люшер М. Цветовой тест Люшера / М. Люшер. – СПб.: Сова; М.: Эксмо-Пресс, 2002. – 192 с.
17. Макаруч М. Ю. Адаптація осіб різної статі до діяльності з високим рівнем відповідальності за результат / М. Ю. Макаруч, Л. В. Чікіна, П. І. Янчук та ін. // Вісн. Черкаського ун-ту (серія Біологічні науки). – 2010. – Вип. 180. – С. 50–58.
18. Медико-біологічне забезпечення підготовки спортсменів збірних команд України з олімпійських видів спорту / О. А. Шинкарук, О. М. Лисенко, Л. М. Гуніна та ін.; за заг. ред. О. А. Шинкарук. – К., 2009.
19. Платонов В. Н. Система подготовки спортсменов в олимпийском спорте. Общая теория и ее практические приложения: учебник для тренеров: в 2 кн. – Кн. 1. – К.: Олимп. лит. – 2015.
20. Романюк В. Л. Стрес-стійкість як компонент психічного здоров'я людини / В. Л. Романюк // Nowoczesne badania podstawowe i stosowane: Konferencja Międzynarodowej Naukowo-Praktycznej, 30–31.07.2016, Warszawa // Zbiór artykułów naukowych. – Warszawa, 2016.

21. Индивидуально-психологические характеристики учащейся молодежи, занимающейся разными видами спорта / С. В. Тукаев, Е. Н. Долгова, Т. В. Вашека и др. // Спортивная медицина и физическая реабилитация. – 2017. – № 1. – С. 64–71. Print ISSN: 1992-7894; Online ISSN: 1992-9285.

22. Влияние психоэмоционального напряжения на функциональное состояние нервно-мышечного аппарата и эффективность сенсомоторной деятельности высококвалифицированных спортсменов / С. В. Федорчук, Е. Н. Лысенко, Е. В. Колосова // Слобожанський наук.-спорт. вісн. – 2017. – Т. 60, № 4. – С. 109–116. ISSN (Ukrainian ed. Print) 1991-0177; ISSN (Ukrainian ed. Online) 1999-818X; DOI: <http://dx.doi.org/10.15391/sns.v.2017.4.019>

23. Хекалов Е. М. Неблагоприятные психические состояния спортсменов, их диагностика и регуляция: учеб. пособие / Е. М. Хекалов. – М.: Советский спорт. – 2003.

24. Вплив уявної ротації об'єктів на стан психофізіологічних функцій жінок / Л. В. Чікіна, С. В. Федорчук, В. А. Трушина та ін. // Фізіологічний журнал. – 2012. – Т. 58., № 5. – С. 36–43. Режим доступу: <http://www.irbis-nbuv.gov.ua>

25. Шинкарук О. Стрес та його вплив на змагальну та тренувальну діяльність спортсменів / О. Шинкарук, О. Лисенко, С. Федорчук // Фізична культура, спорт та здоров'я нації. – 2017. – Вип. 3 (22). Режим доступу: <http://93.183.203.244:8080/xmlui/handle/123456789/646>

26. Щербатых Ю. В. Насколько метод цветовой выборки Люшера измеряет вегетативный компонент тревоги? / Ю. В. Щербатых // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2003. – Т. 5, № 1–2. – С. 108–113.

27. Яковлев Б. П. Мотивация и эмоции в спортивной деятельности: учеб. пособие / Б. П. Яковлев. – М.: Советский спорт. – 2014.

References:

1. Badalyan L., Skvortsov I. Klinicheskaya elektromiografiya [Clinical electromyography]. M.: Meditsina; 1986. In Russian.
2. Beyhul I. Vplyv ekstremal'nykh umov diyal'nosti dzyudoyistiv na rozvytok stressu [Influence of extreme conditions of activity of judoists on the development of stress]. Fizychnye vykhovannya, sport i kul'tura zdorov'ya u suchasnomu suspil'stvi – Physical education, sport and health culture in modern society. 2014; 3: 109-112. In Ukrainian.
3. Veynberh R., Hould D. Psykhoholiya sportu [Sports Psychology]. K.: Olimp. I-ra; 2014. Ukrainian.
4. Voronova V. Psikhologicheskoye obespecheniye podgotovki sportsmenov v futbol [Psychological support of training athletes in football] Nauka v olimpiyskom sporte [Science in the Olympic sport]. 2013; Vip. 4: 32-39. In Russian.
5. Voronova V. Psykhoholiya sportu: navch. posib. dlya stud. vyshch. navch. zakl. [Sport Psychology: teach. guidances. for students. HI. teach. bookmark.]. K.: Olimp. I-ra; 2007. In Ukrainian.
6. Granovskaya R. Elementy prakticheskoy psikhologii [Elements of practical psychologists]. Leningrad: Izdatel'stvo LGU; 1984. In Russian.
7. Ilyin Y. Dyfferentsyal'naya psikhofyziologhiya [Differential psychophysiology]. SPb.: Pyter; 2001. In Russian.
8. Ischuk O., Romanyuk V. Stres yak zahal'nyy adaptatsiynyy syndrom ta navchal'na diyal'nist' studentiv [Stress as a general adaptive syndrome and educational activity of students]. Aktual'ni pytannya psikhoholichnoyi nauky: Al'manakh students'koho naukovo-ho tovarystva – Topical issues of psychological science: Almanac of student scientific society, Rivne: RDHU. 2016; 10: 36-39. In Ukrainian.
9. Kitayev-Smyk L. Psikhologiya stressa. Psikhologicheskaya antropologiya stressa [Psychology of stress. Psychological anthropology of stress]. Moscow: Akademicheskii proyekt; 2009. In Russian.
10. Kolosova Y., Khalyavka T., Gorenko Z. Sravneniye elektroneyromyograficheskikh pokazateley u sportsmenov, spetsializiruyushchikhsya v pryzhkhakh v vodu i velosporte [Comparison of electroneuromyographic indices in sportsmen specializing in diving and cycling]. Fizichna kul'tura, sport ta zdorov'ya natsii: zbirnik naukovikh prats' – Physical culture, sports and health of the nation: a collection of scientific works; 2017. 3(22). In Russian.
11. Kolosova Y., Khalyavka T. Elektroneyromyograficheskaya kharakteristika sportsmenov-tennistov razlichnykh vozrastnykh grupp [Electroneuromyographic characteristics of tennis players of different age groups]. Aktual'ni problemi mediko-biologichnogo zabezpechennya fizichnoi kul'turi, sportu ta fizichnoi reabilitatsii: II Mizhnarodna naukovo-praktichna internet-konferentsiya, Ukraina (Kharkiv) – Actual problems of medical and biologic support of physical culture, sports and phizic reabilities: II International scientific and practical conference, Ukraina (Kharkiv); 2016. In Russian.
12. Kolosova Y., Khalyavka T. Vzaimosvyaz' professional'noy deyatel'nosti sportsmenov i skorosti provedeniya nervnogo impuls'a: biatlon i pulevaya strel'ba [Interrelation of professional activity of sportsmen and speed of carrying out of a nervous impulse: biathlon and shooting shooting]. Olimpiyskiy sport i sport dlya vsekh: Sbornik materialov KHKHVIII Mezhdunarodnogo nauchnogo kongressa, Kazakhstan (Almaty) – Olympic Sport

and Sport for All: Collection of materials of the XXVIII International Scientific Congress, Kazakhstan (Almaty); 2014. In Russian.

13. Komantsev V. Metodicheskoye osnovy klinicheskoy elektroneyromiografii. Rukovodstvo dlya vrachev [Methodical bases of clinical electroneuromyography. Manual for doctors]. Sankt-Peterburg; 2006. In Russian.

14. Lysenko O. Fizychna pratsezdatsnist' kvalifikovanykh sportsmeniv ta osoblyvosti vehetativnoyi rehulyatsiyi sertsevoho rytmu [Physical fitness of qualified athletes and features of autonomic regulation of cardiac rhythm]. Mizhnarodnyy medyko-filosofskyy zhurnal "Intehratiyvna antropolihiya" Odes'koho natsional'noho medychnoho universytetu – International Medical and Philosophical Journal "Integrative Anthropology" of Odessa National Medical University. 2014; 2(24): 48-54. In Ukrainian.

15. Lysenko O., Kolosova O., Khalyavka T. Otsinka funktsional'noho stanu nervovo-m'язovoyi systemy za dopomohoyu metodu stymulyatsiynoyi elektromiografii [Assessment of the functional state of the neuromuscular system by means of stimulation electromyography]. Fiziologichnyy zhurnal – Physiological Journal. 2014; 60(3). (Annex): 169-170. In Ukrainian.

16. Lyusher M. Tsvetovoy test Lyushera [Lusher's color test]. SPb.: Sova; M.: EKSMO-Press; 2002. In Russian.

17. Makarchuk M., Chikina L., Yanchuk P., Fedorchuk S., Trushina V. Adaptatsiya osib riznoyi stati do diyal'nosti z vysokym rivnem vidpovidal'nosti za rezul'tat [Adapting people of different sex to activities with a high level of responsibility for the result]. Visnyk Cherkas'koho universytetu (seriya: Biologichni nauky) – Bulletin of the Cherkasy University (series: Biological sciences). 2010; 180: 50-58. In Ukrainian.

18. Shynkaruk O., Lysenko O., Hunina L., Karlenko V., Zemtsova I., Olishchevskiy S. et al. Medyko-biologichne zabezpechennya pidhotovky sportsmeniv zbirnykh komand Ukrainy z olimpiys'kykh vydiv sportu [Medico-biological support of training of athletes of national teams of Ukraine on Olympic sports]. O.A. Shynkaruk (Ed.). Kyiv: Olimpiyska literature; 2009. In Ukrainian.

19. Platonov V. Sistema podgotovki sportsmenov v olimpiyskom sporte. Obshchaya teoriya i yeye prakticheskiye prilozheniya: uchebnyk [dlya trenerov]: v 2 kn. [The system of training athletes in the Olympic sport. General theory and its practical applications: a textbook [for trainers]: in 2 books]. K.: Olimp. Lit. Book 1; 2015. In Russian.

20. Romanyuk V. Stres-stykyist' yak komponent psikhichnoho zdorov'ya lyudyny [Stress-sustainability as a component of human mental health]. Modern basic and applied research '16: Konferentsiya Miedzynarodowej Naukowo-Praktycznej (30-31.07.2016) – International Conference on Science and Practice (30-31.07.2016). Zbior artykulow naukowych, Warszawa: Wydawca: Sp. z o.o. "Diamond trading tour" – Collection of scientific articles, Warsaw: Publisher: Sp. with o.o. "Diamond trading tour"; 2016. In Ukrainian.

21. Tukaiev S., Dolgova Y., Vasheka T., Fedorchuk S., Lysenko Y., Kolosova Y. et al. Individual'no-psikhologicheskyye kharakteristiki uchashcheysya molodezhi, zanimayushcheysya raznymi vidami sporta [Individual and psychological characteristics of students studying different sports]. Sportivna meditsina i fizichna reabilitatsiya – Sports medicine and physical rehabilitation. 2017; 1: 64-71. In Russian.

22. Fedorchuk S., Lysenko Ye., Kolosova Ye., Khalyavka T., Romanyuk V. Vliyaniye psikhoeemotsional'nogo napryazheniya na funktsional'noye sostoyaniye nervno-myshechnogo aparata i effektivnost' sensomotornoy deyatel'nosti vysokokvalifitsirovannykh sportsmenov [Influence of psychoemotional stress on the functional state of the neuromuscular device and the effectiveness of sensorimotor activity of highly skilled athletes]. Slobozhans'kiy naukovo-sportivnyi visnik – Slobozhansky Science and Sports Bulletin. 2017; 4(60). 109-116. In Russian.

23. Khekalov Y. Neblagopriyatnyye psikhicheskiye sostoyaniya sportsmenov, ikh diagnostika i regulyatsiya [Unfavorable mental states of athletes, their diagnostics and regulation]. (2d ed.). Moscow: Sovetskiy sport; 2003. In Russian.

24. Chikina L., Fedorchuk S., Trushyna V., Yanchuk P., Makarchuk MYU. Vplyv uyavnoyi rotatsiyi ob'ektiv na stan psikhofiziologichnykh funktsiy zhynok [Influence of imaginary rotation of objects on the state of psychophysiological functions of women]. Fiziologichnyy zhurnal – Physiological Journal. 2012; 58(5): 36-43. In Ukrainian.

25. Shynkaruk O., Lysenko O., Fedorchuk S.. Stres ta yoho vplyv na zmahal'nu ta trenuv'nu diyal'nist' sportsmeniv [Stress and its influence on the competitive and training activities of athletes]. Fizychna kul'tura, sport ta zdorov'ya natsiyi: zbirnyk naukovykh prats'. – Physical Culture, Sport and Health of the Nation: a collection of scientific works; 2017. 3(22).. InUkrainian.

26. Shcherbatykh YuV. Naskol'ko metod tsvetovykh vyborov Lyushera izmeryayet vegetativnyy komponent trevogi? [How much does Lusher's color selection method measure the vegetative component of anxiety?]. Prikladnyye informatsionnyye aspekty meditsiny – Applied information aspects of medicine. 2003; 5(1-2): 108-113. In Russian.

27. Yakovlev B. Motivatsiya i emotsii v sportivnoy deyatel'nosti: uchebnoye posobiye. [Motivation and emotions in sports: a textbook.]. Moscow: Sovetskiy sport; 2014. In Russian.

Надійшла до редколегії 09.11.17

Т. Халаявка, канд. хим. наук, О. Колосова, мл. научн. сотр., С. Федорчук, канд. биол. наук
Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев, Украина

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПСИХИЧЕСКОЙ САМОРЕГУЛЯЦИИ, ЭМОЦИОНАЛЬНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ И СТРЕСС-УЯЗВИМОСТЬ СПОРТСМЕНОВ-ТЕННИСИСТОВ ПО МЕТОДИКЕ ВЫБОРА ЦВЕТОВ В СВЯЗИ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО АППАРАТА

Выявлена взаимосвязь электромиографических и психологических характеристик у спортсменов-теннисистов: более высокой скорости проведения нервного импульса соответствовали более низкий уровень стресса, более высокий уровень эффективности психической саморегуляции и адаптивности, более высокий уровень эмоциональной устойчивости. Установлена статистически значимая положительная корреляция между коэффициентом вегетативного баланса по тесту М. Люшера и скоростью проведения нервного импульса по моторным волокнам срединного нерва верхней конечности, что может быть обусловлено функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы. Полученные результаты могут быть использованы для коррекции тренировочного процесса молодых спортсменов-теннисистов.

Ключевые слова: электромиография, скорость проведения нервного импульса, уровень стресса, психическая саморегуляция, адаптивность, эмоциональная устойчивость, спортсмены, теннис.

T. Khalyavka, PhD, E. Kolosova, junior researcher., S. Fedorchuk, PhD
National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv, Ukraine

EFFICIENCY OF PSYCHIC SELF-REGULATION, EMOTIONAL STABILITY AND STRESS-VULNERABILITY OF ATHLETES-TENNIS PLAYERS BY THE METHOD OF CHOOSING COLORS IN CONNECTION WITH THE FUNCTIONAL STATE OF THE NEUROMUSCULAR APPARATUS

The relationship among electromyographic and psychological indices in athletes performing in tennis was found. Higher motor nerve conduction velocity response corresponded to a lower level of stress, a higher level of effectiveness of mental self-regulation and adaptability, a higher level of emotional stability. Statistically significant positive correlation between autonomic nervous system balance coefficient (by M. Lusher's test) and median motor nerve conduction velocity was revealed. This might be due to functional state of cardiovascular system. The obtained results can be used to correct the training process of young athletes.

Key words: stimulation electromyography, motor nerve conduction velocity, stress level, psychic self-regulation, adaptability, emotional stability, athletes, tennis.

UDC 577.125.8:576.7

D. Shelest, PhD stud., O. Pavliuk, stud., O. Kolotiy, stud., L. Garmanchuk, DSc
ESC "Institute of Biology and Medicine" Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT OF PHOTSENSITIVE PEPTIDOMIMETICS ON THE CONTENT OF PRODUCTS OF LIPID PERCEPTION OXIDATION IN CELL CULTURE

The purpose of the study was to evaluate the possibility of photosensitive peptidomimetics influencing the processes of lipid peroxidation in the culture of cells. The results have shown that the cells that were cultured with the addition of an open and closed form of peptidomimetics GS-DProSw to the predominant changes in the level of the formation of malonic dialdehyde were not observed.

Key words: peroxidation of lipid oxidation, peptidomimetik, lymphoblastoma.

Introduction. Increased formation of active forms of oxygen, increase of the level of products of free radical lipid peroxidation and decrease in the activity of antioxidant systems is observed in the pathogenesis of many diseases, in particular during the development of malignant neoplasms [1].

It is known that free radicals are one of the carcinogenic factors. They are present at all stages of the development of the tumor and have high reactivity and can cause damage to the lipid bilayer of cell membranes and directly to DNA molecules [1, 2].

Lipoperoxides are quite unstable, and are subjected to further oxidative degeneration. In this case, accumulate secondary oxidation products, the most important of which are malonic dialdehyde (MDA) [3].

Accumulation of lipid peroxidation (LPO) products in the body and the development of endotoxemia leads to stimulation of the monooxygenase system, changes in lipid, hormonal, immune, micronutrient, neurotransmitter status, number of binding sites and affinity of receptors to ligands, and depletion of the antioxidant system [4]. Previously, we showed a significant difference in the action of photosensitive peptidomimetics on tumor cell models in vitro in vivo [5]. However, in contrast to the traditional photo of dynamic therapy with irradiation in a narrow range of wavelengths, a photo-sensitive peptidomimetic is activated by visible light, so it is likely that the launch of cell death occurs without the formation of active forms of oxygen. To check this hypothesis, it was important to evaluate lipid peroxidation. Therefore, the purpose of our work was to determine the effect of photosensitive peptidomimetik (FPM or PM) on the content

of lipid peroxidation products in the mouse lymphoblast cell line L1210. The tasks of the work were:

- Determine how the closed and open form of FPM affects the level of TBA-active products.
- Determine how the level of diene, triene conjugates and Schiff bases changes under the action of test substances.
- Determine the effect of FPM on the number of cells in a proliferative pool.

Materials and methods. The study used cell lines L1210 (suspension, mouse lymphoblastoma, lymphocytic lymphoma) cultured under standard conditions in an incubator at 37°C, 5 % CO₂, DMEM medium. The number of cells counted in the hemocytometer. The protein level was determined using a set of reagents of the "File-Diagnostics" Ltd. The content of schiff bases, diene conjugates, trienic conjugates of unsaturated fatty acids of neutral lipids and phospholipids was determined according to standard techniques on a spectrophotometer at $\lambda = 400, 232, 278, 220$ nm, respectively [6]. The neutral lipids and phospholipids was separate by heptane and isopropyl fraction. The content of TBA-active products (MDA) was determined on a spectrophotometer at $\lambda = 532$ nm [7]. The antiproliferative effect was determined by flow cytometry. Experimental data was processed according to generally accepted statistical methods.

Results and discussion. We obtained the following results for the action of the open and closed forms of peptidomimetics: there are statistically insignificant fluctuations

of the average value of the content of diene conjugates has not changed with respect to control in both phases and states of FPM (Fig. 1); the same thing was observed in the determination of trienic conjugates (Fig. 2); the content of TBA-active products in cells relative to control (Fig. 3); In

the investigation of the content of Schiff bases, a statistical difference was observed only in the phospholipid phase with an open form of PM, in the neutral (open and closed forms of PM) and the closed form in the phospholipid phases have statistically insignificant changes (Fig. 4).

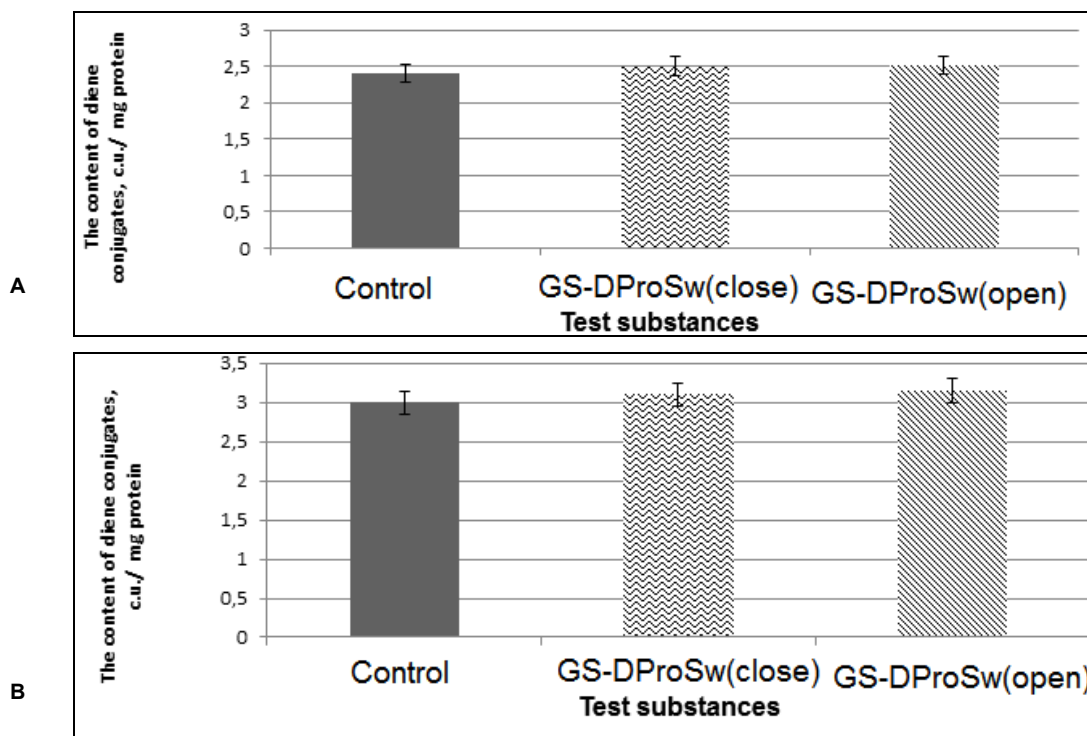


Fig. 1. The content of diene conjugates in the fraction of neutral lipids (A) and phospholipids (B) of mouse lymphoblast cells of L1210 by the action of the test substances ($M \pm m$, $n = 5$)

* – $p < 0,05$ in comparison with control.

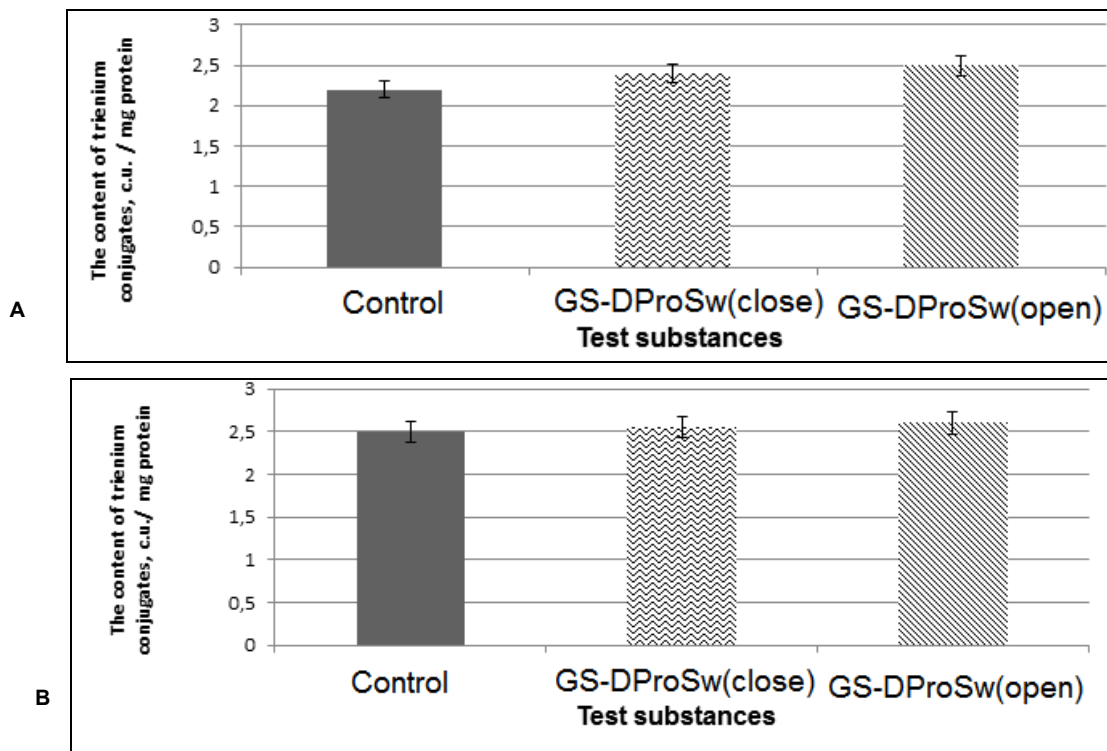


Fig. 2. The content of trienic conjugates in the fraction of neutral lipids (A) and phospholipids (B) of mouse lymphoblast cells of L1210 by the action of the test substances ($M \pm m$, $n = 5$)

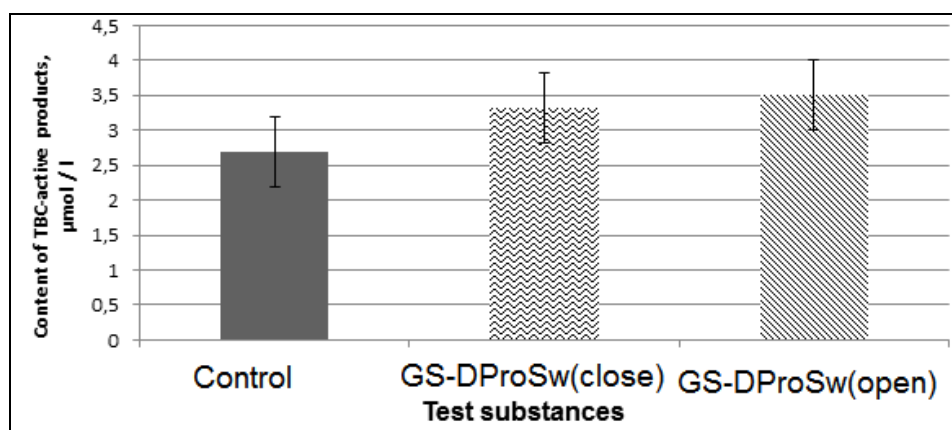


Fig. 3. Content of TBA-active products (malonic dialdehyde) in mouse lymphoblast cells of L1210 by the action of experimental substances ($M \pm m$, $n = 5$)

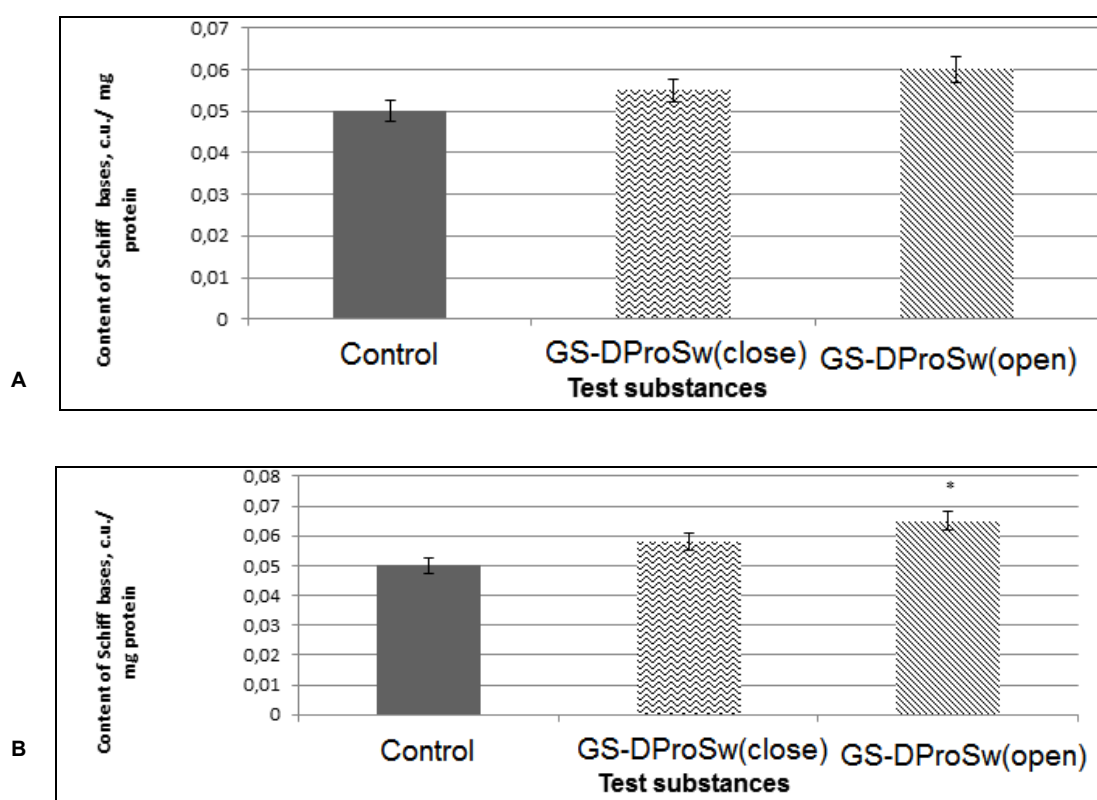


Fig. 4. Content of Schiff bases in the fraction of neutral lipids (A) and phospholipids (B) of mouse lymphoblast cells of L1210 on the action of experimental substances ($M \pm m$, $n = 5$)

* – $p < 0,05$ in comparison with control.

With all of the above, in the L1210 cells, a statistically significant increase in death through apoptosis was observed, both relative to the control group and the groups of cells that were incubated with open and closed forms of PM with each other (table 1).

Table 1. Level of apoptosis in the cell line L1210 for the action of the test substances ($M \pm m$, $n = 5$)

Test substances	Level of apoptosis, %
Control	$20,67 \pm 1,1$
GS-DProSw (close)	$37,55^* \pm 0,9$
GS-DProSw (open)	$51,68^* \pm 0,8$

* – $p < 0,05$ in comparison with control.

In the analysis of L1210 mouse lymphoblast cells in the cell cycle phases, the activity of the peptidomimete GS-DProSw was observed: statistical increase of cells in the

G1 / G0 phase under the action of the open form of PM, relative to the control and the closed form; statistical increase of cells in the G2 / M phase under the action of the

closed form with respect to control and open PM form. In the S phase, there was a simultaneous statistically significant

decrease in the number of cells encapsulated with closed and open forms in terms of control (Fig. 5).

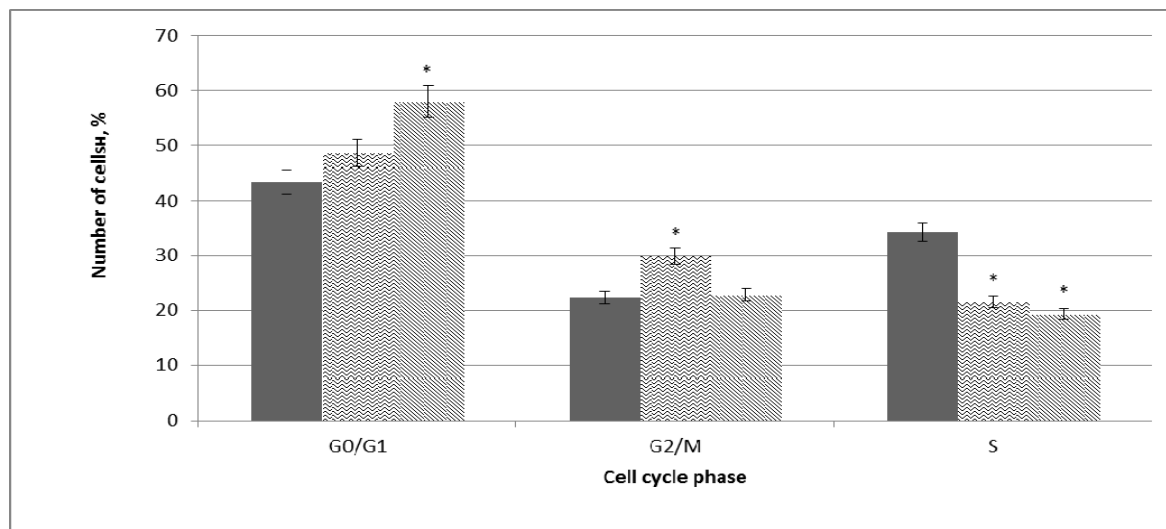


Fig. 5. Distribution of mouse lymphoblast cells of L1210 over the phases of the cell cycle by the action of the peptidomimetic GS-DProSw ($M \pm m$, $n=5$)

* – $p < 0,05$ in comparison with control.

Conclusions. As a result of our studies, the content of lipid peroxidation oxidation products in the mouse lymphoblast cells of L1210 was determined by the action of a photosensitive peptidomimetic. It was found that in cells that were cultured with the addition of an open and closed form of peptidomimetic GS-DProSw, no preexisting changes in the level of malondialdehyde were observed. It was determined that the photosensitive peptidomimetics does not show an increase in the level of Schiff bases, diene and trienic conjugates. It has been shown that the highest level of cell apoptosis was observed due to the exposure of the open form of the peptidomimetic GS-DProSw. The most prominent cytotoxic and cytostatic action is the open form of the photosensitive peptidomimetic GS-DProSw. Consequently, this allows us to conclude that the mechanism of action of substances does not involve active forms of oxygen to neutralize cells.

References:

1. Abalovich M. Peripheral markers of oxidative stress in Graves disease. The effects of methimazole and 131 Iodine treatments / M. Abalovich, S. Llesuy // *Clinical Endocrinology*, 2003. – Vol. 59. – P. 321–323. – (ISSN: 1365-2265).
2. Repetto M. Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination / M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris // *Biochemistry, Lipid Peroxidation*, 2012. – P. 14–18. – (ISBN: 978-953-51-0716-3).
3. Van der Paal J. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress / J. Van der Paal, C. Erik etc. // *Chemical Science*, 2016. – Vol. 7. – P. 489–498.
4. Intraluminal increase of superoxide anion follow transient focal cerebral ischemia in rats / T. Mori, T. Asano, T. Matsui et al. // *Brain Res.*, 1999. – Vol. 8. – № 2. – P. 350–370.

5. Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy // O. Babii, S. Afonin, L. Garmanchuk et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2016. – Vol. 55, № 18. – P. 5493–5496.

6. Курашвили Л. В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях: метод. пособие / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова. – Пенза: ин-т усоверш. врачей МЗ РФ, 2003. – 32 с.

7. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – 371 с.

References (Scopus):

1. Abalovich M., Llesuy S. Peripheral markers of oxidative stress in Graves disease. The effects of methimazole and 131 Iodine treatments. *Clinical Endocrinology*, 2003. Vol. 59, pp. 321 – 323, – (ISSN: 1365-2265).
2. Repetto M., Semprine J., Boveris A. Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. *Biochemistry, Lipid Peroxidation*, 2012. pp. 14 – 18, – (ISBN: 978-953-51-0716-3).
3. Van der Paal J., Erik C., et al. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chemical Science*, 2016, Vol 7, pp. 489-498.
4. Mori T., Asano T., Matsui T., Muramatsu H. Intraluminal increase of superoxide anion follow transient focal cerebral ischemia in rats // *Brain Res.* 1999. V. 8. №2, pp. 350-370.
5. Babii O., Afonin S., Garmanchuk L., Nikulina V., Nikolaienko T., Shelest D., Dasyukevich O., et al. Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2016. – V.55, №18. – P.5493-5496.
6. Kurashvili L., Kosoy G., Zaharova I. Sovremennoe predstavlenie o perekisnom okislenii lipidov i antioksidantnoy sisteme pri patologicheskikh sostoyaniyah // *Metodicheskoe posobie.* – Penza: Institut usovershenstvovaniya vrachey MZRF, 2003. – S. 32
7. Orekhovich V. Sovremennye metody v boihimii. M.: Medicina, 1977. – S.371.

Надійшла до редколегії 30.11.17

Д. Шелест, асп., О. Павлюк, студ., О. Колотій, студ., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ФОТОЧУТЛИВОГО ПЕПТИДОМІМЕТИКА НА ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН L1210

Метою дослідження було оцінити можливість фоточутливих пептидоміметиків впливати на процеси перекисного окиснення ліпідів у культурі клітин. У результаті наших досліджень визначено вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у клітинах лімфобластоми миші L1210 за дії фоточутливого пептидоміметика. Установлено, що у клітинах, які культивували з додаванням відкритої та закритої форм пептидоміметика GS-DProSw достовірних змін рівня дієнових і трієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ, не спостерігалось. Показано, що найвищий рівень апоптозу клітин спостерігається за впливу відкритої форми пептидоміметика GS-DProSw. Отже, це дозволяє зробити висновок про те, що в механізми дії речовин не залучені активні форми кисню до знешкодження клітин.

Ключові слова: пептидоміметики, перекисне окиснення ліпідів, клітини лімфобластоми.

Д. Шелест, асп., О. Павлюк, студ., О. Колотий, студ., Л. Гарманчук, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК L1210

Целью исследования было оценить возможность фоточувствительных пептидомиметиков влиять на процессы перекисного окисления липидов в культуре клеток. В результате наших исследований было определено содержание продуктов перекисного окисления липидов в клетках лимфобластомы мыши L1210 под действием фоточувствительных пептидомиметиков. Установлено, что в клетках, которые культивировали с добавлением открытой и закрытой форм пептидомиметиков GS-DProSw достоверных изменений уровня диеновых и триеновых конъюгатов, ТБК-активных соединений, шиффовых оснований, не наблюдалось. Было показано, что высокий уровень апоптоза клеток наблюдался при воздействии открытой формы пептидомиметиков GS-DProSw. Поэтому из указанного выше следует, что в механизмы действия веществ не вовлечены активные формы кислорода к обезвреживанию клеток.

Ключевые слова: пептидомиметики, перекисное окисление липидов, клетки лимфобластомы.

УДК: 577.3

С. Зай, асп., О. Мотузюк, канд. биол. наук
Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна,
В. Білобров, студ., Д. Вулицька, студ.,
ОНЦ "Институт биологии та медицины", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Ноздренко, студ.,
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ВПЛИВ ВРС₆₀ НА ШВИДКІСНО-СИЛОВІ ПАРАМЕТРИ ТЕТАНІЧНОГО СКОРОЧЕННЯ *MUSCLE SOLEUS* АЛКОГОЛІЗОВАНИХ ЩУРІВ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ІНДУКОВАНОЇ ІШЕМІЇ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ

Вивірено результати тензометричних досліджень впливу ВРС₆₀ (концентрація 0,15 мг/мл) у дозі 1 мг/кг на швидкісно-силові показники тетанічного скорочення *muscle soleus* за умови 1-годинної та 2-годинної ішемії у щурів із хронічною алкоголізацією. Синергічний ефект ішемічного ушкодження та алкогольної інтоксикації, порівняно з нативним м'язом, проявляється у зниженні показників сили скорочення до 26,25±3,23 і 20,2±2,45 (p<0,01) та збільшенні часу досягнення її максимальних значень на 1,33±0,12 с та 1,45±0,15 с (p<0,01) відповідно. Показано, що за умови внутрішньочеревинного введення розчину ВРС₆₀ ці показники вірогідно зростають.

Ключові слова: фулерени, ішемія, хронічна алкоголізація, *muscle soleus*.

Вступ. Ішемічні ушкодження – одні з найпоширеніших патологічних станів скелетних м'язів нижніх кінцівок [1], та становлять більше 35 % від загальної кількості пошкоджень опорно-рухового апарату [2]. Ішемія викликає тяжкі морфофункціональні порушення м'язової тканини на рівні окремих міофібрил, що супроводжується пролонгованою дистрофією м'язових волокон [3]. Безпосереднім наслідком ішемії є зменшення максимальної силової продуктивності [4; 5], пришвидшення виникнення та розвитку процесу втоми [4,6]. На біохімічному рівні ішемічні ушкодження скелетних м'язів представляють послідовність біохімічних реакцій, які ініціюються за умов гіпоксії вже після декількох хвилин ішемізації, незалежно від етіологічних особливостей тканини, і є наслідком недостатнього кровопостачання [2]. Уже не викликає сумніву той факт, що активація процесів вільнорадикального окиснення і пригнічення систем антиоксидантного захисту супроводжують як самі епізоди гіпоксії/ішемії, так і постгіпоксичний/постішемічний періоди. Важливе місце в патогенезі надмірного впливу вільних радикалів належить зниженню активності антиоксидантних систем, а саме: супероксид-дисмутази (SOD), глутатіонпероксидази (GPX) і каталази, карнозінази, аскорбінової кислоти, бета-каротину, альфа-токоферолу тощо [7].

У людей, які зловживають алкоголем, досить часто діагностують так званий синдром позиційної ішемії, спричинений стисненням однієї з кінцівок вагою власного тіла внаслідок тривалого перебування у вимушеній позиції [8]. Руйнівний вплив етанолу й ацетальдегіду на скелетні м'язи й міокард, проявляється у посиленні процесів перекисного окиснення, ініціюючи надмірне утворення вільних радикалів і розвиток окисного стресу [9].

Завдяки нанорозміру, високій хімічній стабільності та притаманним унікальним фотофізичним властивостям [10], С₆₀ фулерен викликає найбільший інтерес для експериментальних біомедичних досліджень [11–17]. С₆₀ фулерени проявляють відновлювальну здатність,

приєднуючи до шести електронів. Завдяки цьому вони діють у біологічних системах як уловлювачі вільних радикалів, зокрема і АФК [18–19], надмірна продукція яких лежить в основі багатьох захворювань людини та тварин. Основною перевагою використання С₆₀ фулеренів як потужних антиоксидантів є їхня здатність локалізуватися всередині клітини в мітохондріях та інших органах, саме в яких, за патологічних станів, відбувається утворення вільних радикалів. Додатковою перевагою С₆₀ фулеренів та їх похідних є їхня здатність неспецифічно захищати різні клітини від різноманітних токсинів [20–21]. Літературні дані вказують, що фулерени виступають потужними поглиначами вільних радикалів, утворення яких відбувається при ішемічній травмі окремих органів, зокрема тонкої кишки [22] та легень [23–24].

Враховуючи, що за ішемічного пошкодження, обтяженого зловживанням алкоголем, спостерігається надмірна активація у м'язовій тканині процесів вільнорадикального перекисного окиснення та загальне зменшення ефективності роботи антиоксидантних систем організму, метою нашої роботи було дослідити вплив ВРС₆₀ на динамічні характеристики скорочення *muscle soleus* алкоголізованих щурів за умови експериментально-індукованої ішемії різної тривалості.

Матеріали та методи. Експерименти проводилися на 25 дорослих щурах лінії Вістар, середньою масою 150 г, яких утримували в умовах стаціонарного віварію.

Досліджуваних тварин поділили на п'ять груп (n=5): MS_(N) – інтактні тварини; MS_(AI-1) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 год; MS_(FAI-1) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 год, та внутрішньочеревинним введенням розчину ВРС₆₀; MS_(AI-2) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 2 год; MS_(FAI-2) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 2 год, та внутрішньочеревинним введенням розчину ВРС₆₀.

нтально-індукованою ішемією тривалістю 2 год та внутрішньочеревинним введенням розчину ВРС₆₀.

Оперативні втручання та забій тварин виконували відповідно до вимог "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" і норм біомедичної етики, відповідно до законів України №: 3446-IV від 21.02.2006 р., м. Київ, "Про захист тварин від жорстокого поводження" із проведенням медико-біологічних досліджень.

Дослідження поділено на дві фази: хронічний і гострий експерименти. Для індукції експериментальної хронічної алкоголізації щурам протягом 30 календарних днів за допомогою металевого катетера вводили 40%-й спирт у дозі 1 мл/100 г. Тварини контрольної групи аналогічним шляхом отримували еквівалентний об'єм дистильованої води. Водний колоїдний розчин С₆₀ фулеренів (ВРС₆₀ (концентрація 0,15 мг/мл) у дозі 1 мг/кг вводили внутрішньочеревинно протягом 5 останніх днів алкоголізації.

Усі хірургічні процедури проводились в асептичних умовах під загальною анестезією. Під час підготовки до гострого експерименту тварин наркотизували підшкірним введенням тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг.

Експериментальну індукцію ішемії здійснювали, через 30 днів після початку хронічної алкоголізації, шляхом перетискання джгутотом зовнішньої клубової артерії (arteria iliaca externa), стегнової артерії (arteria femoralis) та її каудальних терміналей на рівні гомілки. *Muscle soleus* препарували, без зняття джгута, за допомогою попередньо простерилізованих офтальмологічних інструментів. Тварин умертвляли методом декапітації, відразу після екстирпації м'яза.

Адаптований (позбавлений залишків нервів, судин і сполучної тканини) м'язовий препарат протягом 10 хв розміщували у плексигласовій камері при 37 °С та постійно циркулюючому фізіологічному розчині Тірорде (рН 7,3–7,4). В експериментальному дослідженні використовували хімічні реактиви кваліфікації х. ч. або ч. д. а. ("Хімлаборреактив", Україна), етиловий спирт (40%-й), дистильовану воду.

Для реєстрації зміни сили ізометричного скорочення камбалоподібного м'яза (*muscle soleus*) використовували тензометричну установку. Стимуляцію ішемізованого м'яза здійснювали електричними імпульсами прямокутної форми з такими характеристиками: частота – 30 Гц, тривалість – 0,2 мс, тривалість стимуляційного пробігу – 3000 мс, час релаксації між стимуляційними пробігами – 3 хв.

Статистичний аналіз результатів вимірювання здійснювався методами варіаційної статистики у комп'ютерній програмі Origin 7.0. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували U-критерій Манна – Вітні. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$. Результати представлено як середнє арифметичне $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$).

Результати та їх дослідження. Ішемія та гіпоксія складають основу патогенетичних механізмів багатьох гострих і хронічних захворювань людини. Особливо це характерно для патології серця і судин, що є однією з головних причин втрати працездатності та смертності населення. Скелетні м'язи особливо резистентні до ушкоджень, тому здатні протистояти тривалим періодам ішемії [2], проте тривала ішемізація може призвести до значних патологій, у тому числі м'язових некрозів та апоптозу [25–26]. За ішемічної травми скелетного м'яза спостерігається висока кореляція між тривалістю ішемізації та подальшою життєздатністю м'язового волокна. Після першої години ішемії спостерігається інтенсивна тканинна дегенерація, яка супроводжується набряком, відокремленням м'язових волокон, та розширенням міжфібрилярного простору, між другою та сьомою годиною проявляються більш інтенсивні ультраструктурні зміни, що викликає зменшення максимальної силової відповіді м'яза.

На рис. 1 представлено криві зміни сили тетанічного скорочення ішемізованого *muscle soleus* алкоголізованих щурів без впливу фулеренів (I) та за умови їхньої дії (II).

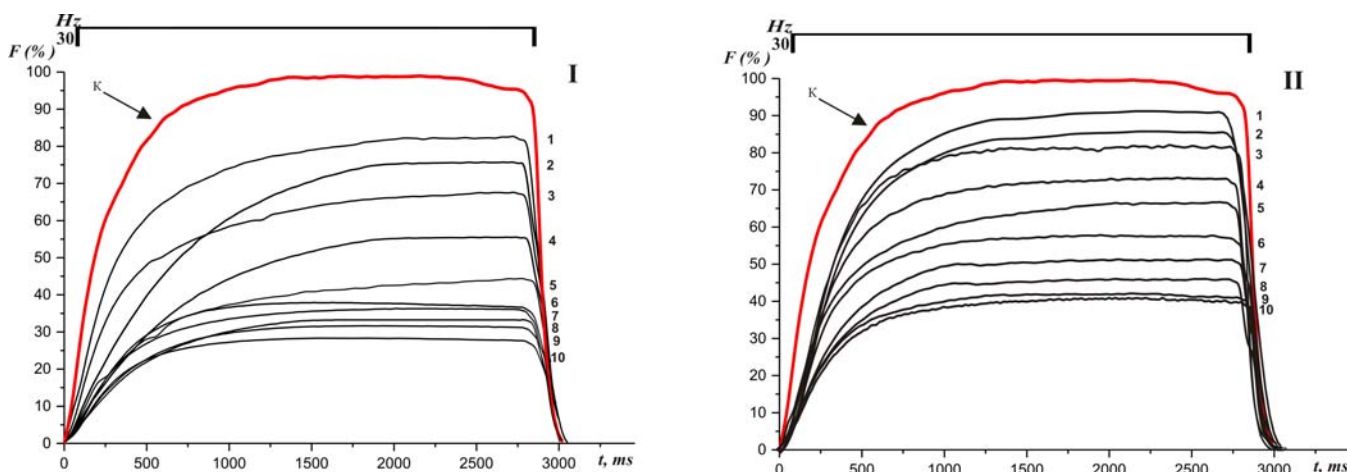


Рис. 1. Зміна часового ходу тетанічних скорочень *muscle soleus*:

I – група MS_(AI-1); II – група MS_(FAI-1)

(на рисунку представлено тетанічні скорочення, які максимально наближені до середніх значень у вибірках)

У ході експерименту прослідковується падіння сили з кожним наступним тетанічним скороченням в обох групах. Порівнюючи характер зміни тетанічних скорочень у двох групах, відмітимо, що у MS_(AI-1) спостерігається лінійне падіння сили протягом першої

половини тесту, після чого тривалий час утримується на відносно однаковому рівні порівняно з MS_(FAI-1), де зниження силової відповіді є лінійним протягом усього експерименту.

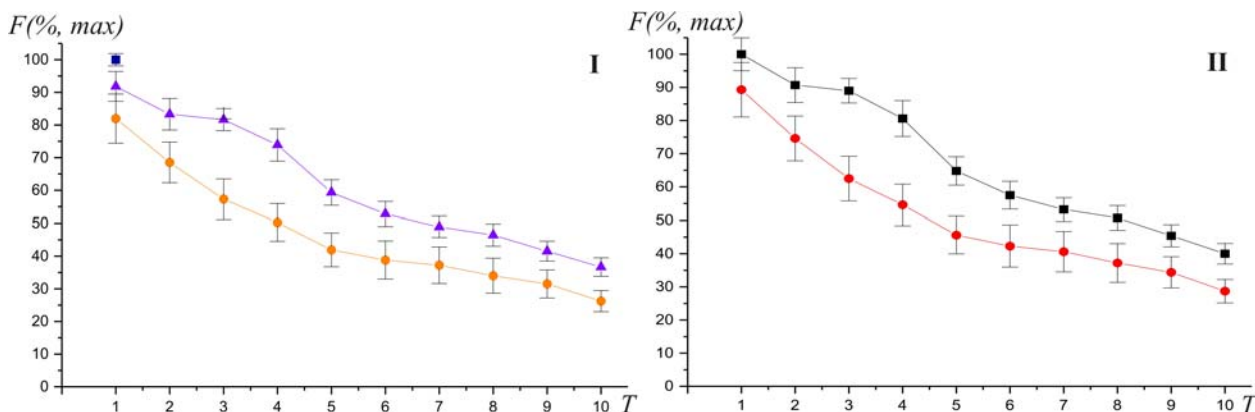


Рис. 2. Зміна максимальної сили скорочення ($F(\%, \max)$) *muscle soleus* у відсотках:
 I – від контрольних значень, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(N)}$, (▼) – $MS_{(AI-1)}$, (●) – $MS_{(FAI-1)}$;
 II – від значень у групі $MS_{(FAI-1)}$, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(FAI-1)}$, (●) – $MS_{(AI-1)}$

Результати наших досліджень показали, що ішемізований *muscle soleus* розвиває меншу максимальну силу скорочення вже на початку експерименту та становить $81,95 \pm 7,53\%$ від контрольного значення ($p \leq 0,01$). Падіння максимальної сили проявляється з кожним наступним скороченням і на закінчення експерименту перебуває в межах $26,25 \pm 3,23$ ($p \leq 0,01$) (рис. 2). Зазначимо, що у групі $MS_{(FAI-1)}$ максимальна сила скорочення становить $91,82 \pm 4,57\%$ та $36,69 \pm 2,84\%$ від

контрольних ($p \leq 0,05$) на початку та в кінці експерименту відповідно (рис. 2). Порівнюємо групи. У групі $MS_{(AI-1)}$ початкові та кінцеві значення максимальної сили скорочення різко відрізняються від таких самих у $MS_{(FAI-1)}$ і становлять $89,3 \pm 8,2\%$ та $28,7 \pm 3,54\%$ ($p \leq 0,05$) відповідно (рис. 2).

Зі збільшенням часу ішемії до 2 год, знижується життєздатність м'яза, що проявляється у зменшенні значень сили тетанічного скорочення (рис. 3).

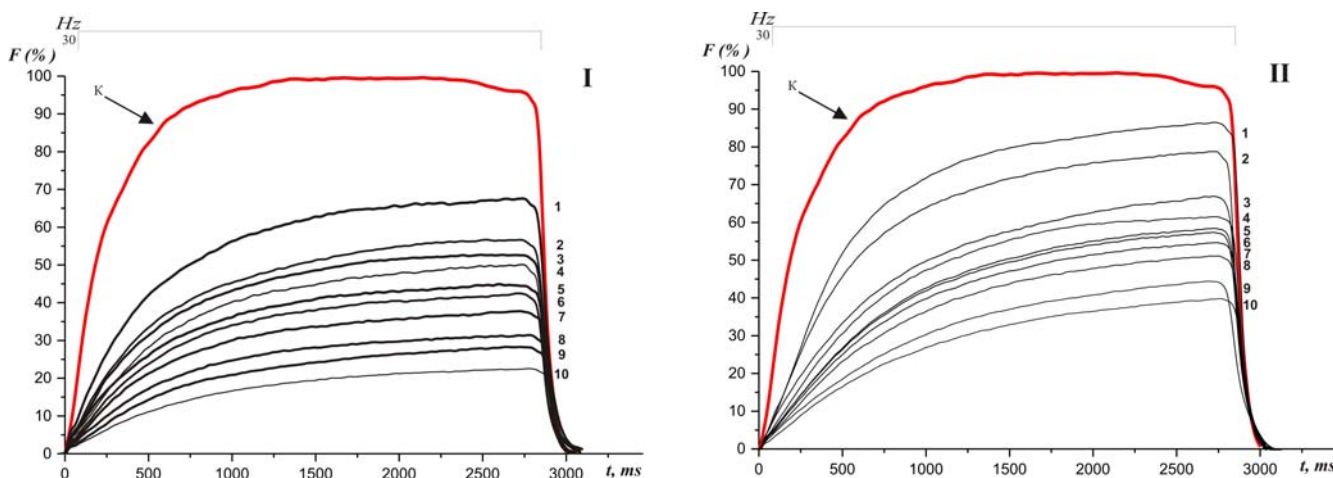


Рис. 3. Зміна часового ходу тетанічних скорочень *muscle soleus*:
 I – група $MS_{(AI-2)}$; II – група $MS_{(FAI-2)}$

(на рисунку представлено тетанічні скорочення, які максимально наближені до середніх значень у вибірках)

Внутрішньочеревинне введення розчину BPC_{60} частково компенсує ці ушкодження та дозволяє підтримувати силу скорочення на високому рівні протягом усього експерименту. Зазначимо, що у двох групах відсутні різкі стрибки показників, і зменшення сили відбувається поступово зі збільшенням тривалості експерименту.

На рис. 4 показано зміни показників максимальної сили скорочення *muscle soleus* алкоголізованих щурів без впливу фулеренів та за їхньої дії при ішемії тривалістю 2 години.

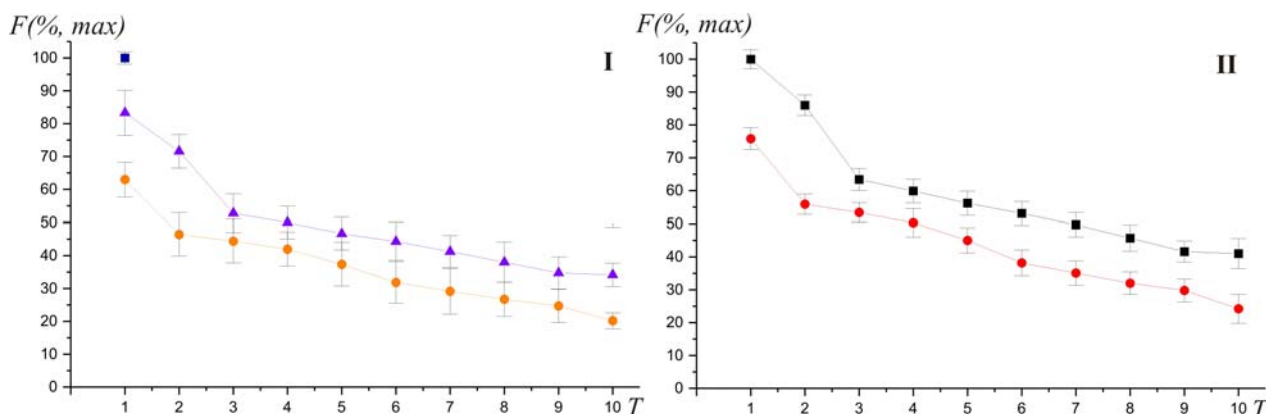


Рис. 4. Зміна максимальної сили скорочення ($F(\%, \max)$) *muscle soleus* у відсотках:
I – від контрольних значень, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(N)}$, (▼) – $MS_{(AI-2)}$, (●) – $MS_{(FAI-2)}$;
II – від значень у групі $MS_{(FAI-2)}$, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(FAI-2)}$, (●) – $MS_{(AI-2)}$

Максимальна сила скорочення різко знижується порівняно з контролем та становить $62,99 \pm 5,24$ % на початку експерименту та $20,2 \pm 2,45$ у кінці ($p \leq 0,01$). У групі $MS_{(FAI-2)}$ максимальна сила щодо контрольної групи змінюється від $83,3 \pm 6,87$ % до $34,13 \pm 3,57$ % ($p \leq 0,05$). У порівнянні з групою $MS_{(FAI-2)}$, максимальна сила скорочення у $MS_{(AI-2)}$ становить $75,8 \pm 3,31$ % на початку експериментального тесту, а на закінчення знижується до $24,2 \pm 4,45$ від вихідного значення ($p \leq 0,05$).

Реєстрація такого важливого біомеханічного показника, як інтегрована потужність (яка вираховується по загальній площі, котру описує силова крива), показала аналогічні зміни: поступове її зменшення зі збільшенням тривалості експерименту та ішемізації, що певною мірою компенсувалось дією BPC₆₀.

На рис. 5 представлено зміни інтегрованої потужності *muscle soleus* алкоголізованих щурів за ішемії тривалістю 1 година.

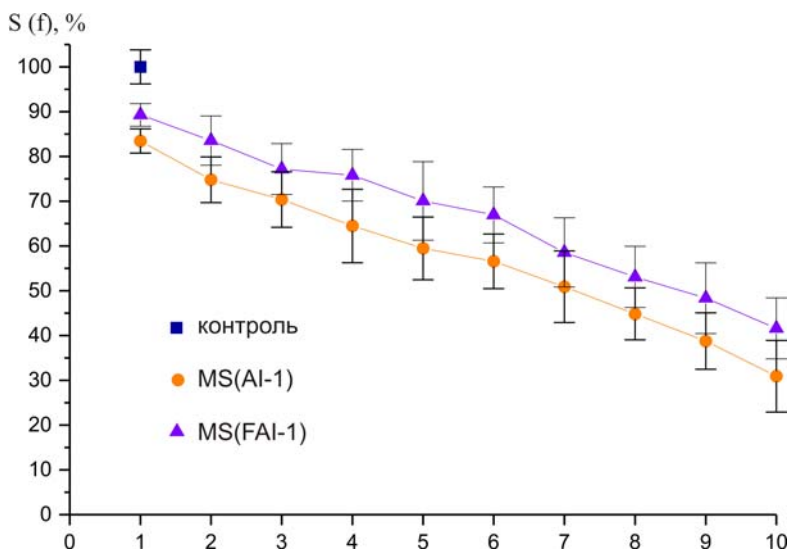


Рис. 5. Зміна інтегрованої потужності ($S(f)$) *muscle soleus* у відсотках від контрольних значень, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(N)}$, (▼) – $MS_{(AI-1)}$, (●) – $MS_{(FAI-1)}$

Показник у групі $MS_{(AI-1)}$ становить $83,47 \pm 2,7$ % від контрольного значення на початку та поступово знижується до $30,91 \pm 8$ % ($p \leq 0,05$) у кінці експериментального тесту. За умови дії фулеренів показники інтегрованої потужності камбалоподібного м'яза є вищими та коливаються в межах від $89,27 \pm 2,53$ % до $41,61 \pm 6,81$ % на початку та в кінці експерименту відповідно (рис. 5).

За умови 2-годинної ішемії без дії фулеренів даний показник різко відрізняється від такого ж у контрольній

групі та становить лише $46,98 \pm 6,01$ % і лінійно знижується до $19,63 \pm 6,23$ % ($p \leq 0,01$) у кінці експерименту. У випадку введення фулерену – зменшення інтегрованої потужності *muscle soleus* алкоголізованих щурів протягом експерименту має незначний характер. На початку експерименту становить $68,28 \pm 4,16$ % ($p \leq 0,01$) від контрольного значення, а в кінці – $30,59 \pm 5,13$ % (рис. 6).

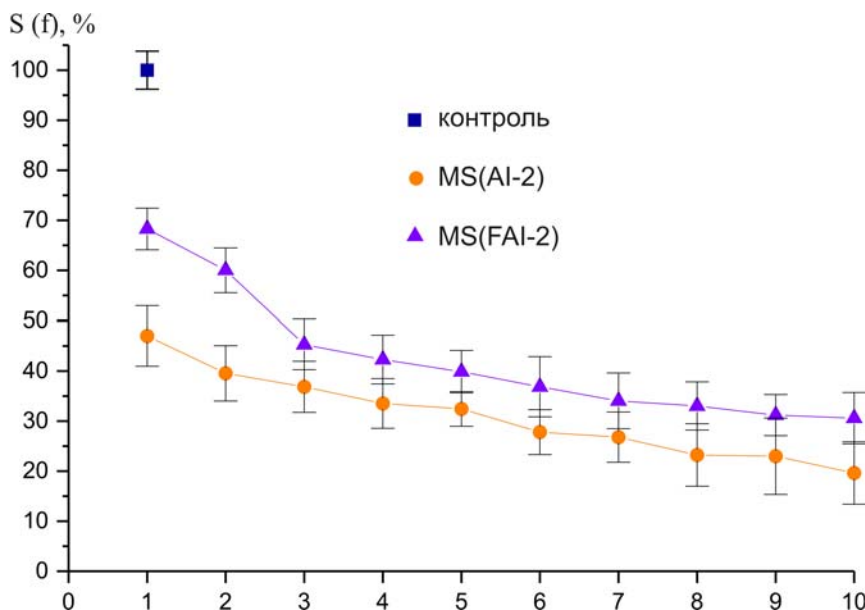


Рис. 6. Зміна інтегрованої потужності ($S(f)$) *muscle soleus* у відсотках від контрольних значень, прийнятих за 100 %: (■) – $MS_{(N)}$, (▼) – $MS_{(AI-2)}$, (●) – $MS_{(FAI-2)}$

Зниження показників максимальної сили скорочення та інтегрованої потужності ішемізованого камбалоподібного м'яза може бути наслідком виснаження внутрішньоклітинних запасів АТФ (20 %) під час інтенсивного скорочення, креатинфосфокінази (58 %) і глікогену (90 %). Відомо, що ішемічні ушкодження м'язової тканини супроводжуються надмірним утворенням вільних радикалів. Враховуючи літературні дані про високовиражені антиоксидантні властивості фулеренів при ішемічних пошкодженнях окремих органів [22–24], можна припустити аналогічний захисний ефект розчину ВРС₆₀ в умовах нашого експерименту.

Зміна часу досягнення м'язом своєї максимальної силової відповіді (ТР) є одним із головних показників точного позиціонування. Нездатність м'яза реалізувати коректно пули мотонейронних команд, відправлених ЦНС унаслідок порушення динамічного компонента м'язової відповіді, утруднює корекцію всіх пропріорецептивних систем організму, що призводить до цілого каскаду порушень у м'язових реакціях точних цілеспрямованих рухів.

У ході нашого експерименту прослідковується збільшення часу, необхідного для розвитку максимальної силової відповіді м'язом, зі збільшенням тривалості ішемії, що є ознакою розвитку патологічних процесів, які помітно обтяжують їхню силову продуктивність.

За 1-годинної ішемії показник ТР у групі зростає порівняно із групою $MS_{(N)}$ на $1,33 \pm 0,12$ с ($p \leq 0,01$) у динамічному порядку протягом усього експериментального тесту. Даний показник у групі $MS_{(FAI-1)}$ при порівнянні з $MS_{(AI-1)}$ знижується на $0,27 \pm 0,16$ с ($p \leq 0,01$), проте, у порівнянні з контрольною групою, зростає на $1,06 \pm 0,14$ с ($p \leq 0,01$), що свідчить про неможливість повного відновлення швидкісно-силових показників м'яза під впливом ВРС₆₀.

Швидкість досягнення м'язом своєї максимальної силової відповіді за 2-годинної ішемії знижується ще помітніше. Порівняно з контролем у $MS_{(AI-2)}$ цей показник зростає на $1,45 \pm 0,15$ с ($p \leq 0,01$), а з групою $MS_{(FAI-2)}$ – на $0,09 \pm 0,02$ с ($p \leq 0,05$) (рис. 6).

Виявлене збільшення показників у ТР ішемізованих м'язах груп $MS_{(AI)}$ порівняно з нативним, що може бути пов'язане зі змінами актоміозинової взаємодії. Зменшення часу, необхідного для розвитку м'язом своєї максимальної силової відповіді під дією ВРС₆₀ в ішемізо-

ваних м'язах, сприятиме більш якійсь реалізації цільових рухів кінцівками.

Висновки. Отже, наші дослідження показали суттєві зміни швидкісно-силових показників тетанічного скорочення *muscle soleus* у алкоголізованих щурів, порівняно з контрольною групою та тваринами, яким вводили ВРС₆₀. Зокрема, ці зміни проявляються у зниженні максимальної сили скорочення та збільшенні часу, необхідного для її досягнення. Виявлене зменшення цих характеристик ішемізованого *muscle soleus* у щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією може бути частково компенсоване під впливом розчину ВРС₆₀. Підтвердження позитивного впливу наночастинок C₆₀ фулеренів (у вигляді ін'єкції їх колоїдного розчину), з урахуванням яскраво виражених у них антиоксидантних властивостей та відсутності даних про викликані ними гострі/хронічні інтоксикації, на швидкісно-силові показники скорочення м'язів може стати підґрунтям для розробки лікарських препаратів проти м'язових патологій, а також сприятиме розробці комплексної методики лікування ранніх етапів ішемічного пошкодження скелетних м'язів людини, включаючи алкогольне отруєння організму.

Список використаних джерел:

1. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II) // Eur J Vasc Endovasc Surg. 2007; 33(1). – P. 1–75.
2. Murdock M. Compartment syndrome: a review of the literature / M. Murdock, M. Murdock // Clin Podiatr Med Surg, 2012; 29 (2). – P. 301–310.
3. Stan sudynnoho endoteliju ta gistologichni zminy m'jazovoi' tkanyny u hvoryh pry hronichnij ishemit' / J. V. Patchenko, R. V. Saljutin, D. B. Dambrovskij et al. / Klinichna Hirurgija. – 2011. – P. 41–44.
4. Decrease muscle speed. Strength and fatigability following two hours of tourniquet-induced ischemia / L. R. Lieber, R. A. Pedowitz, J. Friden et al. // Plast. Reconstr. Hand Surg. – 1992. – P. 127–132.
5. Zavodovskij D. Zmina shvydkisno-sylovyh pokaznykiv skorochennja gomilkovogo m'jazu shhura za umov shhurno vyklykanoi' vaskuljarnoi' ishemit' / D. Zavodovskij, O. Nozdrenko, O. Homa, V. Soroka // Visnyk Kyi'vs'kogo Nacional'nogo Universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Biologija. – 2013. – P. 5–7.
6. Ischemia causes muscle fatigue / G. Murthy, A. R. Hargens, S. Lehman // J. Orthop. Res. 19 (3). – 2001. – P. 436–440.
7. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins / M. Brand, C. Affourtit, T. Esteves et al. // Free Radic Biol Med. – 2004. – P. 755–767.
8. Malinoski D. J. Crush injury and rhabdomyolysis // D. J. Malinoski, M. S. Slater, R. J. Mullins // Crit Care Clin. – 2004. – P. 171–192.
9. Aberle N. S. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy / N. S. Aberle, J. Ren // Biol. Proced. Online. – 2003. – Vol. 5. – P. 1–12.

10. Матишевська О. В. Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. Фізико-хімічні властивості та біодоступність / О. П. Матишевська, С. В. Прилуцька, І. І. Гринюк // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 1, С. 18–26.
11. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis / S. V. Prylutska, A. P. Burlaka, Yu. I. Prylutsky et al. // Exp. Oncol. – 2011. – Vol. 33. – № 3. – P. 162–164.
12. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy / S. V. Prylutska, A. P. Burlaka, P. P. Klymenko et al. // Cancer Nanotechnol. – 2011. – Vol. 2. – № 1. – P. 105–110.
13. Using C₆₀ fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent viruses / Yu. Rud, L. Buchatsky, Yu. Prylutsky et al. // J. Enzyme inhib. Med. Chem. – 2012. – Vol. 27. – № 4. – P. 614–617.
14. Фулерен C₆₀ та його похідні як протипухлинні агенти: перспективи і проблеми / С. В. Прилуцька, Ю. М. Кічмаренко, К. І. Богуцька, Ю. І. Прилуцький // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5. – № 3. – С. 9–17.
15. Nozdrenko D. Protective effect of water-soluble pristine C₆₀ fullerene in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle / D. Nozdrenko, Yu. Prylutsky, U. Ritter // P. Int. J. Phys. Pathophys. – 2014. – Vol. 5, № 2. – P. 97–110.
16. Наноматеріали у діагностиці й терапії цукрового діабету / М. В. Толкачов, К. І. Богуцька, О. М. Савчук, Ю. І. Прилуцький // Biotechnol. Acta. – 2015. – Т. 8. – № 1. – С. 9–18, 53–62.
17. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as perspective agent in antitumor therapy / S. Prylutska, L. Skivka, G. Didenko et al. // Nanoscale Res. Lett. – 2015. – Vol. 10. – № 499. – P. 1–7.
18. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C₆₀ fullerene basis. / A. P. Burlaka, E. P. Sidorik, S. V. Prylutska et al. // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26. – № 4. – P. 326–327.
19. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro* / S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, O. P. Matyshevska et al. // Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct. – 2008. – Vol. 16. – № 5–6. – P. 698–705.
20. C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment // S. Prylutska, I. Grynyuk, O. Matyshevska et al. // Drugs R D. – 2014. – Vol. 14. – № 4. – P. 333–340.
21. C₆₀ fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro* / K. S. Afanasieva, S. V. Prylutska, A. V. Lozovik et al. // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87. – № 1. – P. 37–44.
22. Lai H. S. Free radical scavenging activity of fullerenol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs / H. S. Lai, W. J. Chen, L. Y. Chiang // World J Surg. – 2000. – № 24 (4). – P. 450–454.
23. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs / Y. W. Chen, K. C. Hwang, C. C. Yen, Y. L. Lai // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2004. – № 287 (1). – R21–R26.
24. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury / Y. L. Lai, P. Murugan, K. C. Hwang // Life Sci. – 2003. – № 72 (11). – P. 1271–1278.
25. Wang W. Z. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle / W. Z. Wang, R. C. Baynosa, W. A. Zamboni // J Surg Res. – 2011. – Nov. – Vol. 171 (1). – P. 175–182.
26. J. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle / D. C. Gute, T. Ishida, K. Yarimizu, R. Korthuis // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1998. – Vol. 179 (1–2). – P. 169–187.

References:

1. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II) / Eur J Vasc Endovasc Surg. 2007; 33(1): 1–75.
2. Murdock M. Compartment syndrome: a review of the literature / Murdock M. Murdoch M.M. Clin Podiatr Med Surg. 2012; 29(2): 301–10.
3. Patchenko J., Saljutin R., Dambrovskiy D., Martynenko S., 2011. Stan sudynnoho endoteliju ta gistologichni zminy m'jazovoi tkanyyny u hvoryh pry hronichnij ishemii. Klinichna Hirurgija 3, 41–44.
4. Lieber L., Pedowitz R., Friden J., Gershuni D., 1992. Decrease muscle speed. Strength and fatigability following two hours of tourniquet-induced ischemia. Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 26, 127–132.
5. Zavodovskiy D., Nozdrenko D., Homa O., Soroka V. 2013. Zmina shvydkisno-sylovyh pokaznykiv skorochennja gomilkovogo m'jazu shhura za

- umov shhtuchno vyklykanoj vaskuljarnoi ishemii. Visnyk Kyi'vs'kogo Nacional'nogo Universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Biologija 63, 5–7.
6. Murthy G., Hargens A., Lehman S., Rempel D., 2001. Ischemia causes muscle fatigue. J. Orthop. Res. 19(3), 436–440.
7. Brand M., Affourtit C., Esteves T., Green K., Lambert A., Miwa S., Pakay J., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic Biol Med. 2004; 37(6): 755–67.
8. Malinoski D., Slater M., Mullins R. Crush injury and rhabdomyolysis. Crit Care Clin. 2004; 20(1): 171–92.
9. Aberle N. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy / Aberle N.S., Ren J. // Biol. Proced. Online. – 2003. – Vol. 5. – P. 1–12.
10. Matushevska O., Prulucka I., Grunuyk I. Fullerenu C₆₀ – biologichno aktivni molekuly. Fiziko-himichni vlastivosti ta biodostupnist. Biotechnologiy, 2010, T. 3, №1, P. 18–26.
11. Prylutska S., Burlaka A., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. Exp. Oncol., 2011, V. 33, N 3, P. 162–164.
12. Prylutska S., Burlaka A., Klymenko P., Grynyuk I., Prylutsky Y., Schuetze Ch., Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. Cancer Nanotechnol., 2011, V. 2, N 1, P. 105–110.
13. Rud Yu., L. Buchatsky, Prylutsky Yu., Marchenko O., Senenko A., Schütze Ch., Ritter U.. Using C60 fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent viruses. J. Enzyme inhib. Med. Chem., 2012, V.27, N 4, P. 614–617.
14. Prulutska S., Kichmarek Y., Bogutska K., Prulutsky Y. Fullerene C₆₀ ta poхідni ayk protupuhlinni agentu: perspektivu i problemu. Biotechnologiy, 2012, T. 5, №3, P. 9–17.
15. Nozdrenko D., Prylutsky Yu., Ritter U., Scharff P. Protective effect of water-soluble pristine C₆₀ fullerene in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. Int. J. Phys. Pathophys., 2014, V. 5, N 2, P. 97–110.
16. Tolkachov M., Bogutska K., Savchuk O., Prulutsky Y. Nanomaterialu u diagnostici ta terapii cukrovogo diabetu. Biotechnol. Acta, 2015, T. 8, № 1, P. 9–18, 53–62.
17. S. Prylutska L., Skivka G. at al. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as perspective agent in antitumor therapy. Nanoscale Res. Lett., 2015, V. 10: 499, P. 1–7
18. Burlaka A., Sidorik E., Prylutska S., Matyshevska O. at al. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C₆₀ fullerene basis. Exp. Oncol., 2004, V. 26, N 4, P. 326–327.
19. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct., 2008, V. 16, N 5–6, P. 698–705.
20. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutsky Y., Evstigneev M., Scharff P., Ritter U. C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. Drugs R D, 2014, V. 14, N 4, P. 333–340.
21. Afanasieva K., Prylutska S., Lozovik A., Bogutska K., Sivolob A., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P. C₆₀ fullerene prevents genotoxic effect of doxorubicin on human lymphocytes *in vitro*. Ukr. Biochem. J., 2015, V. 87, N 1, P. 37–44.
22. Lai H., Chen W., Chiang L. Free radical scavenging activity of fullerenol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. World J Surg. 2000; 24(4): 450–4.
23. Chen Y., Hwang K., Yen C., Lai Y. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004; 287(1): R21–6.
24. Lai Y., Murugan P., Hwang K. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. Life Sci. 2003; 72(11): 1271–8.
25. Wang W., Baynosa R., Zamboni W. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle // J Surg Res. 2011 Nov, V. 171(1), P. 175 – 182.
26. Gute D., Ishida T., Yarimizu K., Korthuis R. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle // Molecular and Cellular Biochemistry. 1998, V. 179 (1–2), P. 169–187.

Надійшла до редколегії 29.11.17

С. Зай, асп., О. Мотузюк, канд. биол. наук

Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинки, Луцк, Украина,

В. Белобров, студ., Д. Вулицька, студ.

УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,

О. Ноздренко, студ.

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ВРС₆₀ НА СКОРОСТНО-СИЛОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ ТЕТАНИЧЕСКОГО СОКРАЩЕНИЯ *MUSCLE SOLEUS* АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

Отражены результаты тензометрических исследований влияния ВРС₆₀ (концентрация 0,15 мг / мл) в дозе 1 мг/кг на скоростно-силовые показатели тетанического сокращения *muscle soleus* при 1-часовой и 2-часовой ишемии у крыс с хронической алкоголизацией. Синергический эффект ишемического повреждения и алкогольной интоксикации проявляется в снижении показателей силы сокращения до 26,25±3,23 и 20,2±2,45 (p<0,01) и увеличении времени достижения ее максимальных значений на 1,33±0,12 с и 1,45±0,15 с (p<0,01). Показано, что при внутрибрюшном введении раствора ВРС₆₀ эти показатели достоверно увеличиваются.

Ключевые слова: фуллерены, ишемия, хроническая алкоголизация, *muscle soleus*.

S. Zay, PhD stud., O. Motuzyuk, PhD
Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine,
V. Belobrov, Stud., D. Vulitska, Stud.
ESC "Institute of biology and medicine" Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kiev, Ukraine,
O. Nozdrenko, Stud.
Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

INFLUENCE OF C₆₀FAS ON THE SPEED-POWER PARAMETERS OF THE TETANIC CONTRACTION OF MUSCLE SOLEUS ALCOHOLISED RATS ON THE CONDITIONS OF EXPERIMENTALLY-INDUCED ISCHEMIA AT DIFFERENT DURATIONS

In the article presented the results of tenzometric studies of the effect of C₆₀FAS (concentration 0.15 mg / ml) at a dose of 1 mg / kg ON the speed-power parameters of the tetanic reduction of muscle soleus under conditions of ischemia in chronic alcoholic rats during 1-hour and 2-hour. The synergistic effect of ischemic injury and alcoholic intoxication, as compared to the native muscle, is manifested in reducing the reduction power to 26,25 ± 3,23 and 20,2 ± 2,45 (p ≤ 0,01), and an increase in the time to achieve it the maximum values for 1.33 ± 0.12s and 1.45 ± 0.15s (p ≤ 0.01) respectively. It is shown that if the intraperitoneal administration of the VRC60 solution is given, these indices are likely to increase.

Key words: fullerenes, ischemia, chronic alcoholism, muscle soleus.

УДК: 576.52

В. Балацький, асп., Л. Мацевич, канд. біол. наук, О. Півень, канд. біол. наук
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

КАРДІОСПЕЦИФІЧНА ДЕЛЕЦІЯ ГЕНА α -Е-КАТЕНІНУ ПРИЗВОДИТЬ ДО ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ЛІПІДІВ ДОРОСЛОГО СЕРЦЯ

Раніше ми показали, що нокаут гена α -Е-катеніну в ембріональному серці призводить до розвитку гіпертрофії серця у дорослих мишей і супроводжується активацією канонічного WNT-сигнального шляху. Відомо, що гіпертрофія міокарда також супроводжується порушенням метаболізму, але роль α -Е-катеніну в цих процесах залишається невідомою. Мета. Дослідити вплив гетерозиготної і гомозиготної делеції α -Е-катеніну на метаболізм ліпідів у серці. Методи. Дослідження проводили на мишах з умовним нокаутом α -Е-катеніну та трансгенних мишах α MHC-Cre. Використовували гістологічні (забарвлення жиром червоном О) та молекулярно-біологічні (Вестерн-блот) методи. Результати. Установлено, що делеція α -Е-катеніну призводить до накопичення нейтральних ліпідів у міокарді, зміни експресії та рівня фосфорилування ключових регуляторів ліпідного метаболізму (Ampk, Ppara, Acc, Hsl). Висновки. Отримані нами дані свідчать про порушення метаболізму ліпідів у дорослому серці з гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну.

Ключові слова: α -Е-катенін, міокард, метаболізм, Ampk, Ppara, Acc, Hsl.

Вступ. Гіпертрофія міокарда є одним із найпоширеніших захворювань серцево-судинної системи. Крім того, це один із ключових факторів ризику розвитку серцевої недостатності. Патологічна гіпертрофія серця характеризується, перш за все, порушенням архітектури тканини серця, підвищенням фіброзу, елімінацією кардіоміоцитів та кардіальною дисфункцією [1]. Зауважимо, що гіпертрофія – це адаптивна реакція серця, перш за все, на хронічне підвищення тиску, пошкодження серця, гормональні стреси, які, у свою чергу, призводять до активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних шляхів. До таких належать кальцієвирин/NFAT-, MAPK- та PI3K/AKT/mTOR-сигнальні шляхи [2] і канонічний Wnt-сигналінг [3]. Важливо також, що всі наведені сигналіни залучені й до контролю проліферації, диференціювання, виживання та міграції клітини, зокрема і кардіоміоцитів, серцевих фібробластів, ендотеліальних клітин та міоцитів судин. Активація зазначених сигнальних каскадів у дорослому міокарді призводить до активації експресії гіпертрофічних або фетальних генів (ANP, BNP, β -MHC) і, зрештою, реалізується у морфологічних перебудовах.

Однак ми хочемо звернути увагу на те, що гіпертрофія міокарда – це складна і комплексна патологія, і на її розвиток впливають не лише сигнальні каскади, що регулюють проліферацію і диференціювання кардіоміоцитів, а й регулятори метаболізму [4, 5]. Білки Ampk, Ppara, Acc та Hsl є важливими регуляторами метаболізму ліпідів у клітині. Тому детальна та всебічна характеристика механізмів розвитку цієї патології є конче необхідною для розуміння як етіології хвороби, так і прогнозу хворого. Раніше ми показали, що кардіоспецифічна делеція однієї або обох алелей гена α -Е-катеніну спричиняє летальність дорослих мишей віком 11 місяців. У таких тварин спостерігали фіброзне

заміщення кардіоміоцитів, а також активацію канонічного Wnt-сигналінгу та Yap-залежної транскрипції [6, 7]. Відомо, що і Wnt-, і Yap-сигнальні каскади є одними з основних регуляторів розмірів кардіоміоцитів та гіпертрофії. Однак не відомо, як втрата гена α -Е-катеніну в серці тварин впливає на метаболізм ліпідів. Тож у цій роботі ми зосередилися на детальному аналізі метаболізму ліпідів, порушення якого є типовими для гіпертрофії та серцевої недостатності у серцях тварин із гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну.

Матеріали і методи. Генерація тварин із делецією гена α -Е-катеніну в ембріональному серці. Для генерації дослідних груп тварин із кардіоспецифічною делецією гена α -Е-катеніну схрещували мишей, що експресують Cre-рекоміназу під контролем промотора важкого ланцюга α -міозину ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{wt/wt}), із мишами з умовним нокаутом гена α -Е-катеніну ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/flox}). Потомство F1 із генотипом ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/wt}) схрещували з мишами ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/flox}). Потомство F2 використовували у дослідженні: ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/wt}) – миші з гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/flox}) – миші з гомозиготною делецією α -Е-катеніну, ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/wt}) та ((α MHC)-Cre⁺; α -cat^{flox/flox}) – контрольні миші. У застосованій нами моделі Cre-рекомбіназа експресується, починаючи із 7,5–8 дня ембріонального розвитку, і з високою ефективністю видаляє фланкований loxP-сайтами фрагмент геному [8]. Новонароджених тварин генотипували у віці 5–6 днів згідно зі стандартними протоколами. Мутантні та алелі дикого типу визначали за допомогою таких праймерів: прямий: 5'-CATTTCTGTCAACCCCAAGAC-3' та зворотний 5'-GCAAAATGATCCAGCGTCCTGGG-3', α MHC-Cre трансген – прямий: 5'-CAGAACCTGAAGATGTTTCGC-3'

та зворотний 5'-TACACCTCGGTGCTAACCAG-3'. Генотипування, виділення ДНК проводили згідно зі стандартними протоколами. Під час проведення дослідження використовували самців мишей віком 10 місяців.

Трансгенні тварини були отримані доктором Міхаелем Шнайдером (Медичний коледж, Байлор, США). Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом α -Е-катеніну (α -cat^{fllox/fllox}), отримано із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Морфологічний аналіз. Аналіз накопичення ліпідів у тканині міокарда проводили із застосуванням криозрізів сердець дорослих тварин, які готувалися згідно з методикою [9], та із застосуванням забарвлення жирів червоним О [10]. Аналіз зразків тканини проводили, використовуючи світловий мікроскоп Primo Star (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Виділення білка та Вестерн-блот аналіз. Тканину шлуночків гомогенізували в буфері 50 мМ HEPES (pH 7,4), що містить 2 мМ етилендіамінтетраацетату, 1%-й Nonidet P-40, 10%-й гліцерол, інгібітори протеаз (10 мкг/мкл лейпептину, 5 мкг/мкл пепстатину А, 2 мкг/мкл апротиніну, 1 мМ фенілметилсульфоніл флуорид) та інгібітори фосфатаз (1 мМ натрій ортованадат та 10 мМ натрій флуорид). Після чого центрифугували при 10500g протягом 20 хв. Концентрацію білка визначали за допомогою Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), як стандарт використовували BSA. Розділення білків проводили у 10%-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Потім білок переносили на PVDF-мембрану (Millipore, Billerica, MA, USA). Візуалізацію здійснювали за допомогою хемілюмінесцентного субстрату HR Substrate reagent (Millipore). Для аналізу активності основних регуляторів енергетичного метаболізму клітини застосовували моноклональні антитіла проти сумарної кінрази, що активується АМФ (Ampk α 1/2, 1:500, sc-25792, Santa Cruz Biotechnology), моноклональні антитіла проти фосфорильованої за Tre¹⁷² Ampk α (1:500, sc-33524-R, Santa Cruz Biotechnology), моноклональні антитіла проти сумарної гормончутливої ліпази (Hsl 1:1000, 4107, Cell Signaling) та фосфорильованих її форм за Ser⁵⁶⁵ (1:1000, 4137, Cell Signaling), і Ser⁵⁶³ (1:1000, 4139, Cell Signaling); антитіла до сумарної ацетил-CoA карбоксилази (Acc; 1:1000, 04-322, Millipore) і її фосфорильованої форми pAcc (pAcc; 1:500, 07-303, Millipore); моноклональні антитіла проти Pparg (1:1000, sc-9000, Santa Cruz Biotechnology), а як контроль рівномірності нанесення білка – моноклональні антитіла проти гліцеральдегід-фосфатдегідрогенази (Gardh, 1:1000, 5174, Cell Signaling). Для вимірювання вмісту білка ACC мембрану інкубували протягом 1 години за пероксидазою (Pierce). Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які обчислювали як відношення вмісту досліджуваного білка до вмісту контрольного білка Gardh на тій самій доріжці гелю або тотального білка для оцінювання змін вмісту його фосфорильованої форми. Кількість тварин у кожній групі ≥ 4 .

Статистичну обробку даних проводили з використанням GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software). Застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-

way ANOVA) із *post hoc* тестом Тукея. $p < 0.05$ вважали статистично достовірним. Дані представлено у вигляді середнього $\pm$ стандартне відхилення.

Результати й обговорення. Раніше ми показали, що делеція гена α -Е-катеніну в ембріональному серці призводить до летальності дорослих тварин віком 11 місяців через розвиток серцевої недостатності, що супроводжується порушеннями структури міокарда та активацією канонічного Wnt-, Yap- [7] і PI3K/Akt-сигнальних шляхів. Цікаво, що PI3K/Akt-сигнальний каскад не лише контролює розмір та ріст клітин, а й регулює метаболізм ліпідів. Так, відомо, що одна з мішеней PI3K/Akt-сигналіну – Pparg, котрий є транскрипційним фактором і контролює гени, відповідальні за окиснення жирних кислот, зокрема і в кардіоміоцитах [5]. Крім того, активність Pparg також регулюється і канонічним Wnt-сигналіном через одну з його мішеней – ген *c-Myc* [11]. Тож ми припустили, що в серцях із гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну може бути порушений метаболізм жирних кислот, і зосередилися на аналізі активності основних регуляторів метаболізму ліпідів у серцях тварин із частковою та повною втратою гена α -Е-катеніну, а саме – Ampk, Pparg, Acc, Hsl.

Застосовувавши Вестерн-блот аналіз, ми виявили зменшення вмісту білка Pparg у лізатах сердець тварин із гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну (рис. 1). Це логічно, оскільки активація PI3K/Akt та канонічного Wnt-сигналінів пригнічує активність Pparg. Проте нижчий рівень вмісту останнього свідчить про зниження рівня утилізації жирних кислот у серцях мутантних тварин порівняно з контрольними. Рівень тотальної Ampk зростав в обох мутантних групах тварин (рис. 1), але, незважаючи на це, рівень фосфорильованої за Tre¹⁷² (призводить до активації) Ampk знижувався, що свідчить про її інгібування (рис. 1). Цікаво, що у гетерозиготних тварин із делецією гена α -Е-катеніну вміст фосфорильованої Ampk був навіть нижчим, ніж у лізатах сердець мишей із повною втратою гена α -Е-катеніну. Зауважимо, що Ampk – досить добре відомий регулятор метаболізму в серці й активується при ішемії [12] та відіграє важливу роль у гіпертрофії міокарда, де активація пригнічує синтез білків і гіпертрофію серця [4]. Тож нижчий рівень активності Ampk у кардіоміоцитах із повною та частковою втратою гена α -Е-катеніну свідчить не лише про порушення енергетичного обміну, а й про розвиток гіпертрофії серця у мутантних мишей. Крім того, рівень активності двох інших важливих регуляторів метаболізму жирних кислот та мішеней Ampk – Ацетил-CoA-карбоксилази (Acc) та гормончутливої ліпази (Hsl) – також був нижчим у серцях мутантних тварин обох дослідних груп порівняно з таким у контрольній (рис. 1). Hsl – один із ключових ферментів, що здійснює гідроліз тригліцеридів та диіліцеридів у серці [5]. Отримані дані свідчать про порушення метаболізму, а саме, нижчий рівень окиснення жирних кислот у кардіоміоцитах, що, у свою чергу, може призводити до накопичення ліпідів у кардіоміоцитах.

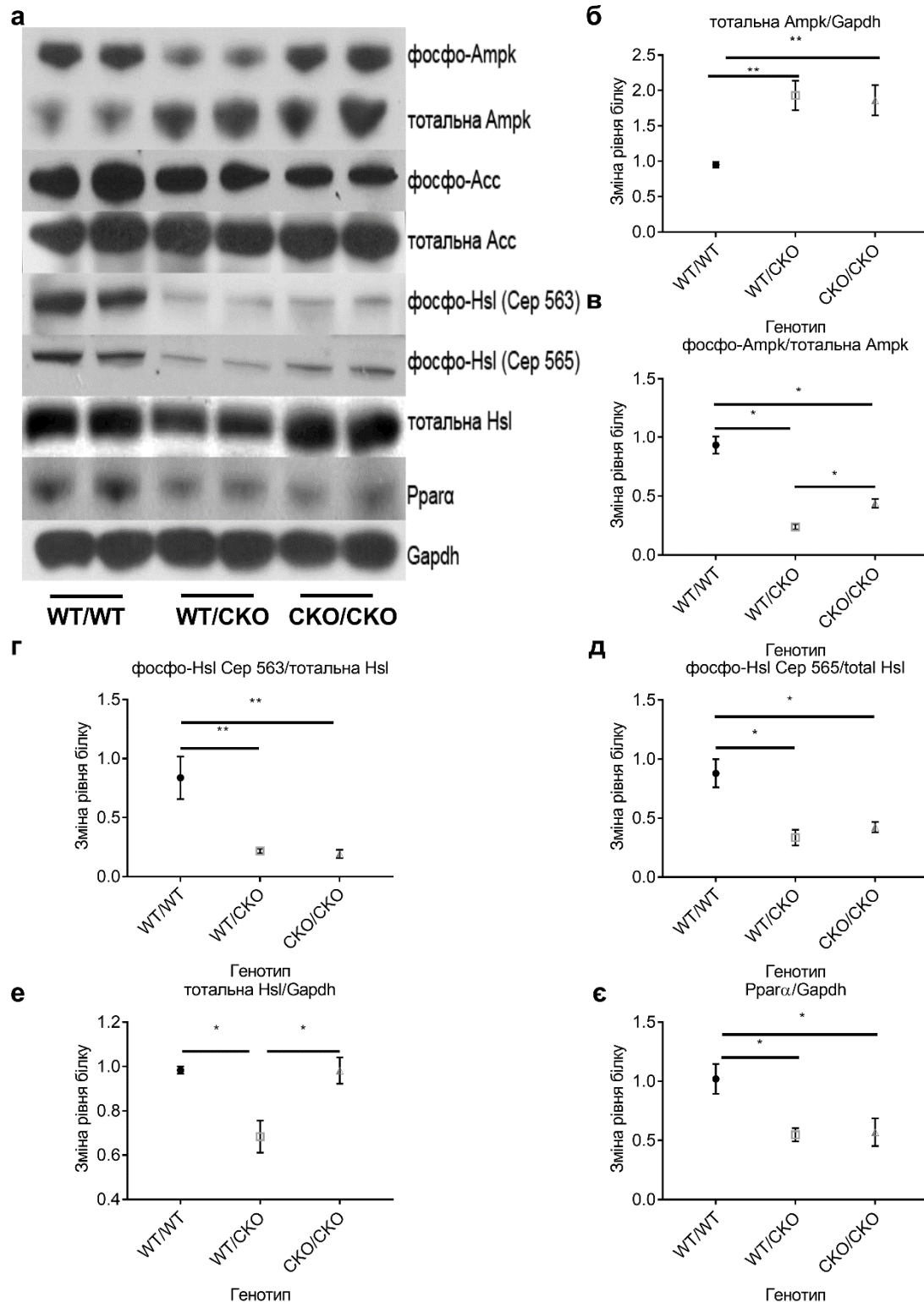


Рис. 1. Експресія та фосфорилування ключових білків-регуляторів метаболізму ліпідів у серцях контрольних мишей (WT/WT) та мишей із гетерозиготною (WT/CKO) та гомозиготною (CKO/CKO) делецією α -Е-катеніну:
а – типовий Вестерн-блот; б – денситограма експресії тотальної Ampk;
в – денситограма фосфорильованої Ampk; г – денситограма фосфорильованої за Сер563 Hsl;
д – денситограма фосфорильованої за Сер565 Hsl; е – денситограма експресії тотальної Hsl;
є – денситограма експресії Ppara; WT/WT – контрольні тварини, WT/CKO – тварини із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну, CKO/CKO – тварини з гомозиготною делецією α -Е-катеніну; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Враховуючи виявлені нами зміни експресії та фосфорилування білків, залучених до метаболізму ліпідів у серцях тварин із делецією α -Е-катеніну, ми вирішили перевірити можливе накопичення жирів у міокарді. Для цього застосували специфічне забарвлення жирів червоним О кризрізів тканини серця. У результаті про-

веденого аналізу виявлено накопичення ліпідів у серцях мишей із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена α -Е-катеніну (рис. 2). Отримані дані узгоджуються з результатами Вестерн-блот аналізу активності основних регуляторів метаболізму серця і також указують на порушення окиснення жирних кислот.

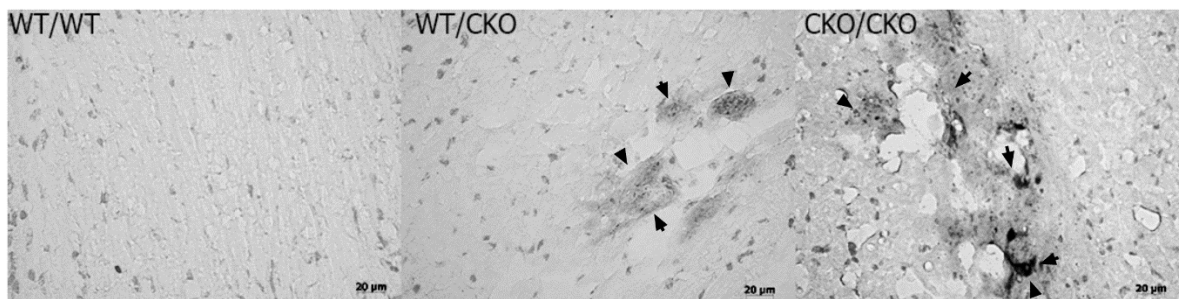


Рис. 2. Забарвлення жирів червоним О кризрізів сердець контрольних мишей (WT/WT) та мишей з гетерозиготною (WT/CKO) та гомозиготною (CKO/CKO) делецією α -Е-катеніну (накопичення ліпідів вказано стрілками. Лінійка – 20 мкм. Збільшення 400 $\times$)

Висновки Отримані нами дані свідчать про порушення метаболізму ліпідів у дорослому серці з гетеро- та гомозиготною делецією гена α -Е-катеніну, а також вказують на інгібування β -окиснення жирних кислот у міокарді мутантних тварин, що, як наслідок, призводить до накопичення нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах.

Список використаних джерел:

1. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies / B. C. Bernardo, K. L. Weeks, L. Pretorius, J. R. McMullen // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2010. – Vol. 128, № 1. – P. 191–227.
2. Kontaridis M. I. Pathways to myocardial hypertrophy / M. I. Kontaridis, E. V. Geladari, C. V. Geladari // *Introduction to Translational Cardiovascular Research*. – 2015. – P. 167–186.
3. Deciphering the function of canonical wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice / T. Grigoryan, P. Wend, A. Klaus, W. Birchmeier // *Genes & development*. – 2008. – Vol. 22, № 17. – P. 2308–41.
4. Dyck J. R. B. Ampk alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? / J. R. B. Dyck, G. D. Lopaschuk // *The Journal of Physiology*. – 2006. – Vol. 574, № 1. – P. 95–112.
5. Chaanine A. H. Akt signalling in the failing heart. / A. H. Chaanine, R. J. Hajjar // *European journal of heart failure*. – 2011. – Vol. 13, № 8. – P. 825–9.
6. Балацький В. В. Альфа-е-катенін у гістологічних перебудовах міокарда при старінні / В. В. Балацький, І. Акименко, Л. Л. Мацевич та ін. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2016. – Т. 18. – P. 219–222.
7. А-е-катенін – потенційний регулятор канонічного wnt та hippo-сигналінгів у міокарді / В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Мацевич, О. О. Півень // *Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів*. – 2016. – Т. 14, № 2. – P. 168–173.
8. Gene recombination in postmitotic cells targeted expression of cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo / R. Agah, P. A. Frenkel, B. A. French et al. // *The Journal of chemical physics*. – 1997. – Vol. 100, № 1. – P. 169–179.
9. Fischer A. H. Cryosectioning tissues. / A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller // *CSH protocols*. – 2008. – Vol. 2008, No. 8. – P. pdb.prot4991.
10. Ljungberg O. Peroperative fat staining of frozen sections in primary hyperparathyroidism / O. Ljungberg, S. Tibblin // *The American journal of pathology*. – 1979. – Vol. 95, № 3. – P. 633–41.
11. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice / P. Ahuja, P. Zhao, E. Angelis et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2010. – Vol. 120, № 5. – P. 1494–505.

12. Qi D. Ampk: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart / D. Qi, L. H. Young // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2015. – Vol. 26, № 8. – P. 422–429.

References:

1. Bernardo B., Weeks K., Pretorius L., McMullen J. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):191–227.
2. Kontaridis M., Geladari E., Geladari C. Pathways to myocardial hypertrophy. In: *Introduction to Translational Cardiovascular Research*. 2015. p. 167–86.
3. Grigoryan T., Wend P., Klaus A., Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 2008;22(17):2308–41.
4. Dyck J., Lopaschuk G. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol.* 2006;574(1):95–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690706>
5. Chaanine A., Hajjar R. AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail [Internet]*. 2011;13(8):825–9.
6. Balackiy V., Akimenko I., Macevich L., Piven O., Lukash L. α -E-katenin u histologichnuh perebudovah miokarda pru starinni. Faktoru eksperimentalnoi evilyucii organizmav. 2016;18(0):219–22.
7. Balackiy V., Palchevska O., Macevich L., Piven O. Балацький ВВ, α -Е-катенін потєнцинує регулятор канонічного Wnt та HIPPO-сигналів у міокарді. *Visnuk Ukrainskogo tovarustva genetukiv i selekcioneriv*. 2016;14(2):168–73.
8. Agah R., Frenkel P., French B., Michael L., Overbeek P., Schneider M. Gene Recombination in Postmitotic Cells Targeted Expression of Cre Recombinase Provokes Cardiac-restricted, Site-specific Rearrangement in Adult Ventricular Muscle In Vivo. *J Chem Phys.* 1997;100(1):169–79. Available from:
9. Fischer A., Jacobson K., Rose J., Zeller R. Cryosectioning tissues. *CSH Protoc.* 2008;2008(8):pdb.prot4991.
10. Ljungberg O., Tibblin S. Peroperative fat staining of frozen sections in primary hyperparathyroidism. *Am J Pathol.* 1979;95(3):633–41.
11. Ahuja P., Zhao P., Angelis E., Ruan H., Korge P., Olson A. et al. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *J Clin Invest.* 2010 May;120(5):1494–505.
12. Qi D., Young L. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(8):422–9.

Надійшла до редколегії 27.11.17

В. Балацкий, асп., Л. Мацевич, канд. биол. наук, О. Пивень, канд. биол. наук
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

КАРДИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДЕЛЕЦИЯ ГЕНА α -Е-КАТЕНИНА ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ВЗРОСЛОГО СЕРДЦА

Ранее нами было показано, что нокаут гена α -Е-катенина в эмбриональном сердце вызывает развитие гипертрофии взрослого сердца и сопровождается активацией канонического Wnt-сигналинга. Известно, что гипертрофия миокарда также сопровождается и нарушениями метаболизма, однако влияние α -Е-катенина на эти процессы не известно. Цель нашей работы – изучить влияние делеции α -Е-катенина на метаболизм жиров в сердце. Методы. Исследования проводили на мышах с условным нокаутом α -Е-катенина и трансгенных α MHC-Cre животных. Применяли гистологические (окрашивание жировым красным O) и молекулярно-биологические (Вестерн-блот) методы исследований. Результаты. Установлено, что делеция α -Е-катенина приводит к накоплению жиров в миокарде и к изменению экспрессии и уровня фосфорилирования основных регуляторов липидного метаболизма (Ampk, Ppara, Acc, Hsl). Выводы. Полученные данные свидетельствуют о нарушении метаболизма жиров во взрослом сердце мышей с гетеро- и гомозиготной делецией α -Е-катенина.

Ключевые слова: α -Е-катенин, миокард, метаболизм, Ampk, Ppara, Acc, Hsl.

V. Balatsky, PhD stud., L. Macewicz, PhD, O. Piven, PhD
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Kyiv, Ukraine

EMBRYONIC CARDIOSPECIFIC KNOCKOUT OF α -E-CATENIN GENE LEADS TO ALTERATION OF ENERGY METABOLISM IN ADULT HEART

Previously we have shown that the α -E-catenin knockout in the embryonic heart leads to hypertrophy in adult and activation of canonical Wnt-signaling. Heart hypertrophy is also accompanied by metabolic disorders, but role of the α -E-catenin in these processes is not known. Aim of our work is to study the effect of α -E-catenin deletion on the lipid metabolism in the heart. Methods. In our experiment we have used α -E-catenin conditional knockout and α MHC-Cre transgenic mice. We have utilized histological (Oil Red O staining) and molecular biological (Western blot) methods. Results. α -E-catenin deletion leads to accumulation of lipid droplets in myocardium, and to violation of expression and phosphorylation of key regulators of lipid metabolism (Ampk, Ppara, Acc, Hsl). Conclusions. Our results suggest that α -E-catenin deletion leads to inhibition of lipid metabolism in the heart.

Key words: α -E-catenin, myocardium, metabolism, Ampk, Ppara, Acc, Hsl.

УДК 616-006:577

А. Білюк, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Скачкова, канд. біол. наук
Національний інститут раку, Київ, Україна,
Г. Репіч, канд. хім. наук, С. Орисик, д-р хім. наук
Інститут загальної та неорганічної хімії імені В. І. Вернадського НАН України, Київ, Україна

ПРОТИПУХЛИННІ, АНТИМЕТАСТАТИЧНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ЕФЕКТИ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ ПЛАТИНОВИХ КОМПЛЕКСІВ

Метою цієї роботи було вивчення протипухлинних, антиметастатичних та метаболічних ефектів новосинтезованих п,п-хелатних комплексів Pt^{2+} із N-алілтіосечовинами (комплекс II та комплекс IV). Для цього використано високометастазуючий штам перещеплюваної карциноми легені Льюїс та клітини трансформованих гепатоцитів лінії HepG2 з високим рівнем активності гамаглутамінтранспептидази і клітини лейкемії миші L1210 із вираженням анеупloidним каріотипом та коротким терміном подвоєння популяції. Установлено, що комплекси II та IV проявляють протипухлинні та антиметастатичні ефекти і нормалізують біохімічні порушення, що підтверджується зниженням активності лактатдегідрогенази та гамаглутамінтранспептидази, активацією мітохондріальних ферментів: сукцинатдегідрогенази і цитохром оксидази, що вказує на пригнічення формування медикаментозної резистентності. Отримані дані проаналізовано у порівнянні з класичним хіміопрепаратом цисплатином.

Ключові слова: п,п-хелатних комплексів Pt^{2+} із N-алілтіосечовинами, протипухлинна та антиметастатична дія, гамаглутамінтранспептидазна активність.

Вступ. Виникнення новоутворень та розселення метастатично активних клітин кровеносною та лімфатичною системами тісно пов'язано з метаболічним перепрограмуванням, що часто характеризується переважанням гліколіколітичного метаболізму над мітохондріальним диханням [1]. На сьогодні цисплатин є одним із найуспішніших протипухлинних препаратів. Однак цей хіміопрепарат спричиняє такі побічні ефекти, як нефро-, нейротоксичність, мієлосупресія, а його використання часто обмежується резистентністю деяких типів пухлинних клітин. У виникненні медикаментозної резистентності до цисплатину задіяна гамаглутамінтранспептидаза (ГГТ), яка відіграє провідну роль у метаболізмі антиоксиданту глутатіону [2]. Родина ГГТ складається із 13 ферментів, які беруть участь у метаболізмі глутатіону, їх експресія змінюється в багатьох видах злоякісних пухлин людини. Фермент каталізує реакції гідролізу та транспептидації γ -глутамільного залишку глутатіону та споріднених спо-

лук до молекули акцептора, включаючи воду, амінокислоти та пептиди. ГГТ грає істотну роль у підтриманні рівня внутрішньоклітинного цистеїну. Унаслідок гідролізу зв'язку γ -глутамільного залишку в молекулі позаклітинного глутатіону під дією ГГТ він розщеплюється на глутамат та цистеїнілглутин [3]. За норми високої активності ГГТ проявляють секреторні та поглинаючі клітини жовчних проток, жовчних каналців і проксимальних каналців нирок, а також ендотеліальні клітини капілярів кровеносної системи [3–5]. У 1985 р. вперше запропоновано роль ГГТ у формуванні глутатіонзалежної медикаментозної резистентності та прогресії пухлин [5]. Глутатіон виступає як гідрофільна молекула, яка приєднується ферментами до гідрофобних токсикантів у процесі біотрансформації для подальшого їх виведення з організму у складі жовчі. Пренеопластичні осередки печінки щурів піддавали дії канцерогенів і в них була ідентифікована експресія ГГТ. З'ясовано, що ГГТ індукується у випадках численних видів

раку [3]. Підвищені рівні ферменту спостерігаються при раку яєчників, печінки, легенів і молочної залози, а також у меланомі і при лейкемії. Про роль ГГТ в резистентності до хіміотерапії свідчить ряд досліджень, які показали, що трансфекція з ГГТ призводить до стійкості проти ряду платинових препаратів, і зокрема до цисплатину. Клітини, вирощені з біопсій пацієнтів з аденокарциномою яєчників до і після лікування (цисплатин, хлорамбуцил і 5FU), показали 6,5-кратне збільшення активності ГГТ після лікування. ГГТ-позитивні пухлини значно більш резистентні до токсичності цисплатину ніж ГГТ-негативні пухлини [6]. Отже при застосуванні терапевтичних засобів, зокрема цисплатину та його аналогів, оцінка активності ГГТ може слугувати маркерним показником медикаментозної резистентності.

Також мутації генів деяких мітохондріальних білків, включаючи сукцинатдегідрогеназу (СДГ) та фумаратгідратазу, індують розвиток дисфункції циклу трикарбованих кислот та можуть бути не лише наслідком, а й причиною утворення пухлин. Наявність мутацій гена СДГ асоціюється зі збільшенням частоти розвитку феохромоцитом та парагангліом [7]. Деякі мутації гена фумаратгідратази можуть сприяти розвитку множинних шкірних лейоміом, а також спадкових лейоміом, що поєднуються з нирково-клітинним раком. Онкогенні мутації цих двох ферментів супроводжуються втратою їх функцій, що сприяє накопиченню у клітинах проміжних продуктів циклу трикарбованих кислот – сукцинату і фумарату, які конкурентно інгібують альфа-кетоглутаратзалежну HIF-1-альфа-пролілоксидазу. Це веде до стабілізації HIF-1-альфа навіть в умовах нормоксії. У свою чергу, HIF-1 підвищує експресію генів, що кодують ферменти гліколізу, і, таким чином, відіграє ключову роль у перемиканні метаболізму пухлинних клітин до гліколітичного фенотипу [8].

У попередніх дослідженнях на моделі сфероїдного росту раку молочної залози нами показано, що новосинтезовані комплекси платини та паладію $[Pd(HL^1)Cl_2] \cdot H_2O$ (I), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (II), $[Pd(HL^2)Cl_2]$ (III), $[Pt(HL^2)Cl_2]$ (IV) [9–12] підвищували адгезивну здатність сфероїдів MCF-7, збільшували рівень апоптозу та знижували ГГТ-активність [9], порівняно як із контролем, так і з цисплатином. Також зафіксовано, що новосинтезовані комплекси із платиною пригнічували залучення глюкози в метаболізм клітин, що дозволило припустити нормалізацію цими сполуками гліколізу та мітохондріального дихання.

Мета дослідження полягала у визначенні протипухлинних, антиметастатичних та метаболічних ефектів за дії новосинтезованих *n*,*n*-хелатних комплексів Pt^{2+} із *N*-алілітосечовинами порівняно із класичним препаратом платини на моделях лейкемічних, гепатоцитарних трансформованих клітин та карциноми легень Льюїс.

Матеріали та методи. *Моделі пухлинного росту.* Використано високометастазуючий штаб солідної пухлини – карциноми легень Льюїс. Перещеплення пухлини карциноми легень Льюїс (LLC) здійснювали ме-

тодом внутрішньом'язової трансплантації суспензії первинної культури пухлинних клітин у задню праву лапу миші лінії C57/Black у концентрації 2×10^6 клітин на тварину (середня вага тварин на початок експерименту становила $19,4 \pm 1,7$ г). Терапія цисплатином та його новосинтезованими аналогами проводилась 5-кратним внутрішньочеревинним уведенням через добу в сумарній дозі 5 мг/кг ваги тварини, починаючи із 7 доби після перещеплення пухлини. Розміри пухлин оцінювали протягом 7–23 доби після перещеплення. Рівень метастазування за кількістю та об'ємом метастазів у легені оцінювали на 23 добу після перещеплення. Оцінювали активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦО у тканині печінки та пухлини загальноприйнятими методами після виділення мітохондрій та субмітохондріальних частинок (СМЧ), як описано нами раніше [13]. Активність основних ферментів, які за пухлинного росту відрізняються від показників інтактних тканин, визначали в сироватці крові та в первинній пухлині на 23 добу після перещеплення згідно з рекомендаціями виробника (Філісіт-діагностика, Україна).

Для визначення ГГТ- та ЛДГ-активності в системах *in vitro* використовували зазначені вище тест-набори в мікрометодах. Розраховували активність згідно з рекомендаціями виробника та дані представляли в мккат/л.

Рівень основного енергетичного субстрату глюкози та утилізацію пухлинними клітинами із середовища інкубації визначали в сироватці крові глюкозооксидантним методом. Як модельні системи для визначення ГГТ-активності під впливом досліджуваних цисплатину та новосинтезованих сполук використали клітини трансформованих гепатоцитів лінії Hep G2, які мають високий рівень активності цього ферменту. Для визначення пригнічення синтетичних процесів використовували клітини первинної культури лейкемії миші L1210 із вираженим анеуплоїдним каріотипом та коротким терміном подвоєння популяції (8–10 годин).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням "Origin 6,1" і *t*-критерію Стюдента. Усі дані наведено у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

Результати та їх обговорення. Темпи росту пухлини та рівень метастазування при дії протипухлинних засобів є ключовими у визначенні їх терапевтичної ефективності. У порівняльному дослідженні виявлено зниження темпів росту первинної пухлини карциноми легень Льюїс як за впливу цисплатину, так і за впливу новосинтезованих комплексів (II і IV), хімічна структура та процес синтезу яких надано у представленій раніше роботі [9]. Як свідчать наведені на рис. 1 дані, комплекс II проявляв таку саму протипухлинну активність як цисплатин, тоді як комплекс IV – дещо нижчу. Темпи росту первинної пухлини карциноми Льюїс порівняно з контролем (без терапії), суттєво пригнічувались під впливом усіх досліджуваних сполук.

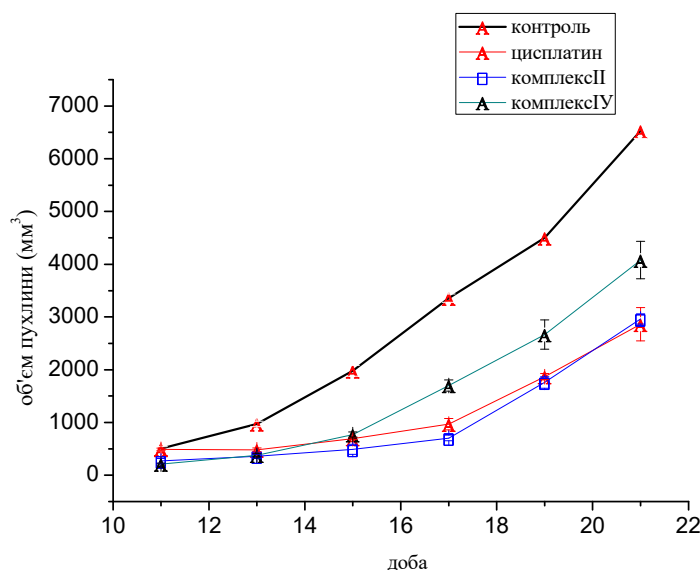


Рис. 1. Об'єм первинної пухлини за дії цисплатину та його новосинтезованих аналогів: [Pt(HL1)Cl₂] (комплекс II), [Pt(HL2)Cl₂] (комплекс IV)

Також виявлено зниження об'єму метастатичного ураження та кількості метастазів васкулярної фази (більше 1 мм у діаметрі), що свідчить про пригнічення ме-

тастазування порівняно з експериментальною групою тварин без терапії (табл.1).

Таблиця 1. Об'єм метастатичного ураження в легені за дії цисплатину та новосинтезованих комплексів [Pt(HL1)Cl₂] (комплекс II), [Pt(HL2)Cl₂] (комплекс IV)

Групи тварин	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IV (n=7)
Об'єм метастазування	54,67±12,00	18,88 ±5,37*	23,92±2,75*	16,35±4,58*
Об'єм (відсоток) метастазів аваскулярної фази	14,23±5,60 (27,03 %)	8,06±6,41 (43,61 %)	5,03±1,89 (18,88 %)	8,22±4,82 (50,28 %)

* – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії).

Як свідчать наведені дані, об'єм метастатичного ураження за дії цисплатину та новосинтезованих комплексів II та IV знижувався у 3; 2,2; та 3,5 рази ($p < 0.05$), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV відмічено також антиангіогенну дію, оскільки виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази (близько 57 % та 50 % проти 73 % у контрольному випадку). Вміст метастазів васкулярної фази під дією комплексу II був найвищим (82 %).

Відомо, що біохімічна анаплазія за пухлинного росту пов'язана з локальними та системними порушеннями, що є одним з визначальних факторів прогресування новоутворень [14]. Тому пошук протипухлинних препаратів на основі метаболічних відмінностей між нормальними і раковими клітинами має важливе значення для покращення терапевтичної селективності. Формування у клітинах нечутливості до дії лікарських чинників є фактором прогресії новоутворень. Одним із показових маркерних ферментів виникнення резистентності до низки хіміопрепаратів, у тому числі до цисплатину є ГГТ-активність. Визначення системних порушень за біохімічними показниками проводили в сироватці крові експериментальних тварин. Рівень ГГТ у сироватці кро-

ві незначно підвищувався за впливу цисплатину, тоді як при дії комплексів II та IV змін порівняно з контрольним не виявлено змін. Активність інших ферментів, що задіяні у презентації печінкою метаболітів, АлАТ та АсАТ була вищою у контролі (LLC без терапії), ніж у сироватці крові інтактних тварин та не відрізнялась у всіх експериментальних групах тварин через велике відхилення у показниках у групах тварин (табл. 2). За дії комплексів II та IV виявлено нормалізацію рівня глюкози порівняно із тваринами без терапії та показниками в сироватці крові інтактних тварин (табл. 2). Також наростала сумарна ЛДГ-активність у групі тварин без терапії. Перетворення пірувату в лактат каталізується ЛДГ. Молекула ЛДГ складається з 4 субодиниць двох типів М (продукт гена ЛДГА) та Н (продукт гена ЛДГВ). У пухлинних клітинах зазвичай надекспресована А-ізоформа ЛДГ. Нокаут гена ЛДГА в пухлинних клітинах стимулює мітохондріальне дихання та знижує проліферацію клітин *in vitro*, а *in vivo* майже втричі збільшує виживання мишей при моделюванні у них раку молочної залози [15]. Цисплатин не змінював активність ЛДГ відносно групи тварин без терапії. Комплекси II і IV нормалізували активність ЛДГ у сироватці крові до значень інтактних тварин (табл. 2).

Таблиця 2. Активність ферментів та рівень глюкози в сироватці крові експериментальних тварин із перещепленою карциномою легені Льюїс за дії новосинтезованих сполук платини

Групи тварин	Інтактні тварини (n=6)	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IV (n=7)
АлАТ (ммоль/л·год)	64,7±15,4	113,5±33,5	108,4±18,1	84,3±12,3	142,2±44,7
АсАТ (ммоль/л·год)	430,0±83,4	462,8±103,5	312,0±82,4	289,7±102,5	367,8±58,4
ЛДГ-активність (мккат/л, 25 °С)	3,9±0,1	5,6±0,2*	5,7±0,1*	2,3±0,2^	4,4±0,3
ГГТ-активність (мккат/л)	2,8±0,7	4,6±0,9 *	6,9±0,4^	3,7±0,5^	3,3±0,2^
Глюкоза (ммоль/л)	7,9±0,3	5,4±0,1*	6,2±0,2*	8,4±0,1^	6,6±0,2*

* – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину.

Визначення активності мітохондріальних ферментів у пухлинах виявило таке: за впливу цисплатину та комплексу IV активність СДГ була нижчою, ніж у пухлинних клітинах тварин без терапії. Комплекс II навпаки призводив до підвищення активності СДГ, як у порівнянні із

цисплатином, так і щодо контрольних значень (табл. 3). Для цього комплексу також виявлено суттєве підвищення цитохромоксидазної активності, що корелює зі зниженням активності ЛДГ за дії комплексу II (табл. 3).

Таблиця 3. Активність мітохондріальних ферментів у пухлинних клітинах

Групи тварин	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IV (n=7)
СДГ-активність (мкм/моль $K_3[Fe(CN)_6]/мг \cdot хв$)	25,9±3,2	14,5±4,3*	35,6±4,1^	15,8±2,2*
ЦО активність (цитохром С/ мг·хв)	1,1±0,2	0,8±0,1	3,6±0,3^	0,4±0,0

* – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину

Також сумарну активність мітохондріальних ферментів у пухлинах оцінювали за кількістю відновлених мітохондріями живих клітин 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) до кристалічного формазану [16]. У відновленні МТТ в основному беруть участь мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа та цитохром С [17]. Таким чином, сполуки, які впливають на інтенсивність відновлення МТТ можуть виступати модифікаторами мітохондріального дихання [18]. Як уже зазначалося,

МТТ більшою мірою є субстратом для сукцинатдегідрогенази (СДГ), яка бере участь у ланцюзі перенесення електронів на молекулярний кисень. Із використанням інгібіторів СДГ показано, що пригнічення активності цього ферменту веде до зменшення інтенсивності відновлення МТТ. Із використанням МТТ-тесту збільшення активності мітохондріальних ферментів, так само як і у випадку визначення активності СДГ в мембранах мітохондрій, зафіксовано за дії комплексу II (рис. 2).

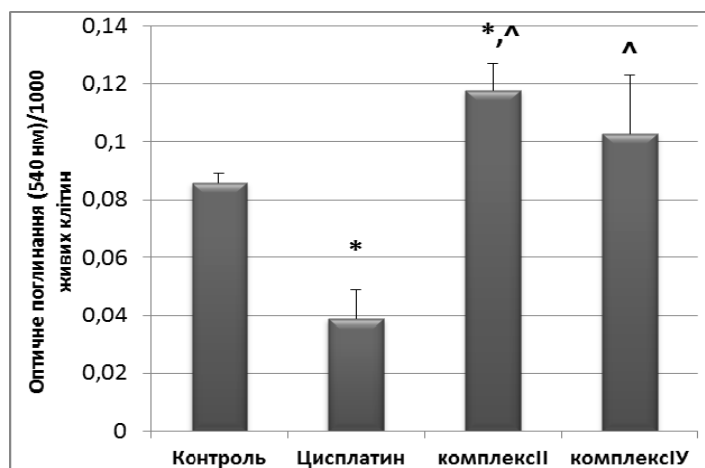


Рис. 2. Рівень відновленого 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) до кристалічного формазану в розрахунок на одиницю живих клітин

Примітки. * – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину.

При вивченні біологічних властивостей клітин під впливом еквімолярних концентрацій цисплатину та комплексів II і IV (IC50 для яких містилося в однаковому діапазоні концентрацій: 6×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , відповідно до [9]) виявлено таке: зниження активності мітохондріальних ферментів за впливу цисплатину, без змін порівняно із тваринами без терапії та наростання активності мітохондріальних ферментів за дії комплексу II.

ГГТ-активність та ЛДГ-активність визначали в середовищі короткотермінової (6-годинної) культури клітин, виділених на 23 добу після перещеплення пухлини в досліджуваних експериментальних групах.

Для пухлинних клітин характерний розвиток лактацидозу, пов'язаний із порушенням активності та ізоферментного спектра лактатдегідрогенази [19]. Показано, що в мікрооточенні культур клітин "контролю" та "цисплати-

ну", рН через 4 години інкубації знижувався до 6,9 та 6,8 відповідно проти аналогічного показника в середовищі, рівного 7,3. Стосовно комплексу II не виявлено зміни рН;

а для комплексу IV рН становив 7,1. ЛДГ-активність та ГТГ-активність суттєво відрізнялися в пухлинах різних експериментальних груп (рис. 3А та 3Б).

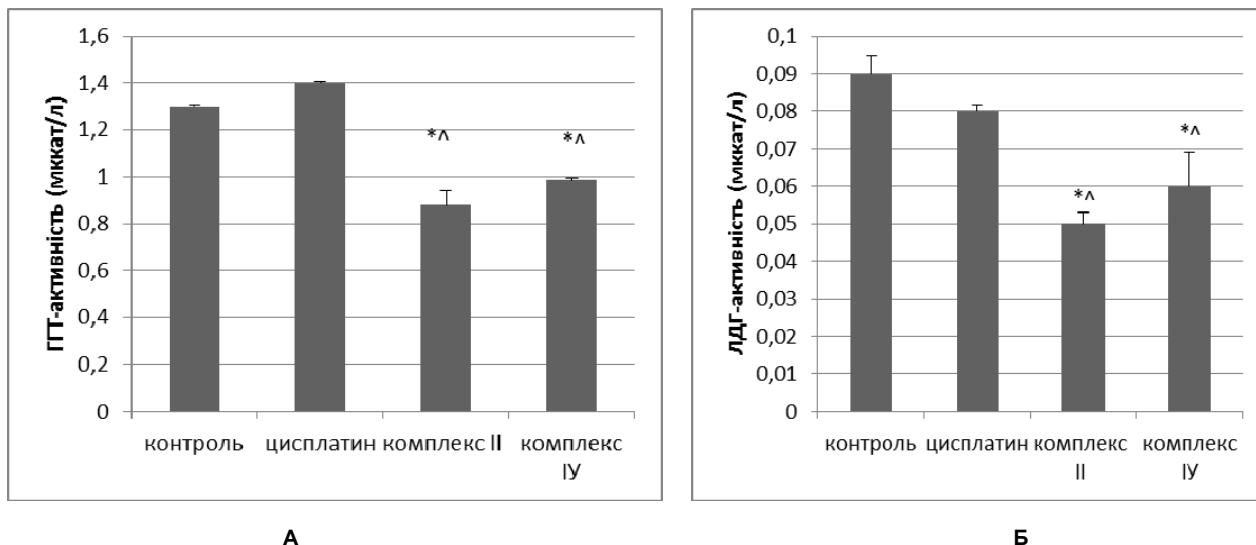


Рис. 3. ГТГ-активність (А) та ЛДГ-активність (Б) у мікрооточенні клітин LLC, виділених із пухлин за дії цисплатину та комплексів II та IV

Примітки. * – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину.

Для підтвердження дії отриманих в експерименті *in vivo* результатів впливу новосинтезованих цисплатинвмісних сполук нами проведено дослідження на клітинах гепатокарциноми Нер G2-модельній системі [20] для визначення активності ГТГ як основного ферменту, що бере участь в екскреції метаболітів цисплатину з пухлинних клітин і таким чином індукуює медикаментозну

резистентність та клітини лейкемії миші L1210 [21] із коротким терміном подвоєння популяції *in vitro*. За інкубації досліджуваних сполук із клітинами гепатокарциноми в концентрації, що була нижчою в 10 разів показника IC50, виявлено підсилення активності ГТГ під впливом цисплатину (рис. 4).

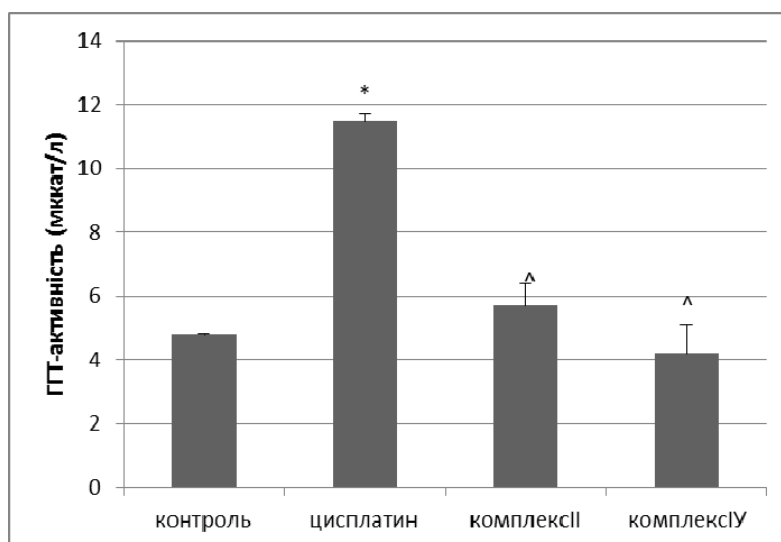


Рис. 4. ГТГ-активність у клітинах Нер G2 за впливу цисплатину та комплексів II та IV

Примітки. * – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину.

Вплив досліджуваних речовин доводить пригнічення популяції клітин проліферативного пулу (S+G2/M) клітин L1210 за дії комплексів II та IV, а також накопиченням у G2/M та пригніченням клітин популяції синтетичної фази S (рис. 5). Такий механізм дії може свідчити не лише про

інтерполяцію досліджуваних сполук у ДНК і пригнічення синтезу, а і про те, що дані сполуки можуть проявляти властивість, характерну для протипухлинних антитубулінових препаратів, таких як вінкрістин.

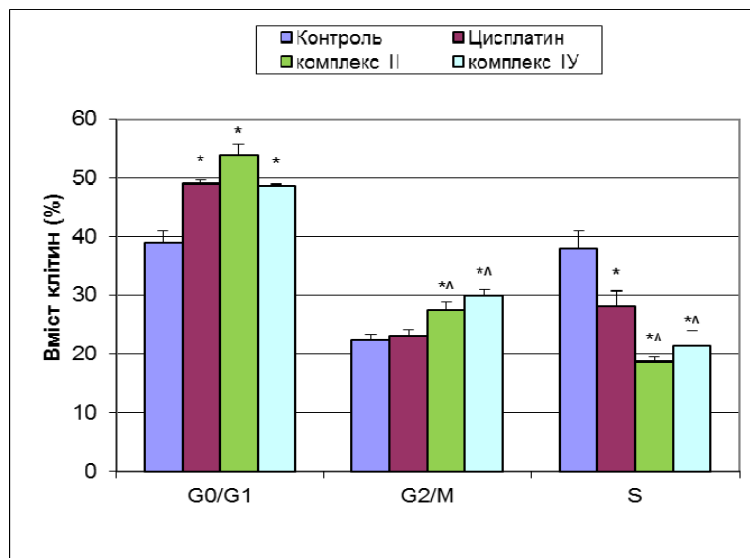


Рис. 5. Дія цисплатину, комплексів II та IV на клітинний цикл клітин лейкемії миші L1210

Примітки. * – $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою (тварини без терапії); ^ – $p < 0.05$ порівняно із впливом цисплатину.

Таким чином проведені дослідження з використанням цисплатину та в порівняльному аналізі з новосинтезованими комплексами платини II та IV доводять протипухлинні та антиметастатичні ефекти цих сполук. Окрім того, механізм їхньої дії може бути пов'язаний із нормалізацією біохімічних порушень, що підтверджується зниженням активності лактатдегідрогенази та гамаглутамінтранспептидази. ЛДГ-активність за дії комплексу II знижена, а активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦО збільшується, що може свідчити про підсилення в пухлинних клітинах мітохондріального дихання та зниження клітинної проліферації. Доказом останнього є зменшення вмісту клітин L1210 популяції проліферативного пулу (S+G2/M) за дії комплексів II та IV, а також накопичення клітин у G2/M-фазі та пригнічення клітин популяції синтетичної фази S. Крім того, активація СДГ та ЦО може сприяти зменшенню накопичення у клітинах проміжних продуктів ЦТК – сукцинату та фумарату, інгібіторів HIF-1-альфа, що послаблює гліколітичний фенотип пухлинних клітин. Зниження ГГТ-активності в пухлинних клітинах указує на запобігання формуванню медикаментозної резистентності. Це підтверджено як на моделях класичного об'єкта визначення ГГТ HepG2 *in vitro*, так і на перещеплюваній карциномі легень Льюїс *in vivo*.

Список використаних джерел:

- Brandon M. Mitochondrial mutations in cancer / M. Brandon, P. Baldi, D. Wallace // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – № 34. – P. 4647–4662.
- Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance / M. H. Hanigan // *Adv. Cancer. Res.* – 2014. – Vol. 122. – P. 103–141.
- γ -Glutamyl transferase 7 is a novel regulator of glioblastoma growth / T. T. Bui et al. // *BMC Cancer*. – 2015. – Vol. 15. – P. 225.
- Whitfield J. B. Gamma-glutamyltransferase / J. B. Whitfield // *Crit Rev Clin LabSci*. – 2001. – Vol. 38, № 4. – P. 263–355.
- Hanigan M. H. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyltranspeptidase in normal tissue / M. H. Hanigan, H. F. Jr. Frierson // *J Histochem Cytochem*. – 1996. – Vol. 44. – № 10. – P. 1101–1108.
- Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting / A. Corti, M. Franzini, A. Paolicchi, A. Pompella // *Anticancer Research*. № 30. – 2010. – P. 1169–1182.
- Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation / J. J. Briere et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. C1114–C1120.
- HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms / A. Marín-Hernández et al. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 9. – P. 1084–1101.

- Pt (II) and Pd (II) complexes influence on spheroids growth of breast cancer cells / A. A. Bilyuk, O. V. Storozhuk, O. V. Kolotiy et al. // *Biotechnologia Acta*. – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 61–67.

- Impact of the new cisplatin analogues π -coordination complexes of Pt(II) and Pd(II) on the growth dynamics of breast cancer spheroids / O. V. Kolotiy, A. A. Bilyuk, O. V. Storozhuk, L. V. Garmanchuk // *XV International Conference of Students and Young Scientists "Shevchenkivska Vesna: BioScience Advances"*, 18–21 квітня 2017.

- Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II) π -coordination compounds based on N-allylthioureas. Cytotoxic properties and DNA binding ability / H. H. Repich, V. V. Orysyk, L. G. Palchykovska et al. // *Journal of Inorganic Biochemistry* 168. – (2017). – 98–100 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.0040162-0134> © 2016 Elsevier Inc

- Pt (ii) and Pd (ii) complexes influence on GGT activity of breast cancer cells / A. A. Bilyuk, O. V. Kolotiy, H. H. Repich et al. // Третя міжнародна біомедична школа для студентів, аспірантів та молодих учених на тему "Клітинні функції у нормі та при патології" // 24–28 вересня 2017.

- Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на різних етапах росту пухлини / А. А. Білюк, А. О. Негеля, О. В. Скачкова, Л. В. Гарманчук // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка (серія Проблеми регуляції фізіологічних функцій). – 2016. – 2 (21). – С. 81–85.

- Kroemer G. Mitochondrion in cancer / G. Kroemer // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 4630–4632.

- Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance / V. R. Fantin et al. // *Cancer Cell*. – 2006. – Vol. 9. – P. 425–434.

- Mosmann T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Immunol. Methods*. – 1983. – 65, N1–2. – P. 55–63.

- Sen A. K. Diaquabis(4-amino-3-methyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazole-5-thione)nickel(II) Nitrate: a Sulfur-Nitrogen Chelate / A. K. Sen, S. N. Dubey, P. J. Squattrio // *Acta Cryst. C*. – 1996. – № 52. – P. 865–868.

- Berridge M. V. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction / M. V. Berridge, A. S. Tan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1993. – 303. – № 2. – P. 474–82.

- Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis / Y. Kolev, H. Uetake, Y. Takagi, K. Sugihara // *Ann. Surg. Oncol.* – 2008. – 15. – P. 2336–2344.]

- Javitt N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids // *FASEB J*, 1990. – № 4. – P. 161–168.

- Aldred A. J. Determination of a humane endpoint in the L1210 model of murine leukemia / A. J. Aldred, M. C. Cha, K. A. Meckling-Gill // *Contemp Top Lab Anim Sci*. – 2002. – Mar. 41 (2). – P. 24–27.

References:

- Brandon M., Baldi P., Wallace D. Mitochondrial mutations in cancer // *Oncogene*. 2006; 25(34):4647–62.PMID:16892079DOI:10.1038/sj.onc.1209607
- Hanigan M. Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance// *Adv. Cancer. Res.* 2014; 122: 103–41. PMID:24974180PMCID:PMC4388159DOI:10.1016/B978-0-12-420117-0.00003-7

3. Bui T., Nitta R., Kahn S., Razavi S., Agarwal M., Aujla P., Gholamin S., Recht L., Li G. γ -Glutamyl transferase 7 is a novel regulator of glioblastoma growth // BMC Cancer. 2015; 15: 225-30doi: 10.1186/s12885-015-1232-y. MID:25884624PMCID:PMC4393868
4. Whitfield J. Gamma-glutamyltransferase // Crit Rev ClinLabSci. 2001;38 (4): P 263-355.PMID:11563810DOI:10.1080/20014091084227
5. Hanigan M., Frierson Immunohistochemical detection of gamma-glutamyltranspeptidase in normal human tissue // J HistochemCytochem. 1996;44(10): 1101-8.PubMed: 8813074
6. Corti A., Franzini M., Paolicchi A., Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting// Anticancer Research . 2010; 30:1169-82 PMID:20530424
7. Brière J., Favier J., Gimenez-Roqueplo A., Rustin P. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006; 291:1114-20.PMID:16760265DOI:10.1152/ajpcell.00216.2006
8. Marín-Hernández A., Gallardo-Pérez J., Ralph S., Rodríguez-Enríquez S., Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms// MiniRev. Med. Chem. 2009; 9: 1084-101 PMID:19689405
9. Bilyuk A., Storozhuk O., Kolotiy O., Repich H., Orysyk S., Garmanchuk L. Pt (II) and Pd (II) complexes influence on spheroids growth of breast cancer cells // Biotechnologia Acta. 2017;10(1): 61-7.https://doi.org/10.15407/biotech10.01.061
10. Kolotii Olga V., Biluk Anastasiya A., Storozhuk Olga V., Garmanchuk L. V. Impact of the new cisplatin analogues-coordination complexes of Pt(II) and Pd(II) on the growth dynamics of breast cancer spheroids // XV International Conference of. Students and Young Scientists "Shevchenkivska Vesna: BioScience Advances", 18-21.04.17
11. Repich H., Orysyk V., Palchykovska L., Orysyk S., Zborovskii Y., Vasylenko O., Storozhuk O., Biluk A., Nikulina V., Garmanchuk L., Pechnyo V., Vovk M. Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II) π -coordination compounds based on N-allylthioureas. Cytotoxic properties and DNA binding ability//Journal of Inorganic Biochemistry.2017;168: 98–110http://dx.doi.org/10.1016/j.inorgbio.2016.12.0040162-0134
12. Bilyuk A., Kolotiy O., Repich H., Orysyk V., Garmanchuk L. Pt (ii) and Pd (ii) complexes influence on GGT activity of breast cancer cells// Third International Biomedical School for Students, Postgraduates and Young Scientists on "Cellular Functions in Normal and Pathology" // September 24-28, 2017
13. Bilyuk A., Negelie A., Skachkova O., Garmanchuk L. The activity of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase in the primary culture of Lewis lung transfectional carcinoma at different stages of tumor growth // Bulletin of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. Problems of regulation of physiological functions. 2016; 21 (2):81-5
14. Kroemer G. Mitochondrion in cancer // Oncogene .2006;25: 4630-2PMID:16892077DOI10.1038/sj.onc.1209589
15. Fantin V., St-Pierre J., Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance // Cancer Cell.2006; 9:425-34PMID:16766262DOI:10.1016/j.ccr.2006.04.023
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Immunol. Methods. 1983;65(1-2):55-63PMID:6606682
17. Sen A., Dubey S., Squattrio P. Diaquabis(4-amino-3-methyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazole-5-thione)nickel(II) Nitrate: a Sulfur-Nitrogen Chelate // Acta Cryst. C. 1996;52: 865-8.https://doi.org/10.1107/S010827019501496X
18. Berridge M., Tan A. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement in mitochondrial electron transport MTT reduction // Arch. Biochem. Biophys.1993;303(2.)474–82PMID:8390225DOI:10.1006/abbi.1993.1311
19. Kolev Y., Uetake H., Takagi Y., Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis // Ann. Surg. Oncol. 2008;15:2336–344.PMID: 18521687DOI:10.1245/s10434-008-9955-5
20. Javitt N. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. FASEB J.1990; 4:161–8 PMID:2153592
21. Aldred A., Cha M., Meckling-Gill K. Determination of a humane endpoint in the L1210 model of murine leukemia. Contemp Top Lab Anim Sci. 2002 Mar;41(2):24-7. PMID:11958599

Надійшла до редколегії 23.11.17

А. Билук, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук

ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

О. Скачкова, канд. биол. наук

Національний інститут рака, Київ, Україна,

Г., Репич канд. хим. наук, С. Орисик, д-р хим. наук

Інститут общей и неорганической химии имени В. И. Вернадского НАН Украины, Киев, Украина

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ, АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ ПЛАТИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Целью данной работы было изучение противоопухолевых, антиметастатических и метаболических эффектов новосинтезированных n , π -хелатных комплексов Pt2 + с N -аллилтиомочевинной (комплекс II и комплекс IV). Для этого использовали высокометастазирующий штамм перевиваемой карциномы легкого Льюис и клетки трансформированных гепатоцитов линии HepG2 с высоким уровнем активности гаммаглутаминтранспептидазы и клетки лейкемии мыши L1210 с выраженным анеуплоидным кариотипом и коротким сроком удвоения популяции. Установлено, что комплексы II и IV проявляют противоопухолевые и антиметастатические эффекты и нормализуют биохимические нарушения, что подтверждается снижением активности лактатдегидрогеназы и гаммаглутаминтранспептидазы, активацией митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы, цитохром оксидазы, что указывает на подавление формирования лекарственной резистентности. Полученные данные проанализированы в сравнении с классическим химиопрепаратом цисплатином.

Ключевые слова: n , π -хелатных комплексов Pt2 + с N -аллилтиомочевинной, противоопухолевое и антиметастатическое действие, гаммаглутаминтранспептидазная активность.

A. Biluk, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc

ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Scachkova, PhD

Ukrainian National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine,

H. Repich, PhD., S. Orysyk, DSc

Institute of general and inorganic chemistry of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ANTINEOPLASTIC, ANTI-METASTATIC AND METABOLIC EFFECTS OF NEWLY INTENSIFIED PLATINUM COMPLEXES

The aim of this work was to study the antitumor, anti-metastatic and metabolic effects of the newly synthesized n , π -chelate complexes Pt2 + with N -allylthioureas (complex II and IU complex). The studies used high-metastable strain of transfected Lewis lung carcinoma and HepG2-transformed hepatocyte cells with high activity gamma-glutamate transpeptidases and mouse leukemia cells of L1210 with pronounced aneuploid karyotype and short duplication of population. In the comparative analysis with the classical chemotherapy cisplatin, the II and IV complexes revealed antitumor and anti-metastatic effects and normalization of biochemical disorders, which are confirmed by a decrease in the activity of lactate dehydrogenase and gamma-glutamyltranspeptidase, indicating the inhibition of the formation of drug resistance.

Key words: n , π -chelate complexes Pt2 + with N -allylthioides, antitumor and anti-metastatic action, gamma-glutamyltranspeptidase antiactivity.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 2(23)

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "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. 8,8. Наклад 300. Зам. № 218-8590.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б7*.
Підписано до друку **11.12.17**

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.univ.kiev.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02